СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ТИАНЕПТИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

И.И. Галькевич, Н.В. Гончарук

Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского
Львовский национальний медицинский университет имени Данила Галицкого

Резюме: изучены условия изолирования тианептина из биологического материала с помощью методов А.А. Васильевой, Стаса-Отто, В.П. Крамаренко. Показано, что метод Стаса-Отто позволяет изолировать до 10 % препарата, метод А.А. Васильевой – до 42 %, метод В.П. Крамаренко – до 25 %. Предложена эффективная методика изолирования тианептина с помощью 30 % ацетатной кислотой, которая позволяет изолировать до 63 % препарата.
Ключевые слова: тианептин, биологический материал, изолирование, очистка, обнаружение, количественное определение.

COMPARATIVE ESTIMATION OF TIANEPTINE ISOLATION METHODS FROM A BIOLOGICAL MATERIAL

I. Galkevich, N. Goncharuk

Ternopil State MedicalUuniversity by I.Y. Horbachevsky
Lviv National Medical University by D. Halytsky

Summary: The conditions of tianeptine isolation from a biological material with the help of methods by O.O. Vasilyeva, Stas-Otto, V.P. Kramarenko have been investigated. It is shown that Vasilyeva method allows isolating 42 % of tianeptine, Kramarenko method – 25 % and Stas-Otto method – about 10 %. The effective method of tianeptine isolation with the 30 % acetatis acidi has been collaborated. It allows isolating 63 % of the preparation from a biological material.
Key words: tianeptine, biological material, isolation, cleaning, discovery, quantitative determination.

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. С.М. Марчишин
УДК 613.02.041

ДО ПИТАННЯ ПРО СТАНДАРТИЗАЦІЮ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

©І.І. Тернинко, Н.В. Вітохіна, С.Ю. Штепа, О.Є. Макарова, І.Г. Пересадько

Луганський державний медичний університет
Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: проведено комплекс досліджень із визначення тотожності і доброякісності лікарської рослинної сировини (ЛРС) згідно з діючою нормативною документацією, оскільки вся лікарська рослина сировина, яка використовується для виготовлення препаратів, повинна бути стандартизована.
Ключові слова: стандартизація, доброякісність, тотожність, звіробій звичайний, нагідки лікарські, софора японська.

ВСТУП. Рослинний світ багатий і різноманітний. Протягом сторіч людство знаходило в ньому лікарську допомогу, виробляло певні навички і традиції збору цілющих трав, їх сушіння, зберігання, пізнавало їх властивості і дію на організм. Сьогодні ведеться пошук перспективних

лікарських рослин з метою розширення арсеналу фітозасобів, створення фітопрепаратів різної фармакологічної дії і розробка аналітично-нормативної документації (АНД) на сировину і препарати. Одним з напрямів досліджень сучасної медицини і фармації є фітотерапія. Серед проблем фітотерапії основне місце посідає відсутність наукових підходів до створення фітокомпозицій і методів їх стандартизації. Тому вирішення цих завдань є актуальним [9].

На етапі створення АНД на ЛРС питання раціональних підходів до стандартизації сировини є актуальним завданням. Мета роботи – проведення комплексу досліджень із визначення тотожності та доброякісності ЛРС згідно з вимогами діючої АНД (Державної Фармакопеї СРСР XI (ДФ XI), Європейської Фармакопеї (ЄФ).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами нашого дослідження обрано лікарські рослини (ЛР), що зростають на території України (як в дикому вигляді, так і культивовані), і котрі мають яскраво виражену антибактеріальну, протизапальну і ранозагоювальну активність [2, 4, 7, 8]: звіробій звичайний, нагідки лікарські та софору японську. Звіробій звичайний (Hypericum perforatum L., Hypericaceae) поширений практично на всій території нашої країни. Нагідки лікарські (Calendula officinalis L., Asteraceae) в дикорослому вигляді у нас не зустрічаються, але культивуються в спеціалізованих господарствах і на дослідних станціях, вирощуються як декоративна рослина на присадибних ділянках. Софора японська (Sophora japonica L., Fabaceae) – листопадне дерево, яке особливо часто зустрічається в Херсонській і Одеській областях та АР Крим.

Траву звіробою звичайного було зібрано на території міста Луганська, квітки календули лікарської на території Дослідної станції лікарських рослин, яка розташована у Лубенському районі Полтавської області, а плоди софори японської заготовляли в АР Крим (м. Євпаторія).

Вибір об'єктів зумовлений можливим подальшим використанням ЛРС з метою створення фітопрепаратів з антимікробною активність.

Спочатку для підтвердження тотожності ЛРС ми провели мікроскопічний аналіз об'єктів дослідження. Мікроскопію виконано за допомогою мікроскопа ЛОМА-27В і цифрової фотокамери Olympus CX-47. Проводили мікроскопічний аналіз тимчасових препаратів, виготовлених згідно з методиками, наведених в літературі [3, 9]. Мікроскопія з поверхні листка звіробою, квітки календули і плодів софори представлена на рисунку 1.

Рис. 1. Мікроскопія препаратів досліджуваних рослин з поверхні.

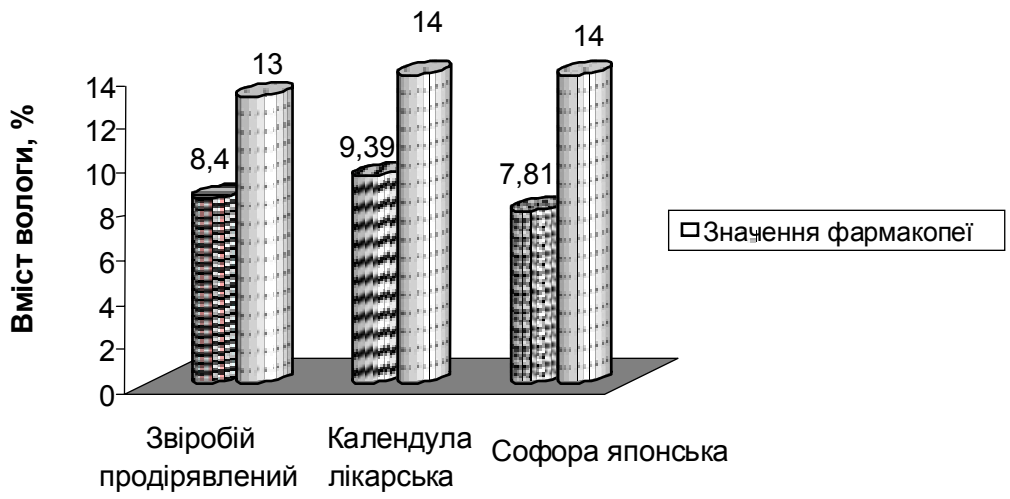
Порівнюючи одержані зразки з даними літератури [10], ми зробили висновок про тотожність досліджуваних рослин.

Для встановлення відповідності ЛРС вимогам стандартів ми провели визначення вологості, зольності, вмісту тяжких металів, а також ідентифікацію біологічно активних речовин та їх кількісне визначення.

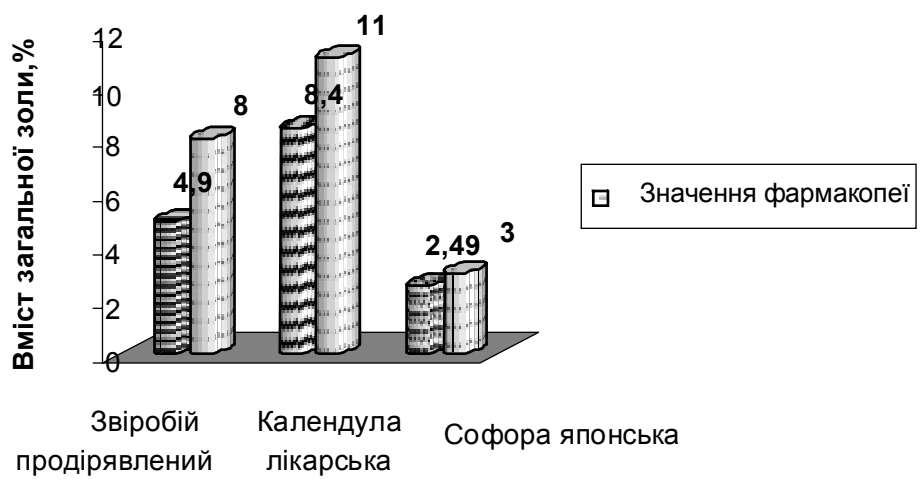
РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. ***Визначення вологості*** проводили згідно з методикою, наведеною в ДФ СРСР XI видання, шляхом висушування аналітичної проби досліджуваної сировини до сталої маси в сушильній шафі при температурі 100-105°С [3]. Одержані дані подано на діаграмі 1. Дані діаграми свідчать, що вологість у всіх досліджуваних зразках ЛРС знаходиться в межах норми за ДФ XI.

Визначення золи проводили також згідно з методикою, наведеною в ДФ СРСР XI видання [3]. Аналітичну пробу сировини поміщали у фарфорові тиглі. Сировину в тиглях обережно спалювали і прожарювали в муфельній печі при 500°С до сталої маси.

Вміст загальної золи в аналізованих об'єктах представлений на діаграмі 2. Дані свідчать, що вміст загальної золи в траві звіробою, квітках календули і плодах софори не завищений і відповідає вимогам ДФ XI.



Діаграма 1. Визначення вологості досліджуваної лікарської сировини.



Діаграма 2. Вміст загальної золи в досліджуваних об'єктах.

Для визначення ***золи нерозчинної в 10 % розчині кислоти хлоридної*** ми додавали до тиглю із загальною золою 15 мл 10 % р-ну кислоти хлоридної і прожарювали до сталої маси [3]. Результати наведені на діаграмі 3. Як видно з даних діаграми, за цим показником сировина також відповідає вимогам ДФ XI.

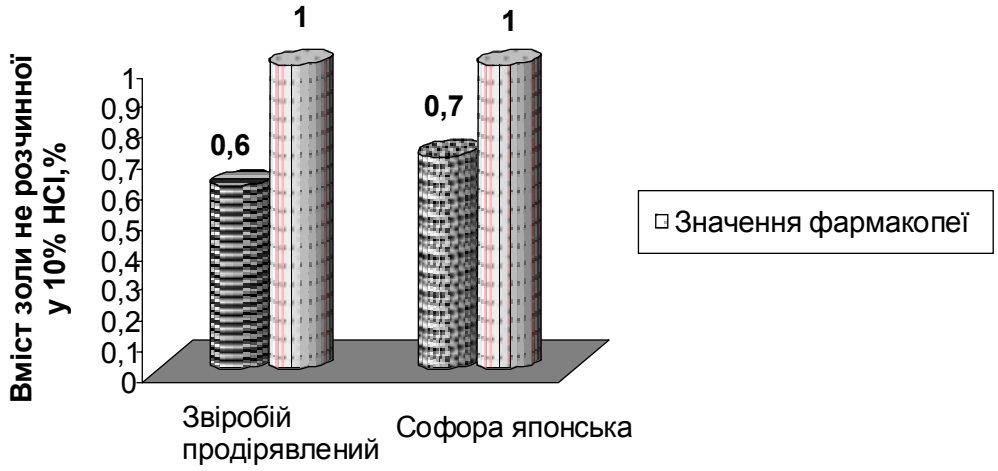
Визначення тяжких металів проводили в зольному залишку після спалювання органічних речовин ЛРС у присутності кислоти сульфатної. Потім зольний залишок обробляли розчином амоніаку ацетату, додавали натрію сульфід в оцтовокислому середовищі, що призводило до утворення сульфідів металів. Останні дають чорний осад або буре фарбування. Одержані розчини порівнювали з еталонами, в яких вміст Pb^{2+} складав 0,005-0,0005мг/мл [3].

Вміст тяжких металів в сировині не перевищив встановлені норми, про що свідчать дані таблиці 1.

Ми провели хроматографічне дослідження одержаних витяжок для ідентифікації і розділення присутніх в ЛРС біологічно активних речовин (БАВ). Для проведення хроматографічного аналізу нами було обрано три системи розчинників, рекомендованих літературою для речовин фенольного характеру [1, 6]: 1) Метанол – оцтова кислота льодяна – вода (18:1:1); 2) етилацетат –

оцтова кислота льодяна – вода (70:15:7); 3) етилацетат – метанол – ацетон – вода (50:3:3:).

За допомогою скляного капіляра наносили досліджувані витяжок з ЛРС і свідки (р-ни Державного стандартного зразка (ДСЗ) рутину і гіперозиду та їх суміш) на лінію старту хроматографічної пластинки Silufol UV_{254}. Як проявник використовували 1 % розчин хлориду алюмінію в 96 % етанолі. При цьому на рівні відповідних зразків проявлялися плями жовто-зеленого кольору з відповідною величиною Rf. Значення Rf наведено в таблиці 1.



Діаграма 3. Вміст золи, нерозчинної у 10 % хлороводневій кислоті у досліджуваних об'єктах.

Таблиця 1. *Результати аналізу вмісту тяжких металів в досліджуваній ЛРС*

Найменування лікарської рослинної сировини	Відповідність з еталонами	Вміст Pb^{2+} в 1 мл розчину
Трава звіробою продірявленого	Відповідає	<0,0005 мг
Квітки нагідок лікарських	Відповідає	<0,0005 мг
Плоди софори японської	Відповідає	= 0,0005 мг

Як видно з таблиці, перша система має значення Rf в межах 0,3-0,7, проте вона не підходить для розділення рутину і гіперозиду, оскільки в цій системі вони мають однакові значення Rf. У свою чергу, нами було встановлено, що в двох інших системах діагностовані плями з Rf, що відповідають Rf плям ДСЗ рутину і гіперозиду. Отже, дані системи підходять для розділення аналізованих БАВ. Проте найбільш оптимальне значення Rf рутину і гіперозиду були в системі етилацетат-оцтова кислота льодяна-вода (70:15:7), тому вона може бути системою вибору для ТШХ-аналізу ЛРС, що містить рутин і гіперозид.

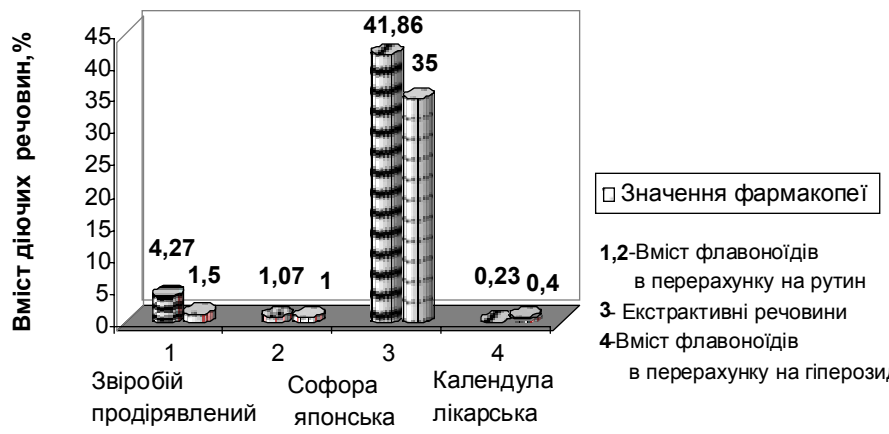
Подальшим етапом нашої роботи було кількісне визначення вмісту діючих речовин в досліджуваній сировині.

Кількісне визначення флавоноїдів в перерахунку на рутин в траві звіробою плямистого і плодах софори японської проводили за методикою, наведеною в ДФ XI. Суть методики полягає в екстракції сировини 50 % етанолом, з подальшим утворенням забарвлених комплексів з розчином алюмінію хлориду і вимірюванням оптичної густини при λ= 415нм у присутності ДСЗ рутину [3]. Результати приведені на діаграмі 4.

Стандартизація квіток нагідок лікарських, згідно з ДФ XI, проводиться за вмістом екстрактних речовин [3]. Тоді, як ЄФ регламентує визначати в ЛРС вміст флавоноїдів в перерахунку на гіперозид, що є більш показовим [10]. Ми провели аналіз квіток календули за двома методиками. Результати визначення екстрактних речовин приведені на діаграмі 4.

Методика визначення флавоноїдів за ЄФ полягала в проведенні кислотного гідролізу сировини в середовищі ацетону, з наступною екстракцією етилацетатом. З етилацетатним екстрактом проводили реакцію з розчином хлориду алюмінію, одержуючи забарвлені комплекси. Вимірювали оптичну густину при λ = 425 нм. Отримані результати приведені на діаграмі 4. Дані діаграми 4 і таблиці 2 свідчать, що досліджувана сировина за вмістом екстрактних речовин відповідає вимогам ДФXI і не відповідає вимогам ЄФ за змістом флавоноїдів в перерахунку на гіперозид.

Дані хроматографічного аналізу також говорять про те, що у витяжці з квіток нагідок гіперозид ідентифікований не був. Тому питання про стандартизацію даної сировини є відкритим [5].



Діаграма 4. Діаграма кількісного вмісту діючих речовин в досліджуваних об'єктах.

Таблиця 2. *Результати хроматографічного аналізу витягів з ЛРС*

Досліджуване витягнення	Система розчинників		
	1	2	3
	Значення Rf		
Трави звіробою продірявленого	0,73	0,5; 0,65	0,11; 0,3
Квітки календули лікарської	0,7	0,34; 0,53	0,14
Софора японська	0,79	0,5	0,12
Суміші сировини (1:1:1)	0,7	0,48	0,1; 0,3
Р-н рутину ДСЗ	0,65	0,5	0,12
Р-н гіперозиду ДСЗ	0,6	0,69	0,3
Суміш рутину і гіперозиду (ДСЗ)	0,7	0,5; 0,69	0,12; 0,3

***Примітка*:** 1.) метанол – оцтова кислота льодяна – вода (18:1:1); 2) етилацетат – оцтова кислота льодяна – вода (70:15:7); 3) етилацетат – метанол – ацетон – вода (50:3:3:).

ВИСНОВКИ. Таким чином, в результаті наших досліджень ми можемо зробити висновок про добру якість лікарської рослинної сировини, згідно з діючою нормативною аналітичною документацією і про можливість його подальшого використання в медичних цілях.

Література

1. Бушкова М.Н., Вайсман Г.А., Рапапорт Л.И. и др. Анализ лекарств в условиях аптеки. – 2-е изд. – К.: Здоров'я, 1975. – 407 с.
2. Гаммерман А.Ф. Лекарственные растения (растения-целители): Справ. пособие/ А.Ф. Гаммерман, Г.Н. Кадаев, А.А. Яцена и др. - 4-е изд., испр. и доп. – М.:Высш. шк., 1990. – 544 с.
3. Государственная фармакопея СССР. – Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР.-11-е изд., доп. –М.: Медицина, 1989. – 400 с.
4. Задорожный А.М., Кошкин А.Г.,Соколов С.Я. и др. Справочник по лекарственным растениям. – М.: Лесн. промышленность,1988. – 415 с.
5. Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М. и др. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии "Ноготков цветки" // Фармаком – 2005. – Том 2, № 3. – С. 128-131.
6. Краснов Е.А., Березовская Т.П., Алексеюк Н.В. и др. Справочник лекарственных растений. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1987. – 184 с.
7. Носаль М.А., Носаль И.М. Лекарственные растения в народной медицине. – М.:СП "Внешиберика", 1991. – 256 с.
8. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия) – 3-е изд. – М.: Металлургия,1989. – 428 с.
9. Солодовниченко Н.М., Журавлев М.С., Ковальов В.М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: Посіб. з фармакогнозіїї з основами біохімії лік. рослин.–Х.: Вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. – 408 с.
10. Фармакогнозия. Атлас: Учеб. пособие / Под. ред. Н.И. Гринкевич, Е. Я. Ладыгиной. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
11. European Pharmacopoeia – 4th ed. – Strasburg: Council of Europe, 2002. – 2416 p.

К ВОПРОСУ О СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

И.И. Тернинко, Н.В. Витохина, С.Ю. Штепа, О.Е. Макарова, И.Г. Пересадько

Луганский государственный медицинский университет
Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: проведен комплекс исследований по определению идентичности и доброкачественности лекарственного растительного сырья (ЛРС) согласно действующей аналитической нормативной документации, так как все ЛРС, которое используются для приготовления лекарственных препаратов, должно быть стандартизировано.
Ключевые слова: стандартизация, доброкачественность, идентификация, зверобой продырявленный, календула лекарственная, софора японская.

TO THE QUESTION ABOUT STANDARDIZATION OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL

I.I. Ternynko, N.V. Vitokhina, S.Y. Shtepa, O.E. Makarova, I.G. Peresadko

Luhansk State Medical University
National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: the complex of researches on determination of identity and high quality of medicinal plant raw material according to operating analytical normative document was conducted, because all medicinal plant raw material which is used for manufacturing of medicinal preparations must be standardized.
Key words: standardization, high quality, authentication, Common St. John's-wort, Marigold, Japanese pagoda tree.