

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. С. М. Марчишин

УДК615.014:615.322:615.451.16

ОЦІНКА СКЛАДУ ТА ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ, ОТРИМАНИХ ЗА РІЗНИМИ ТЕХНОЛОГІЯМИ

© О. Г. Смалюх, С. В. Сур

АТ «Галичфарм»,

Корпорація «Артеріум»

Резюме: розроблено методологічні підходи до оцінки різниці складу екстрактів, виготовлених за різними технологіями. Проведено вибір аналітичних методів, БАР/маркерів та критеріїв для оцінки різниці складу екстрактів. Показано відсутність суттєвої різниці у складі ГЕ Седавіт, вироблених за двома технологіями.

Ключові слова: оцінка різниці складу, флавоноїди, спектрофотометричне визначення, хроматографічні дослідження, порівняльні дослідження.

Вступ. На сьогодні лікарські засоби рослинного походження займають значну частку світового фармацевтичного ринку. Дуже часто вони є особливими і замінити їх синтетичними лікарськими засобами практично неможливо як з огляду складності структури, так і через те, що в рослинах міститься складний комплекс БАР, відтворити який синтетичним шляхом неможливо.

Склад, вміст і співвідношення біологічно активних речовин (БАР) в лікарській рослинній сировині (ЛРС) та, відповідно, рослинних лікарських засобах, є часто дуже складними і можуть суттєво змінюватися під впливом різноманітних факторів. Відповідно, стандартизація рослинних лікарських засобів є досить складним завданням та потребує знання складу БАР ЛРС, розуміння технології виробництва рослинних лікарських засобів та використання сучасних (насамперед хроматографічних) методів аналізу [1].

При розробці нової або оптимізації існуючої технології виробництва екстрактів з ЛРС виникає необхідність проведення порівняльних досліджень складу екстрактів, вироблених за різними технологіями, для оцінки ефективності цих технологій, розробки специфікацій та розуміння різниці між складом, вмістом та співвідношенням БАР в цих екстрактах. У випадку суттєвої зміни складу екстрактів при зміні технології їх виготовлення, регуляторними органами може бути зроблений висновок щодо необхідності проведення нових доклінічних та клінічних досліджень, безпечності та ефективності цих продуктів.

Мета роботи – розробка методологічного підходу до оцінки різниці складу екстрактів, виготовлених за різними технологіями. Завданнями роботи були вибір аналітичних методів, БАР

або маркерів та критеріїв для оцінки різниці складу екстрактів.

Матеріали і методи. Для дослідження використовували комплексні густі екстракти (ГЕ) Седавіту, виробництва АТ «Галичфарм» корпорації «Артеріум», виготовлені за існуючою технологією методом настоювання та нової розробленої технології методом реперколяції. ГЕ Седавіт виробляється з 5-ти видів ЛРС (кореневища з коренями валеріани, плоди глоду, трава звіробою, листя м'яти перцевої, шишки хмелю).

Для порівняльної оцінки складу екстрактів, вироблених за існуючою та новою технологіями, використовували результати визначення в екстрактах вмісту екстрактивних речовин, БАР та маркерів, кількома різними методами аналізу (спектрофотометрія, ТШХ, ГРХ та ВЕРХ). При використанні хроматографічних методів різницю в складі екстрактів оцінювали методом «відбитків пальців», тобто порівнянням наявності та співвідношення плям або піків на хроматограмах без їх детальної ідентифікації [2]. Подібними за складами вважали такі екстракти, отримані за різними технологіями, коли різниця між вмістом і співвідношенням основних компонентів екстрактів кількох різних серій, вироблених за однією технологією, не перевищувала різниці для серій, вироблених за двома різними технологіями.

Порівняльні дослідження ГЕ Седавіту, вироблених за двома технологіями, проводили за такими методиками:

Спектрофотометричне визначення суми флавоноїдів.

Вилучення суми флавоноїдів з ГЕ проводили екстрагуванням етилацетатом із попередньо прогідролізованої ацетонної витяжки. Для утворен-

ня фотометричного продукту використовували реакцію комплексоутворення вилучених агліконових флавоноїдів з алюмінію хлоридом [3]. Після відповідної пробпідготовки записували спектр випробовуваного розчину в інтервалі довжин хвиль 300-500 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, порівняно з компенсаційним розчином, який не містив алюмінію хлориду. Проводили порівняння спектрів зразків, значень довжин хвиль в максимумах та мінімумах спектрів та питомі показники поглинання у максимумах спектрів.

Вивчення складу і вмісту флавоноїдів методом ТШХ.

Вилучення флавоноїдів проводили екстрагуванням з водно-спиртової суміші етилацетатом, розчинник упарювали, сухий залишок розчиняли у метанолі. Одержаний розчин наносили на хроматографічну пластинку Silicagel F₂₅₄ розміром 20 x 20 см зі скляною підложкою з товщиною шару 0,25 мм у вигляді смуг завдовжки 10 мм і хроматографували в системі розчинників етилацетат – мурашина кислота безводна – вода (5:1:1) висхідним способом. Для проявлення пластинки використовували розчин 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру в метанолі та розчин 50 г/л макроголу 400 в метанолі. Пластинку переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм. Порівнювали R(f) характерних плям, їх забарвлення та інтенсивність [4].

Вивчення складу, вмісту і співвідношення флавоноїдів методом «відбитків пальців» за допомогою ВЕРХ.

Вилучення флавоноїдів для ВЕРХ-аналізу проводили екстрагуванням з водного розчину етилацетатом, розчинник упарювали, сухий залишок розчиняли у метанолі. Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з УФ-детектором з використанням хроматографічної

колонки С 18, рухома фаза А: 0,6 г/л натрію дигідрофосфату моногідрат, доведеного до рН 2,5 кислотою фосфорною, рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість рухомої фази – 1,0 мл / хв; детектування за довжини хвилі 220, 260, 350 нм [5]. На хроматограмах випробовуваних розчинів відзначали піки, часи утримування яких збігалися з часом утримування індивідуальних речовин рутину, гіперозиду, лютеоліну, кверцетину та апігеніну на хроматограмі розчину порівняння.

Ще один метод, який використовували для вивчення складу, вмісту і співвідношення летких компонентів (листя м'яты та коренів валеріани) – методом ГХ (парофазний аналіз) [6].

Для досліджень відібрану пробу розчиняли у воді. Зразки хроматографували на газовому хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором з використанням капілярної колонки (Crosslinked Polyethylene Glycol) в режимі програмування температур, газ-носії – гелій для хроматографії. На хроматограмах випробовуваних розчинів відзначали часи утримування характерних піків.

Результати й обговорення. Комплекс алюмінію хлориду з флавоноїдами ГЕ Седавіт в умовах вибраної пробпідготовки в диференційному спектрі мав максимум поглинання в середньому 420 нм для зразків, отриманих методом настоювання, та в середньому 418 нм – для зразків, отриманих методом реперколяції (рис.1), питомий показник поглинання становив в середньому 2,77 та 2,63 відповідно (табл.1). Різниця між максимумами поглинання та питомими показниками поглинання для зразків екстрактів, отриманих методом настоювання та реперколяції, відрізнялася несуттєво і не перевищувала різниці між визначуваними показниками в межах однієї технології.

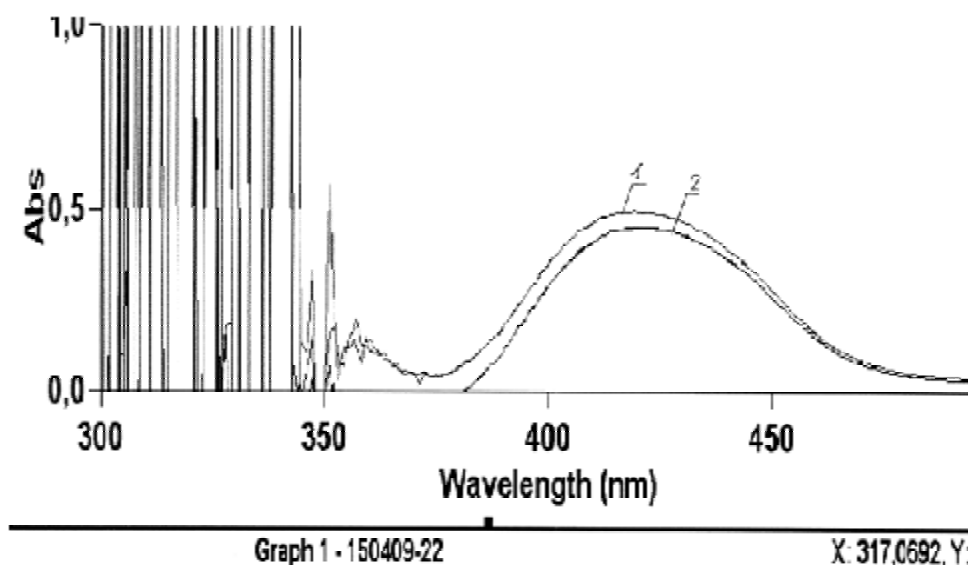


Рис. 1. Диференційні спектри поглинання: 1 – випробовуваних розчинів з алюмінію хлоридом, отриманих методом настоювання; 2 – випробовуваних розчинів з алюмінію хлоридом, отриманих методом реперколяції.

Таблиця 1. Результати спектрофотометричного аналізу густого екстракту Седавіту, виготовленого за двома різними технологіями

Серії, виготовлені методом:	Довжина хвилі, при якій спостерігається максимум	Оптична густина у максимумі	Питомий показник поглинання у максимумі
Настоювання (1)	423	0,361	2,97
Настоювання (2)	419	0,450	3,99
Настоювання (3)	419	0,155	1,36
Середнє	420	0,322	2,77
Реперколяції (4)	417	0,281	2,48
Реперколяції (5)	417	0,221	1,89
Реперколяції (6)	414	0,330	2,77
Реперколяції (7)	423	0,372	3,39
Середнє	418	0,301	2,63

На хроматограмах досліджуваних зразків (рис. 2), отриманих методом тонкошарової хроматографії (табл. 2), спостерігаються оранжево-жовті зони, що вказує на наявність сполук флавоноїдного ряду. На хроматограмах усіх зразків наявні зони зеленувато-голубої флуоресценції, що вказує на присутність у екстрактах поліфенольних сполук. На хроматограмах

зразків, отриманих за різними технологіями, спостерігається збіг основних зон, наявність додаткових зон спостерігається як у зразках, отриманих за різними технологіями, так і в межах однієї технології.

Дослідження зразків методом рідинної хроматографії (табл. 3) дозволило ідентифікувати флавоноїди *рутин*, *гіперозид*, *лютеолін*, *кверцетин* та

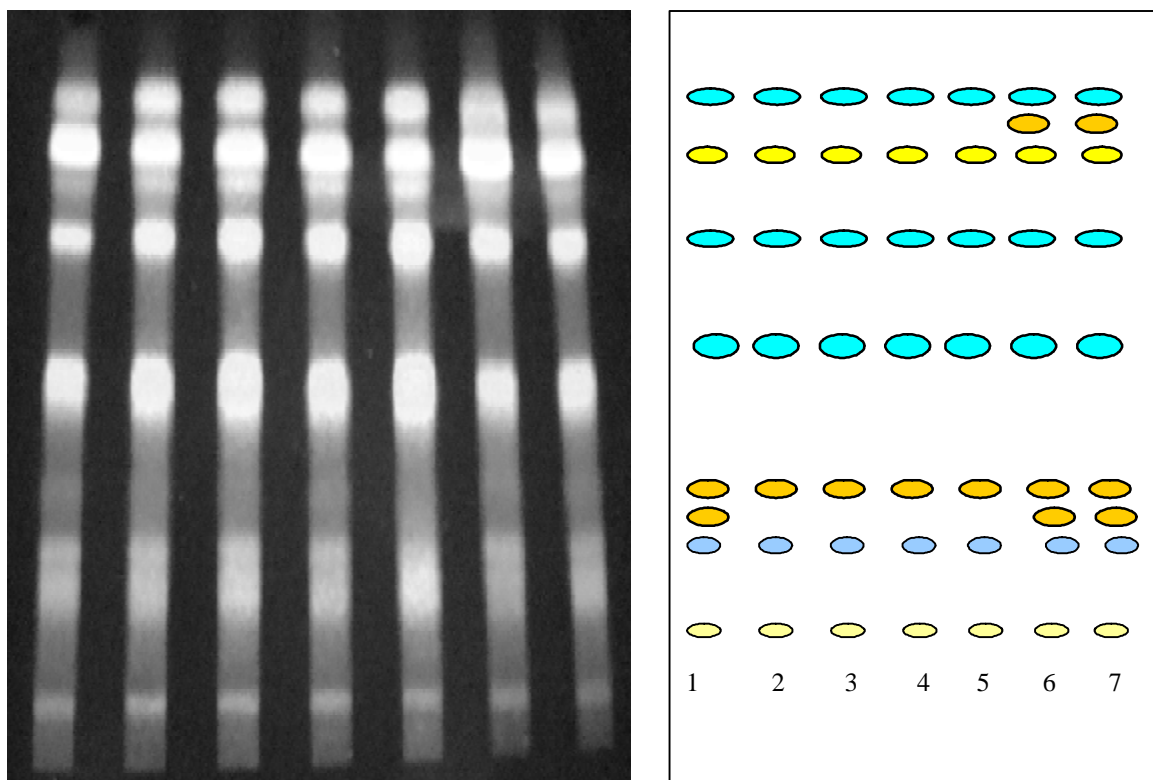


Рис. 2. Хроматограма ідентифікації поліфенольних сполук у густих екстрактах Седавіту, отриманих за двома різними технологіями з однієї сировини (зліва на право: 1–3 – хроматограми випробовуваних розчинів, отриманих методом настоювання; 4–7 – хроматограми випробовуваних розчинів, отриманих методом реперколяції).

Таблиця 2. Результати аналізу густого екстракту Седавіту, виготовленого за двома різними технологіями, отримані при хроматографічних дослідженнях методом тонкошарової хроматографії

Серії, виготовлені методом настоювання (хроматограми 1, 2, 3)						Серії, виготовлені методом реперколяції (хроматограми 4, 5, 6, 7)							
R(f)	Забарвлення плям	R(f)	Забарвлення плям	R(f)	Забарвлення плям	R(f)	Забарвлення плям	R(f)	Забарвлення плям	R(f)	Забарвлення плям	R(f)	Забарвлення плям
0,14	жовто – оранжеве	0,14	жовто – оранжеве	0,14	жовто – оранжеве	0,15	жовто – оранжеве	0,14	жовто – оранжеве	0,13	жовто – оранжеве	0,14	жовто – оранжеве
0,28	голуба флуорис.	0,30	голуба флуорис.	0,29	голуба флуорис.	0,28	голуба флуорис.	0,29	голуба флуорис.	0,27	голуба флуорис.	0,27	голуба флуорис.
0,29	оранжеве	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	оранжеве	0,29	оранжеве
0,33	оранжеве	0,33	оранжеве	0,33	оранжеве	0,33	оранжеве	0,33	оранжеве	0,33	оранжеве	0,33	оранжеве
0,53	голуба флуорис.	0,53	голуба флуорис.	0,53	голуба флуорис.	0,53	голуба флуорис.	0,53	голуба флуорис.	0,53	голуба флуорис.	0,53	голуба флуорис.
0,70	голуба флуорис.	0,71	голуба флуорис.	0,70	голуба флуорис.	0,70	голуба флуорис.	0,70	голуба флуорис.	0,70	голуба флуорис.	0,70	голуба флуорис.
0,80	жовто – оранжеве	0,80	жовто – оранжеве	0,80	жовто – оранжеве	0,81	жовто – оранжеве	0,81	жовто – оранжеве	0,79	оранжеве	0,78	оранжеве
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,82	оранжеве	0,82	оранжеве
0,86	голуба флуорис.	0,85	голуба флуорис.	0,85	голуба флуорис.	0,85	голуба флуорис.	0,85	голуба флуорис.	0,85	голуба флуорис.	0,85	голуба флуорис.

Таблиця 3. Результати аналізу густого екстракту Седавіту, виготовленого за двома різними технологіями, отримані при хроматографічних дослідженнях методом вискоєфективної рідинної хроматографії

Серії виготовлені методом	Площа піку S рутину	Площа піку S гіперозиду	Площа піку S лютеоліну	Площа піку S кверцетину	Площа піку S апігеніну
Настоювання (1)	266	354	1880	354	255
Настоювання (2)	256	464	2804	352	211
Настоювання (3)	208	495	778	831	112
Середнє	243	438	1821	512	193
Реперколяції (4)	192	862	1251	250	55
Реперколяції (5)	297	412	1774	343	210
Реперколяції (6)	300	438	1842	389	198
Реперколяції (7)	227	517	2363	652	328
Середнє	254	557	1782	402	198

апигенін шляхом порівняння часів утримування основних піків на хроматограмі досліджуваних зразків та розчину порівняння. За висотою і площею ідентифіковано піки на хроматограмах зразків (рис. 3, 4), отримані за різними технологіями, відрізняються, однак різниця між вмістом та співвідношенням основних компонентів в зразках густих екстрактів, отриманих методом

настоювання та методом реперколяції, не перевищує різниці в зразках, отриманих за однією технологією.

Дослідження зразків методом газової хроматографії дозволило порівняти склад та співвідношення летких компонентів, які присутні у густих екстрактах насамперед завдяки листю м'яти та коренів валеріани (табл. 4). На хроматограмах

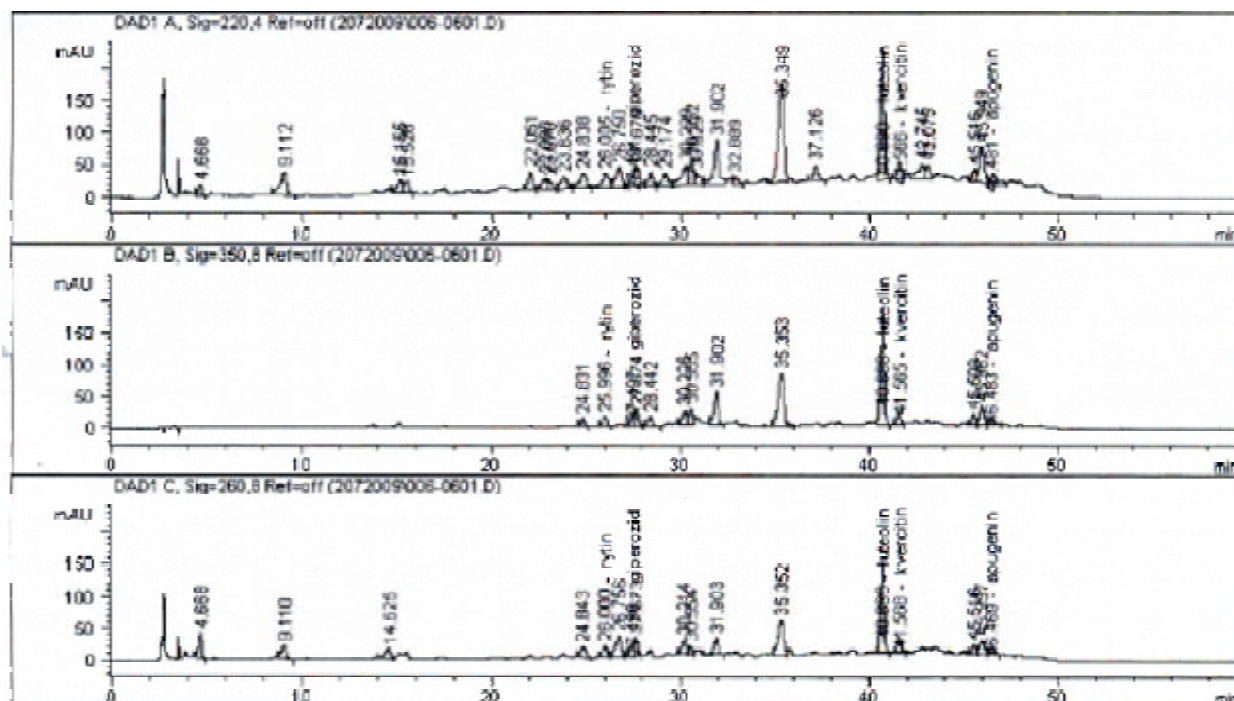


Рис. 3. Типова хроматограма випробовуваного розчину, виготовлених метод настоювання, отримана при хроматографічних дослідженнях методом вискоєфективної рідинної хроматографії при детектуванні при 220, 350 та 260 нм.

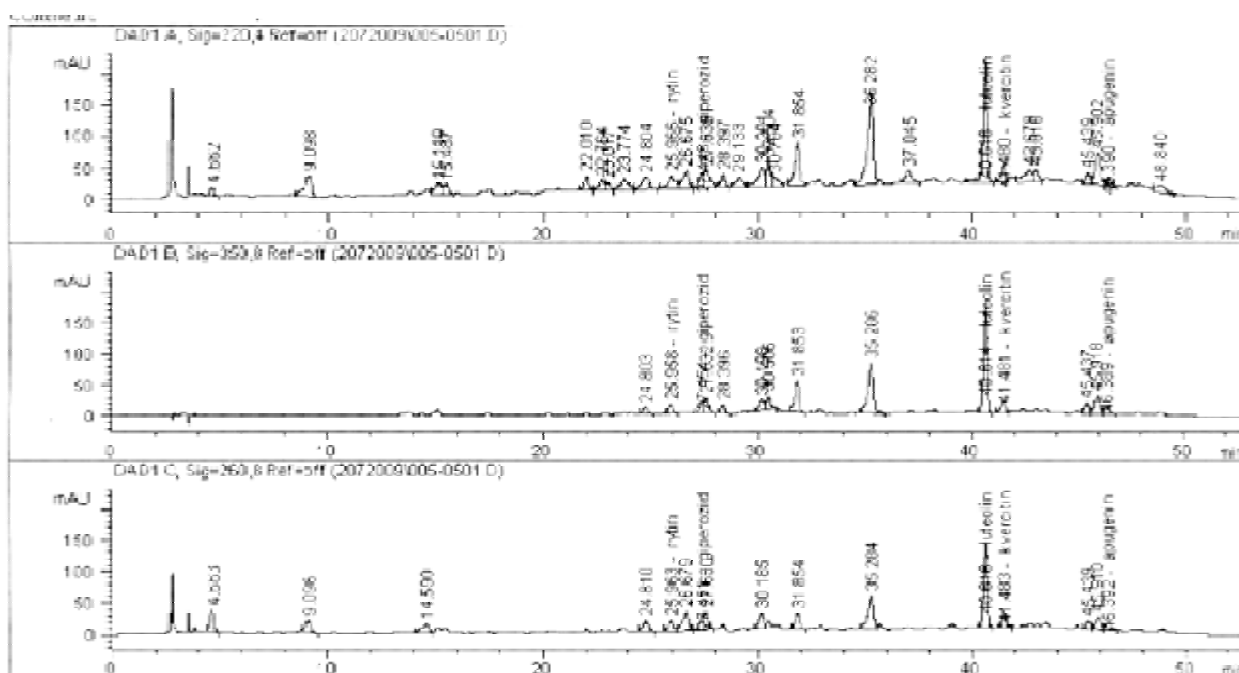


Рис. 4. Типова хроматограма випробовуваного розчину, виготовлених метод реперколяції, отримана при хроматографічних дослідженнях методом вискоєфективної рідинної хроматографії при детектуванні при 220, 350 та 260 нм.

досліджуваних зразків (рис. 5, 6) були присутні піки, часи утримування яких характерні для екстрактів, отриманих з різних технологічних схем. Площі піків основних сполук густого екстракту

Седавіту, виготовленого за двома різними технологіями дещо, відрізняються, однак їх різниця не перевищує різниці площ в межах однієї технології.

Таблиця 4. Результати аналізу густого екстракту Седавіту, виготовленого за двома різними технологіями, отримані при хроматографічних дослідженнях методом газової хроматографії

Серії виготовлені методом	Площа піку S, t- 1,52	Площа піку S, t- 1,59	Площа піку S, t- 1,7	Площа піку S, t- 6,13	Площа піку S, t- 9,12	Площа піку S, t- 11,1
Настоювання (1)	3,9	5,2	13,0	7,2	5,5	2,6
Настоювання (2)	4,5	6,1	7,3	6,8	4,6	2,4
Настоювання (3)	5,6	4,9	4,9	8,6	2,2	-
Середнє	4,7	5,4	8,4	7,5	4,1	1,7
Реперколяції (4)	5,2	5,6	5,4	9,8	2,1	2,8
Реперколяції (5)	8,6	9,0	9,5	7,6	3,3	-
Реперколяції (6)	3,7	6,3	6,6	10,0	2,0	-
Реперколяції (7)	6,1	6,1	9,7	13,3	3,3	2,5
Середнє	5,9	6,7	7,8	10,2	2,7	1,3

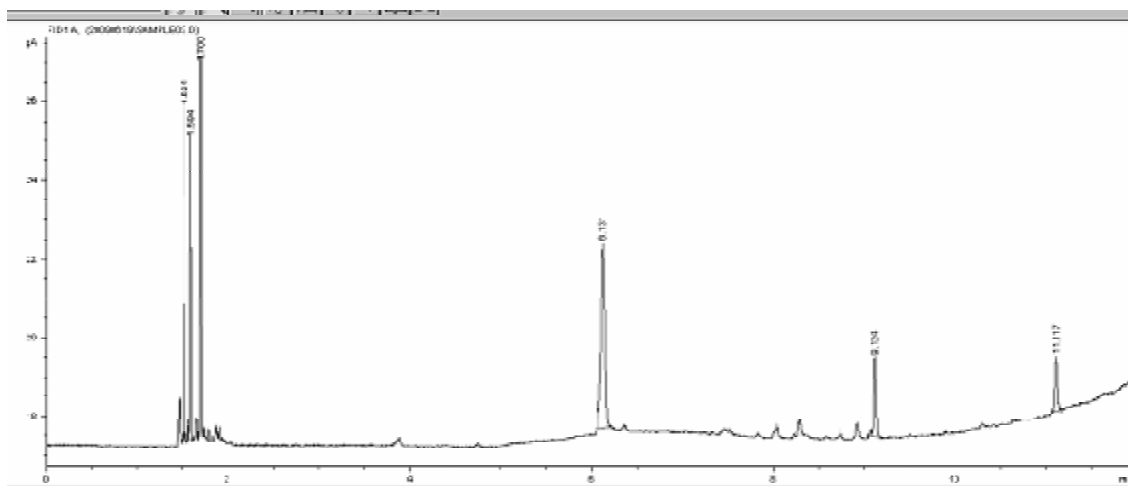


Рис. 5. Типова хроматограма випробовуваного розчину, виготовлених метод реперколяції, отримана при хроматографічних дослідженнях методом газової хроматографії.

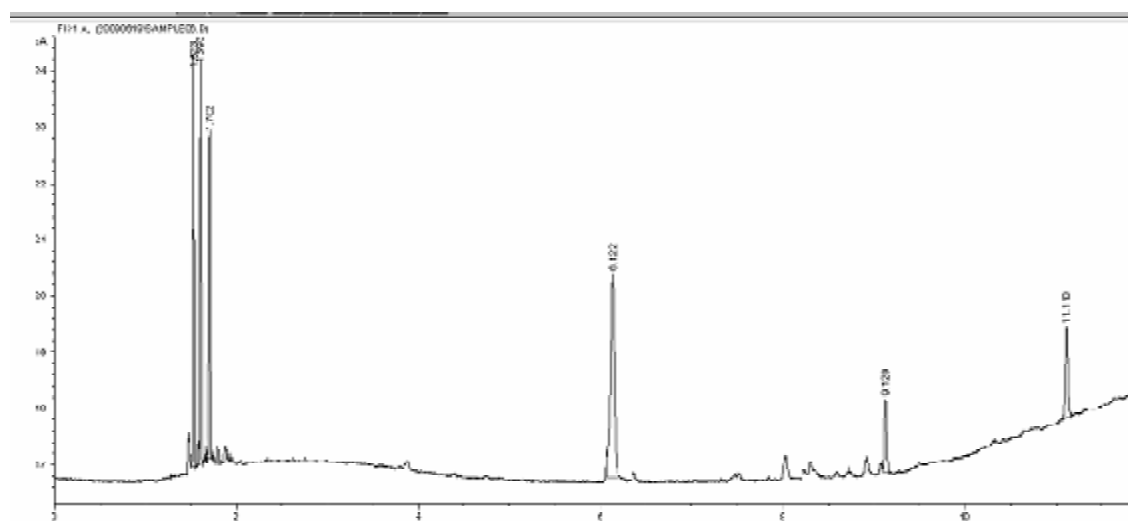


Рис. 6. Типова хроматограма випробовуваного розчину, виготовлених метод реперколяції, отримана при хроматографічних дослідженнях методом газової хроматографії.

Висновки. 1. Запропоновано методологічний підхід до проведення порівняльної оцінки хімічного складу складних рослинних екстрактів за допомогою комплексу аналітичних методів. 2. Дослідження зразків густого екстракту Седавіт, отриманих методом настоювання та методом реперколяції, проведені методами *спектрофотометрії, тонкошарової хроматографії, рідинної та*

газової хроматографії показали відсутність суттєвої різниці між складом та співвідношенням основних компонентів, оскільки різниця між складом, вмістом та співвідношенням основних компонентів в досліджених зразках, отриманих за різними технологіями, не перевищувала різниці в зразках різних серій густих екстрактів, отриманих за однією технологією.

Література

1. Сур С. В., Гриценко О. М.. Проблеми та перспективи розробки і впровадження сучасних лікарських засобів рослинного походження // Ліки України. – 2002. – № 4. – С. 47-49.
2. Сур С. В. Методологія оцінки якості рослинних лікарських засобів на підставі результатів, одержаних за допомогою сучасних аналітичних методів // Фармацевтичний журнал. – 2002. – № 6. – С. 64-71.
3. Котова Е. Е. Стандартизація плодів глоду та лікарських препаратів на їх основі за показником «Кількісне визначення» / Е. Е. Котова, А. Г. Котов, Н. П. Хованска // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 35-41
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – Доповнення 2. – 2008. – 443 с.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – Доповнення 3. – 2009. – 177 с.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – Доповнення 2. – 2008. – 383 с.

ОЦЕНКА СОСТАВА И СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ ТЕХНОЛОГИЯМИ

О. Г. Смалюх, С. В. Сур

АО “Галичфарм”,
Корпорация “Артериум”

Резюме: разработаны методологические подходы к оценке разницы состава экстрактов, изготовленных разными технологиями. Проведен выбор аналитических методов, БАВ/маркеров и критериев для оценки разницы состава экстрактов. Показано отсутствие существенной разницы в составе ГЭ Седавит, полученных двумя разными технологиями.

Ключевые слова: оценка разницы состава, флавоноиды, спектрофотометричне определения, хроматографические исследования, сравнительные исследования.

ESTIMATION OF COMPOSITION AND CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF VEGETABLE EXTRACTS PRODUCED BY DIFFERENT TECHNOLOGIES

О. Н. Smaliuh, S. V. Sur

JSC “Halychpharm”,
Corporation “Arterium”

Summary: the methodological approaches concerning the evaluation of the composition of difference between extracts produced by different technologies were developed. The choice of analytical methods, biologically active substances, markers and criteria for the evaluation of difference of the extract composition was carried out. Absence of essential difference in composition between dense extracts of Sedavit produced by two different technologies was demonstrated.

Key words: evaluation of the composition difference, flavonoids, spectrophotometric determinations, chromatographic researches, comparative researches.