УДК 615.076.8: 633.31: 615.45: 615.322

С. В. Ковальов, А. І. Ткаченко*, М. О. Меркулов*, С. В. Романова

Національний фармацевтичний університет

** ПП «Науково-лікувальний фітоцентр «Авіценна»*

ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ

Розроблені методики кількісного визначення фенольних сполук у сухому і густому екстрактах, таблетках і свічках, отриманих із трави люцерни посівної. Кількісний вміст фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту у сухому і густому екстрактах повинен бути не менше 9,00 %, у таблетках і свічках — від 0,0089 до 0,0095 г.

Ключові слова: люцерна посівна; фенольні сполуки; сухий, густий екстракт; таблетки; свічки

ВСТУП

У продовження досліджень біологічно активних сполук рослин роду люцерна та розробки на їх основі субстанцій та лікарських форм у даній роботі наведені результати кількісного вмісту фенольних сполук у сухому та густому екстрактах («Альфальфін» — екстракт люцерни густий, ТУУ 15.8-31234777-018-2004), Альфальфін-таблетки (ТУУ 15.8.31234777.021:2005) та Альфальфін-свічки (виробник ПП «Науково-лікувальний фітоцентр «Авіценна»).

Проведені раніше дослідження трави люцерни посівної показали наявність таких груп фенольних сполук, як гідроксикоричні кислоти, кумарини, еуфлавоноїди, ізофлавоноїди, дубильні речовини конденсованої групи. З фенольного комплексу виділено 9 речовин флавоноїдної природи, таких як похідні 2-(3)-феніл-γ-хромону, а саме кемпферол, кверцетин, апігенін, лютеолін, хризоеріол, даїдзеїн, формононетин, геністеїн, біоханін А [3].

Із трави люцерни посівної виділені флавоноїдні глікозиди — похідні апігеніну, лютеоліну, трицину, 3'-О-метилтрицетину та хризоеріолу. Вони представлені, головним чином, моно-, бі- та тріозидами глюкуронової кислоти, які іноді естерифіковані по цукровому компоненту феруловою, п-кумаровою та синаповою кислотами [7–9].

Кількісний вміст фенольних сполук у траві люцерни посівної складає: гідроксикоричних кислот — 1,37±0,03 %, флавоноїдів — 0,71±0,03 %, фенольних сполук — 1,41±0,05 % [6].

Також відомо, що люцерна є однією з найбільш багатих на амінокислоти та мінеральні сполуки рослин. Макро- та мікроелементи в люцерні перебувають у добре збалансованому стані, що полегшує їх засвоєння. Вперше досліджено 10 видів та сортів трави люцерни на наявність в них амінокислот та макро- і мікроелементів. Встановлена наявність 16 амінокислот, у тому числі 9 незамінних. У досліджуваних зразках ідентифіковано 19 макро- та мікроелементів, з яких домінують Ca, K, Mg, P та Na [4].

Проведено хімічне дослідження ліпофільної фракції трави люцерни посівної. Визначено кількісний вміст ліпофільної фракції, який склав 7,5 %. Встановлена наявність каротиноїдів та хлорофілів. Визначено жирнокислотний склад 13 жирних кислот, з яких у кількісному відношенні переважають пальмітинова (34,25 %), лінолева (15,11 %) та α-ліноленова (17,93 %) кислоти [5].

З метою вивчення фармакологічної дії фенольного комплексу трави люцерни був отриманий сухий екстракт трави люцерни посівної (ЕТЛП), досліджена його гостра токсичність та встановлено наявність анаболізуючої дії [2, 3].

Отриманий сухий екстракт являє собою порошок від світло-брунатного до темно-брунатного кольору з приємним специфічним запахом, гірким смаком, добре розчинний у воді, водних розчинах спирту, погано розчинний в етанолі, нерозчинний в органічних розчинниках, ефірі, хлороформі, бензолі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

З метою об'єктивної стандартизації лікарських форм з трави люцерни посівної для кількісного визначення вмісту фенольних сполук був використаний метод спектрофотометрії в УФ-області. В УФ-спектрі лікарських форм

© *С. В. Ковальов, А. І. Ткаченко, М. О. Меркулов, С. В. Романова, 2009*

відмічається максимум поглинання фенольних сполук в області 270–272 нм. Цей максимум ми використали при розробці методик визначення кількісного вмісту фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту [1], спектри поглинання яких співпадають (рис).

Кількісне визначення фенольних сполук у сухому екстракті люцерни посівної. Сухой екстракт (0,100 г) вміщували в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли в 70 % спирті та доводили об'єм розчину тим самим спиртом до позначки (розчин А). Розчин А (1 мл) вміщували в мірну колбу на 25 мл, розчиняли в 70 % спирті та доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки. Через 15 хв вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 270 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Кількісний вміст фенольних сполук розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot m \cdot 1} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25}{A_0 \cdot m},$$

де: A — оптична густина випробуваного розчину;

A_0 — оптична густина розчину ФСЗ ДФУ галової кислоти;

m — маса сухого екстракту, г;

m_0 — наважка ФСЗ ДФУ галової кислоти, г.

Результати визначення наведені у табл. 1.

Кількісне визначення фенольних сполук у густому екстракті люцерни посівної «Альфальфін». Густий екстракт (0,100 г) вміщували в мірну колбу на 50 мл, розчиняли в 70 % спирті та доводили об'єм розчину тим самим спиртом до позначки (розчин А). Розчин А (1 мл) вміщували в мірну колбу на 25 мл, розчиняли в 70 % спирті та доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки. Через 15 хв вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 270 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Кількісний вміст фенольних сполук розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot m \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де: A — оптична густина випробуваного розчину;

A_0 — оптична густина розчину ФСЗ ДФУ галової кислоти;

m — маса густого екстракту, г;

m_0 — наважка ФСЗ ДФУ галової кислоти, г;

W — втрата в масі при висушуванні, %.

Результати визначення наведені у табл. 1.

Кількісне визначення фенольних сполук у таблетках «Альфальфін». Кількісний вміст суми фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом за наступною методикою [1].

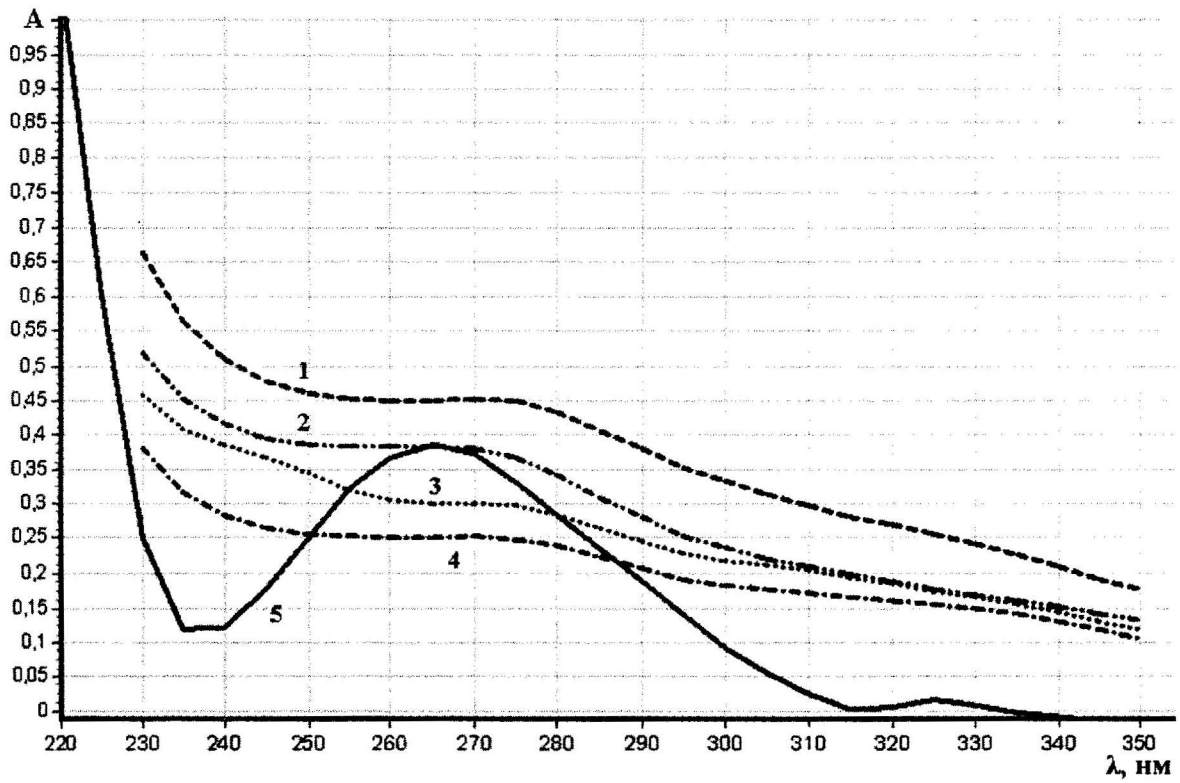

***Рис.** Спектри поглинання фенольних сполук лікарських форм із люцерни посівної (1 — «Альфальфін»–густий екстракт, 2 — сухий екстракт люцерни посівної, 3 — «Альфальфін»–таблетки, 4 — «Альфальфін»–свічки, 5 — галова кислота).*

Відповідно до ТУ маса таблетки — 0,5 г, маса сухого екстракту трави люцерни посівної — 0,1 г. Для визначення кількісного вмісту фенольних сполук розтирали в ступці 10 таблеток, брали 0,500 г, вміщували в мірну колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл 70 % спирту, нагрівали на водяній бані протягом 10 хв (до повного розчинення наважки), охолоджували та доводили 70 % спиртом до позначки (розчин А). Розчин А (5 мл) вміщували в мірну колбу на 10 мл та доводили 70 % спиртом до позначки. Через 15 хв вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 270 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Кількісний вміст фенольних сполук у 1 таблетці (X) розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot \overline{m}}{A_0 \cdot m \cdot 25},$$

де: A — оптична густина випробуваного розчину;

A_0 — оптична густина розчину ФСЗ ДФУ галової кислоти;

m — наважка розтертих таблеток, г;

m_0 — наважка ФСЗ ДФУ галової кислоти, г;

$\overline{m}$ — середня маса однієї таблетки, г.

Вміст фенольних сполук у 1 таблетці повинен бути у межах від 0,0089 до 0,0095 г. Результати визначення наведені у табл. 2.

Кількісне визначення фенольних сполук у свічках «Альфальфін». Одну свічку масою 2,250 г вміщували в мірну колбу місткістю 250 мл, додавали 50 мл 70 % спирту, розчин нагрівали на водяній бані (до повного розчинення свічки), охолоджували та доводили до позначки 70 % спиртом, потім розчин фільтрували (розчин А). Розчин А (5 мл) вміщували в мірну колбу на 25 мл, розчиняли в 70 % спирті та доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки. Через 15 хв вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 270 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Кількісний вміст фенольних сполук у одній свічці (X) розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot \overline{m} \cdot 25}{A_0 \cdot m},$$

де: A — оптична густина випробуваного розчину;

A_0 — оптична густина розчину ФСЗ ДФУ галової кислоти;

m — маса свічки, г;

m_0 — наважка ФСЗ ДФУ галової кислоти, г;

$\overline{m}$ — середня маса однієї свічки, г.

Вміст фенольних сполук у одній свічці повинен бути у межах від 0,0089 до 0,0095 г. Результати визначення наведені у табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати кількісного вмісту фенольних сполук у сухому та густому екстрактах з люцерни посівної наведені у табл. 1.

Як видно з даних, наведених у табл.1, вміст фенольних сполук у сухому і густому екстрактах «Альфальфін» складає 10,4±0,4 і 10,1±0,3 відповідно.

«Альфальфін»- таблетки готували масою 0,5 г, маса діючої речовини (сухий екстракт трави люцерни посівної) — 0,1 г. Як допоміжні речовини використовували крохмаль, лактозу, целюлозу мікрокристалічну та кальцію стеарат.

«Альфальфін»-свічки готували масою 2,0 г, субстанцію додавали із розрахунку 0,1 г на одну свічку. В якості основи використовували сплав поліетиленоксидів 1500 і 400 та ланолін безводний. Попередніми дослідами встановлено, що розчини допоміжних речовин не поглинають у даній області спектра.

Таблиця 1

РЕЗУЛЬТАТИ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ (X_i) ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У СУХОМУ ТА ГУСТОМУ ЕКСТРАКТАХ («АЛЬФАЛЬФІН»– ГУСТИЙ ЕКСТРАКТ), %

Лікарська форма люцерни посівної	№ серії	X_i	$\overline{X}$	S^2	$\overline{S}$	P	$t(P,n)$	Кількісний вміст фенольних сполук, %	$\overline{\varepsilon}$, %
Сухий екстракт люцерни посівної	3.10.08	10,37	10,37	0,0628	0,1120	0,95	3,18	10,4±0,4	3,43
	6.12.08	10,80							
	10.02.09	10,21							
	12.04.09	10,19							
	15.06.09	10,28							
«Альфальфін»– екстракт люцерни густий	1.09.08	10,30	10,09	0,0597	0,1093	0,95	3,18	10,1±0,3	3,44
	3.11.08	9,80							
	10.01.09	9,91							
	12.03.09	10,37							
	15.05.09	10,09							

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК (X_i) У ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ, Г НА 1 ТАБЛЕТКУ І 1 СВІЧКУ

Лікарська форма люцерни посівної	№ серії	X_i	$\overline{X}$	S^2	$\overline{S}$	P	$t(P,n)$	Кількісний вміст фенольних сполук, г	$\overline{\varepsilon}$, %
«Альфальфін»– таблетки	2.11.08	0,0096	0,0095	$2 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,95	3,18	0,0095±0,0002	2,261
	4.01.09	0,0097							
	8.03.09	0,0096							
	10.05.09	0,0093							
	14.07.09	0,0095							
«Альфальфін»– свічки	3.09.08	0,0090	0,0091	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,95	3,18	0,0091±0,0002	1,757
	4.11.08	0,0091							
	8.01.09	0,0089							
	10.03.09	0,0092							
	12.05.09	0,00905							

Результати кількісного вмісту фенольних сполук у лікарських формах люцерни посівної наведені у табл. 2.

Як видно з даних табл. 2, вміст фенольних сполук у таблетках і свічках складає 0,0095 г і 0,0091 г відповідно і корелює з їх вмістом у екстрактах.

ВИСНОВКИ

1. Вперше розроблені методики кількісного визначення фенольних сполук у лікарських формах із трави люцерни посівної — сухому екстракті, «Альфальфін»-таблетках, «Альфальфін»-свічках, «Альфальфін»-густому екстракті, які включені в проекти АНД.
2. Методики кількісного визначення фенольних сполук апробовані на промислових серіях сухого та густого екстрактів, таблетках і свічках. Відносна похибка не перевищує 4%.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. АНД 6/281-1670-00 «Піфламін».
2. Деклараційний пат. №27307. Спосіб одержання засобу з анаболічною активністю/[С. В. Ковальов, Р. Ф. Єрьоменко, О. М. Шаталова та ін.]. — Опубл. 25.10.2007. — Бюл. №17.
3. Дослідження фенольного комплексу з трави люцерни посівної/[С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко та ін.]. // Фармац. часопис. — 2008. — №2 (6). — С. 27–30.
4. Ковальов С. В. Вивчення амінокислотного та елементного складу деяких видів роду Medicago L. // Мед. хімія. — 2008. — Т. 10, №4. — С. 99–103.
5. Ковальов С. В. Хімічне дослідження ліпофільної фракції трави люцерни посівної //Вісник фармації. — 2008. — №4 (56). — С. 21–24.
6. Ковальов С. В., Єрьоменко Р. Ф., Малоштан Л. М. Кількісне визначення фенольних сполук у траві люцерни посівної//Фармаком. — 2008. — №4. — С. 35–38.
7. Acylated apigenin glycosides from alfalfa (Medicago sativa L.) var. Artal./[A. Stochmal, A. M. Simonet, F. A. Macias et al.] // Phytochemistry. — 2001. — Vol. 57 (8). — P. 1223–1226.
8. Alfalfa (Medicago sativa L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts / [A. Stochmal, S. Piacente, C. Pizza et al.] //J. Agric. Food Chem. — 2001. — Vol. 49 (2). — P. 753-758.
9. Alfalfa (Medicago sativa L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts/A. Stochmal, A. M. Simonet, F. A. Macias et al. // J. Agric. Food Chem. — 2001. — Vol. 49 (11). — P. 5310–5314.

УДК 615.076.8: 633.31: 615.45: 615.322

С. В. Ковалев, А. И. Ткаченко, М. А. Меркулов, С. В. Романова

К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ

Разработаны методики количественного определения фенольных соединений в сухом и густом экстрактах, таблетках и свечах, полученных из травы люцерны посевной. Количественное содержание фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в сухом и густом экстрактах должен быть не менее 9,00 %, в таблетках и свечах — от 0,0089 до 0,0095 г.

Ключевые слова: люцерна посевная; фенольные соединения; сухой, густой экстракт; свечи

UDC 615.076.8: 633.31: 615.45: 615.322

S. V. Kovalyov, A. I. Tkachenko, M. O. Merkulov, S. V. Romanova

TO STANDARDIZATION OF MEDICINAL FORMS OF ALFALFA SOWING

The assay of phenolic compounds in a dry, semiliquid extracts, pills, suppository, got from the alfalfa's herbs sowing were developed. Content of phenolic compounds with the reference into gallic acid in a dry and semiliquid extracts must be not less than 9.00 %, in pills and suppository — 0.0089 ч 0.0095 g.

Key words: alfalfa sowing; phenolic compounds; dry, semiliquid extract; suppository

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Тел.: (0572) 679208
E-mail.: gnosy@ukrfa.kharkov.ua

Надійшла до редакції:
02.12.2009