Рекомендована д.ф.н., професором В.М.Ковальовим

УДК 615.32:615.453.3:543.544

ХРОМАТОГРАФІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГРАНУЛ НА ОСНОВІ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ

С.В.Спиридонов, А.Г.Котов

Національний фармацевтичний університет
Державне підприємство «Фармакопейний центр України»

З метою розробки методик контролю якості препарату у вигляді гранул під умовною назвою «ШКТ-2» для лікування захворювань органів травлення проведені дослідження з ідентифікації біологічно активних сполук ЛРС, що входять до його складу.

Захворювання органів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на сьогоднішній день мають тенденцію до збільшення, чому сприяє різноманіття негативних факторів: недоброякісна їжа, нерегулярне харчування, стресові стани тощо. Найчастіше в патогенез даних захворювань включені органи гепатобіліарної системи, що вимагає як комплексного підходу до їх лікування, так і створення комплексних препаратів [7].

Важливою умовою успішної терапії є застосування препаратів на основі нативної лікарської рослинної сировини (ЛРС), асортимент яких на ринку України недостатній і потребує розширення.

У зв'язку з цим нами був розроблений препарат на основі ЛРС у вигляді гранул під умовною назвою «ШКТ-2», який містить у своєму складі календули квітки, солодки корені, кропиви листя, валеріани кореневища, шипшини плоди, ромашки квітки, гіркокаштану насіння і висівки пшеничні.

Розробка методик ідентифікації для подальшого їх внесення в нормативну документацію є найважливішим етапом у процесі створення препарату, що і стало метою даної роботи.

Дослідження проводилося за допомогою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Експериментальна частина

Дослідження проводили за допомогою методу ТШХ висхідним способом на пластинках «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» та використовували методики, наведені в монографіях фармакопей [1-3], а також у довідкових виданнях [4, 6]. Детектування проводили в денному, УФ-світлі (λ = 365, 254 нм) до і після обробки хроматограм розчинами проявників.

Випробовувані розчини (спиртові розчини календули квітків, кропиви листя, валеріани кореневищ, солодки коренів, гіркокаштану насіння) і розчини порівняння (спиртові розчини рутину, есцину, флуоресцеїну, кислот: гліциретинової, кавової і хлорогенової) готували, як зазначено у відповідних монографіях або статтях на ЛРС.

Ідентифікація нагідок квіток та кропиви листя (рис. 1) була проведена за методиками ДФУ [2, 5]. На хроматограмі випробуваного розчину нагідок квіток, розчинів порівняння та розчину препарату виявляються наступні зони (в УФ світлі, λ = 365 нм): жовтаво-коричневі флюоресціюючі (поз. 1, 22) на рівні жовто-коричневої зони рутину (поз. 14), вище за неї – жовтаво-зелені флюоресціюючі (поз. 2, 21), а також блакитні флюоресціюючі (поз. 3, 20), відповідні зоні кислоти хлорогенової (поз. 13). Нижче блакитної флюоресціюючої зони, що відповідає кислоті кофейній на хроматограмі розчину порівняння (поз. 12), виявляються блакитні (поз. 5, 17) та жовтаво-зелені (поз. 4, 18) флюоресціюючі зони.

У нижній частині хроматограми розчину кропиви листя та розчину препарату (в УФ світлі, λ = 365 нм) виявляються коричневато-жовті зони (поз. 10, 23), вище виявляються блакитні флуоресціюючі зони (поз. 9, 20), які відповідають кислоті хлорогеновій на хроматограмі розчинів порівняння (поз. 13), у середній частині хроматограми виявляються сині флуоресціюючі зони (поз. 8, 19). У верхній частині виявляються також сині флуоресціюючі зони (поз. 7, 16), які відповідають синій флуоресціюючій зоні скополетину (поз. 11). Дещо вище виявляються дві червоні зони (поз. 6, 15). Таке розташування зон узгоджується з вимогами відповідних монографій ДФУ та підтверджує можливість ідентифікації нагідок квіток та кропиви листя у досліджуваному препараті.

Ідентифікація ромашки квіток (рис. 2) у складі препарату була проведена за методиками ДФУ [2]. У нижній частині на хроматограмі випробуваного розчину та розчину препарату виявляються зони синювато-фіолетового забарвлення (поз. 4, 9), вище за них розташовані коричневі зони (поз. 3, 8). У верхній частині на рівні червонувато-фіолетової зони, що відповідає зоні хамазулену на хроматограмі розчину порівняння (поз. 5), виявляються ідентичні зони розчину ромашки та препарату (поз. 2, 7). Дещо вище виявляються зони синювато-фіолетового кольору (поз. 1, 6). Це узгоджується з вимогами ДФУ та дає можливість підтвердження наявності ромашки квіток у досліджуваному препараті.

За методиками ДФУ [1] також визначали наявність валеріани коренів у складі препарату (рис. 3).

У нижній частині хроматограми випробуваного розчину та розчину препарату виявляються фіоле-

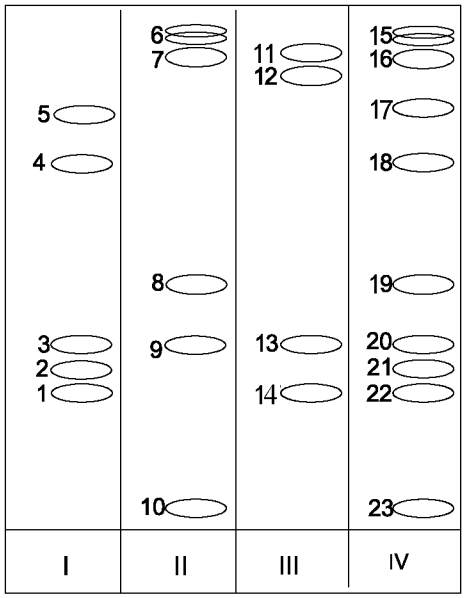

Рис. 1. ТШХ ідентифікація нагідок квіток та кропиви листя за наявністю фенольних сполук у складі гранул «ШКТ-2». Випробувані розчини: нагідок квіток (I), кропиви листя (II); розчини порівняння (III), розчин препарату (IV). Пояснення у тексті.

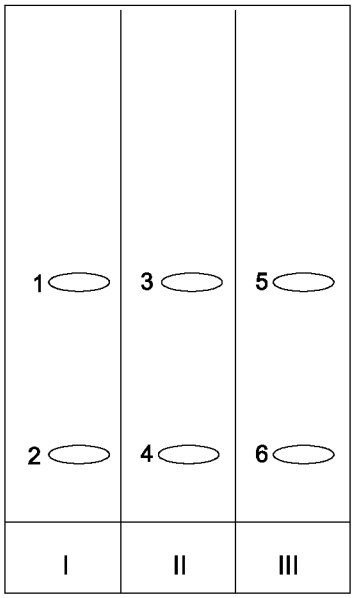

Рис. 3. ТШХ ідентифікація валеріани коренів у складі гранул «ШКТ-2». Випробуваний розчин валеріани коренів (I); розчини порівняння (II), розчин препарату (III). Пояснення у тексті.

тово-сині зони (поз. 2, 6) на рівні зеленувато-жовтої зони флуоресцеїну (поз. 4) на хроматограмі розчину порівняння. В середній частині хроматограми на рівні червоної зони судану червоного G (поз. 3) виявляються фіолетові зони (поз. 1, 5), що підтверджує ідентифікацію валеріани коренів у складі препарату.

Для визначення наявності солодки коренів та гіркокаштану насіння у складі гранул «ШКТ-2» використовували відомий спосіб ідентифікації сапонінів за допомогою 20% розчину кислоти фосфорновольфрамової в етанолі в якості проявника [4, 6, 9, 11, 13]. Розчинами порівняння для солодки коренів та гіркокаштану насіння були спиртові розчини гліцираму та есцину відповідно. Рухомою фазою була верхня фаза суміші: кислота оцтова (98%) Р – вода дистильована – 1-бутанол Р у співвідношенні 10:40:50. Обприскану проявником та висушену хроматограму переглядали у денному світлі (рис. 4).

У нижній частині поблизу лінії старту на хроматограмі випробуваного розчину гіркокаштану насіння виявляється синьо-фіолетова зона (поз. 1) на рівні розчину порівняння есцину (поз. 4). Така ж зона виявляється і на хроматограмі розчину препарату (поз. 6).

На хроматограмі випробуваного розчину солодки коренів дещо вище за зону есцину виявляється зона жовто-коричневого забарвлення (поз. 2), яка знаходиться на одному рівні з ідентичними зонами розчину порівняння (поз. 3) та розчину препарату (поз. 5). Таке розташування зон підтверджує наявність насіння гіркокаштану та солодки коренів у складі препарату.

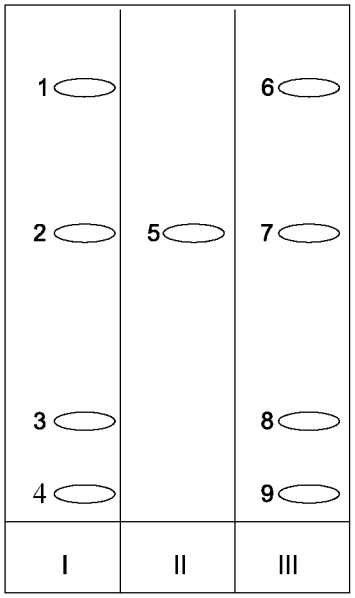

Рис. 2. ТШХ ідентифікація ромашки квіток у складі гранул «ШКТ-2». Випробуваний розчин ромашки квіток (I); розчин порівняння (II), розчин препарату (III). Пояснення у тексті.

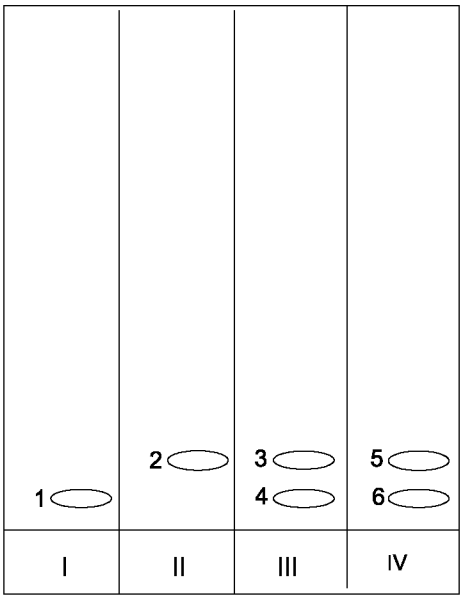

Рис. 4. ТШХ ідентифікація солодки коренів та гіркокаштану насіння у складі гранул «ШКТ-2». Випробувані розчини: гіркокаштану насіння (I), солодки коренів (II); розчини порівняння (III), розчин препарату (IV). Пояснення у тексті.

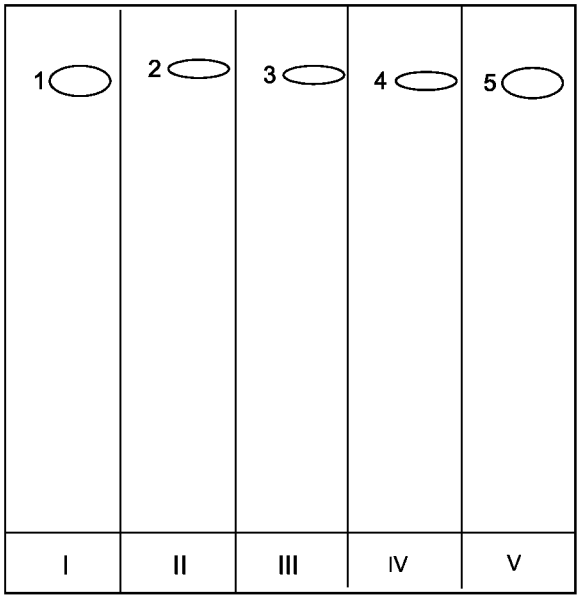

Рис. 5. ТШХ ідентифікація насіння шипшини у складі гранул «ШКТ-2». Випробуваний розчин шипшини насіння (I), розчини порівняння: пірогалол (II), галова кислота (III), катехін (IV); розчин препарату (V). Пояснення у тексті.

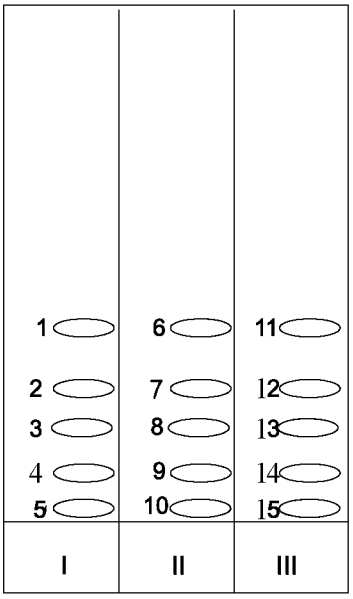

Рис. 6. ТШХ ідентифікація висівок пшеничних у складі гранул «ШКТ-2». Випробуваний розчин висівок пшеничних (I); розчини порівняння (II), розчин препарату (III). Пояснення у тексті

Деякі літературні джерела пропонують ідентифікацію плодів шипшини за наявністю кислоти аскорбінової. Дана речовина є нестійкою та її накопичення в такому виді ЛРС носить сезонний та географічний характер. У зв'язку з цим нами було запропоновано провести ідентифікацію за наявністю речовин поліфенольної природи (групи флаванану), які також присутні в плодах шипшини [10, 16].

Випробуваний розчин та розчин препарату готували наступним чином: до 1,0 г порошку насіння або гранул додавали 10 мл води дистильованої, струшували протягом 10 хв і фільтрували. Фільтрат струшували з двома порціями по 10 мл етилацетату, верхні шари фільтрували над 6 г натрію сульфату безводного. Фільтрат упарювали насухо, після чого одержаний залишок розчиняли в 1,0 мл етилацетату. Як розчини порівняння використовували розчини катехіну, пірогалолу та галової кислоти.

Отримані розчини наносили на лінію старту смугами в об'ємі 20 мкл і поміщали в систему розчинників: кислота оцтова льодяна Р – ефір Р – гексан Р – етилацетат Р (у співвідношенні 20:20:20:40). Після досягнення фронтом розчинників відстані 10 см пластину виймали з камери, висушували на повітрі і обприскували розчином міцного синього В, солі Р і витримували у парах аміаку. Переглядали у денному світлі.

На рис. 5 у верхній частині хроматограми на одному рівні виявляються як зони випробуваного розчину темно-фіолетового забарвлення (поз. 1), зони розчинів порівняння пірогалолу (поз. 2) синьо-фіолетового забарвлення, кислоти галової (поз. 3) темно-бордового забарвлення, катехіну (поз. 4) червонувато-коричневого забарвлення, так і зони розчину препарату (поз. 5) темно-фіолетового забарвлення. Таке розташування зон підтверджує факт наявності насіння шипшини у складі препарату.

Враховуючи відсутність нормативної документації на висівки пшеничні, ми проводили їх ідентифікацію за наявністю амінокислот [8, 12, 14, 15, 16]. Для приготування випробуваного розчину та розчину препарату готували метанольні витяжки з висівок пшеничних та гранул препарату при температурі 60°С впродовж 40 хв, охолоджували їх та фільтрували. Розчинами порівняння були спиртові розчини аланіну, лейцину, аргініну, валіну, кислоти аспарагінової.

Отримані розчини у кількості 10 мкл поміщали в систему розчинників: кислота оцтова (98%) Р – вода дистильована – 1-бутанол Р у співвідношенні 10:40:50 (верхня фаза). Після досягнення фронтом розчинників відстані 10 см пластину виймали з камери, висушували на повітрі та проявляли 2% розчином нінгідрину в етанолі. Амінокислотний комплекс ідентифікували по виявленню зон амінокислот, забарвлених у фіолетово-червоний колір.

На рис. 6 в середній частині хроматограми на одному рівні чітко виявляються зони випробуваного розчину, що відповідають зонам розчинів порівняння та розчину препарату: фіолетові зони 1 і 6 відповідають зоні лейцину 11, фіолетові зони 2 і 7 – зоні валіну 12, фіолетово-червоні зони 3 і 8 – зоні аланіну 13, світло-фіолетові зони 4 і 9 – зоні кислоти аспарагінової 14, блідо-фіолетові зони 5 і 10 поблизу лінії старту – зоні аргініну 15. Вищезазначене розташування зон підтверджує наявність висівок пшеничних у складі препарату.

ВИСНОВКИ

1. Методом тонкошарової хроматографії проведені дослідження з ідентифікації деяких характерних біологічно активних сполук ЛРС, які входять до складу препарату у вигляді гранул під умовною назвою «ШКТ-2».

2. Отримані дані можуть бути використані при розробці методик контролю якості на даний препарат.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доп. 2. – Х.: РІРЕГ, 2008. – 620 с.*
2. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доп. 3. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.*
3. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доп. 4. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.*
4. *Краснов Е.А., Березовская Т.П., Алексеюк Н.В. и др. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1987. – 184 с.*
5. *Солодовниченко Н.М., Журавльов М.С., Ковальов В.М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: Посіб. – Х.: Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2001. – 408 с.*
6. *Філіпов Ю.О. Динаміка поширеності і захворюваності на основні хвороби органів травлення в Україні за 10 останніх років / Ю.О.Філіпов / У кн.: Гастроентерологія. – Дніпропетровськ: Журфонд, 2008. – Вип. 40. – С. 3-10.*
7. *Butt M.S., Qamar M.I., Anjum F.M. et al. // Internet J. of Food Safety. – 2004. – Vol. 3. – P. 15-20.*
8. *Costantini A. // Il Farmaco. – 1999. – Vol. 54. – P. 728-732.*
9. *Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. – Edinburgh.: Churchill Livingstone; Elsevier, 2012. – 336 p.*
10. *Hostettmann K., Marston A. Saponins. – Cambrige: Cambrige University Press, 1995. – 548 p.*
11. *Kew M.C., Kwang S.C., Bong D.H. et al. // J. Asian-Aust. Anim. Sci. – 2005. – Vol. 18, №6. – P. 861-867.*
12. *Moerman D.E. Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. – Portland.: Timber press, 2009. – 800 p.*
13. *Nadeem M.A., Gilani A.H., Khan and Mahr-Un-Nisa A.G. // Int. J. Agricol. Biol. – 2005. – Vol. 7, №6. – P. 985-989.*
14. *Ribeiro F.B., Lanna E.A., Bomfim M.A. et al. // R. Bras. Zootech. – 2011. – Vol. 40, №5. – P. 939-946.*
15. *Steele E. Determination of the generally recognized as safe (gras) status of wheat bran extract as a food ingredient. – Belgium.: Fugeia NV, 2010. – 120 p.*
16. *Trease and Evans' Pharmacognosy. – 16th ed. Evans W. – Edinburgh.: Saunders; Elsevier, 2009. – 616 p.*

УДК 615.32:615.453.3:543.544

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРАНУЛ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

С.В.Спиридонов, А.Г.Котов

С целью разработки методик контроля качества препарата в виде гранул под условным названием «ЖКТ-2» для лечения заболеваний органов пищеварения проведены исследования по идентификации некоторых характерных биологически активных соединений ЛРС, входящих в его состав.

UDC 615.32:615.453.3:543.544

CHROMATOGRAPHIC RESEARCH OF GRANULES FROM MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL FOR TREATMENT OF GASTROINTESTINAL DISEASES

S.V.Spiridonov, A.G.Kotov

In order to develop methods of quality control of the medicine in the form of granules under the conditional name «GIT-2» for treatment of gastrointestinal diseases the research in identification of some characteristic biologically active substances in the plant raw material contained in the composition of the medicine has been carried out.