

УДК 615.322: 547.9+543.544

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В РАМКАХ РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩИХ ТЕХНОЛОГИЙ

© 2013 А.И. Хусаинова, А.В. Куркина

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 03.10.2013

Проведен морфолого-анатомический анализ и фитохимическое исследование цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.). Результаты исследования способствовали обоснованию новых подходов к оценке качества сырья пижмы обыкновенной, что позволило разработать методики качественного анализа и количественного определения сырья данного растения. Новые подходы к стандартизации позволяют реализовать ряд ресурсосберегающих задач в рамках рационального использования растительных ресурсов.

Ключевые слова: *пижма обыкновенная, Tanacetum vulgare* L., флавоноиды, лекарственное растительное сырье, стандартизация

Одна из основных задач фармакогнозии в рамках ресурсосберегающих технологий состоит в решении проблем стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и фитопрепаратов, а также разработка объективных методик контроля качества сырья и препаратов. Это в полной мере относится к сырью цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.). В современной медицине цветки пижмы обыкновенной широко применяются в качестве желчегонных и противоглистных лекарственных средств в виде настоя и в составе препаратов «Танацехол» и сбора «Фитогепатол №3» [2-4, 6]. Химический состав цветков пижмы обыкновенной представлен разнообразными группами биологически активных соединений, такими как эфирное масло, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты [6] и др. На сегодняшний день качество сырья пижмы обыкновенной регламентируется ФС 11 ГФ СССР XI издания [1]. Указанная статья имеет ряд несоответствий современным требованиям, предъявляемым к стандартизации ЛРС. В разделе «Микроскопия» представлены особенности морфолого-анатомического строения не всех частей сырья, а учитывая требованиями ОСТа (91500.05.001.00 Стандарты качества лекарственных средств), указанный раздел должен содержать микрофотографии или рисунки [5]. Раздел «Качественные реакции» отсутствует. В разделе «Количественное определение» приводится многостадийная, трудоемкая методика определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот методом прямой спектрофотометрии буферного раствора упаренного спиртового извлечения цветков пижмы обыкновенной при длине волны 310 нм в пересчете на лютеолин.

Новые инструментальные возможности, а также положения действующего ОСТа требуют

новый уровень исследований лекарственных растений, что может успешно использоваться для целей экологии. Обоснование и соблюдение этих подходов будет способствовать рациональной заготовке, сушке сырья, его переработке и получению качественных фитопрепаратов, а также разработке надежных методик анализа, которые позволят более экономично использовать сырье и природные ресурсы. Все это создаст предпосылки для более активного механизма использования современных ресурсосберегающих технологий, несмотря на то, что сегодня пижма пока не нуждается в дополнительном культивировании.

Цель исследования: проведение работ по совершенствованию методов стандартизации сырья пижмы обыкновенной в рамках научного обоснования рационального использования растительных ресурсов.

Материалы и методы. Мы исследовали цветки пижмы обыкновенной, собранные в округе г. Тольятти, села Нижнее Санчелеево и села Алексеевка Самарской области (июль 2008 г.), на фармакопейном участке Самарского ботанического сада (июль 2009-2012 гг.). Морфолого-анатомическое исследование осуществляли с помощью микроскопов марки «Motic», стереоскоп DM-39C-N9GO-A и DM-111-Digital Microscopy (Motic Microscopes), при увеличении x20, x40, x100, x400. Колоночную хроматографию осуществляли с использованием силикагеля L 40/100 (Чехия), полиамида марки «Woelm» (Германия). ¹H-ЯМР спектры получали на приборах «Bruker AM 300» (300 МГц) и «Gemini-200» (200 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках «Силуфол УФ 254» (Чехия), «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (Россия) в системах хлороформ-этанол (4:1), хлороформ-этанол-вода (26:16:3). Детекцию

Хусаинова Алия Ильясовна, аспирантка
Куркина Анна Владимировна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: kurkina-av@yandex.ru

веществ проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм и 366 нм и обработкой хроматограмм раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК).

Результаты и обсуждение. При проведении морфолого-анатомического анализа лекарственного растительного сырья пижмы обыкновенной по ряду признаков были подтверждены имеющиеся литературные данные. Выявлены новые анатомо-морфологические особенности, ранее не описанные в изученной нами литературе. В качестве перспективных диагностических признаков, выявленных впервые, можно отметить:

- особенности строения фертильных частей трубчатого цветка пижмы, характер эпидермальных клеток завязи и ее опушения, а также строение основания завязи, заключающееся в наличии кольца склерифицированных клеток;
- особенности строения рыльца пестика, а именно его раздвоенность и особая неровная ворсинчатая поверхность;
- особенности строения андроеца, а именно пыльники, с заостренной верхушкой, сросшиеся двухгнездными теками;
- наличие связника, образованного клетками с сильно утолщенными лигнифицированными стенками.

Гистологические особенности строения листочков обертки: на поперечном сечении листочков обертки диагностируется мощный слой склеренхимных волокон и проводящего пучка в центральной жилке, армированного мелкими склеренхимными клетками. Гистологические особенности строения цветоложа: цветоложе выполнено основной паренхимой, при этом с периферии паренхима плотная, представлена мелкими клетками. В сердцевине цветоложа клетки паренхимы крупные, с большим количеством межклетников. Впервые в паренхиме цветоложа выявлены лизигенные вместилища, чередующиеся с проводящими элементами ксилемы. Содержимое вместилищ темно-коричневого цвета. Секрет липофильный, не растворимый в воде, хорошо растворимый в хлороформе.

Для изучения химического состава цветков пижмы обыкновенной и для препаративного выделения веществ в индивидуальном виде нами использовался метод адсорбционной колоночной хроматографии. В процессе эксперимента проводили элюирование смесью хлороформ-этиловый спирт в различных соотношениях, а затем хлороформом и смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях, смесью вода-спирт в различных соотношениях. Эффективного разделения и очистки веществ добивались путем чередования сорбентов и соответствующих систем растворителей. Контроль за элюированием осуществляли с помощью ТСХ-анализа. Методом колоночной хроматографии из цветков пижмы обыкновенной было выделено 6 биологически активных веществ. С использованием методов ^1H -ЯМР-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также результатов химических превращений были установлены структуры 4 соединений: *акацетин* (5,7-

дигидрокси-4¹-метокси-флаван), *тилианин* (7-О- β -D-глюкопиранозид акацетина), *апигенин* (5,7,4¹-тригидрокси-флаван), *космосин* (7-О- β -D-глюкопиранозид апигенина). По предварительным данным, соединения 5 и 6 отнесены нами к фенолпропаноидам по характеру флуоресценции и характерным максимумам поглощения в УФ-спектрах. Следует отметить, что соединения тилианин и космосин впервые выделены из цветков пижмы обыкновенной, причем тилианин является доминирующим флавоноидом данного сырья, что представляет интерес с точки зрения стандартизации.

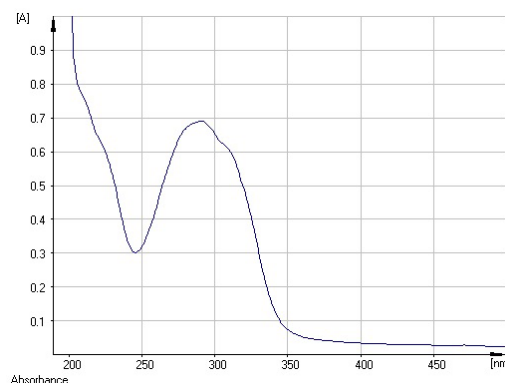


Рис. 1. УФ-спектр спиртового раствора соединения 5

В качестве методик качественных реакций нами исследованы химические (пробирочные) реакции и ТСХ-анализ. Первоначально изучена возможность применения цианидиновой реакции на содержание флавоноидов, в результате которой наблюдается розовое окрашивание и реакция с 3% спиртовым раствором AlCl_3 – усиление окрашивания. При проведении ТСХ-анализа на хроматограмме просматриваются основные вещества, выделенные из цветков пижмы обыкновенной и обнаруживающиеся в виде пятен фиолетового свечения при длине волны 254 нм. При проявлении хроматограммы раствором ДСК соединения приобретают желтую окраску. При этом доминирующий флавоноид тилианин обнаруживается с величиной R_f около 0,7 (тилианин) и величиной R_s около 1,2 относительно пятна ГСО цинаризида.

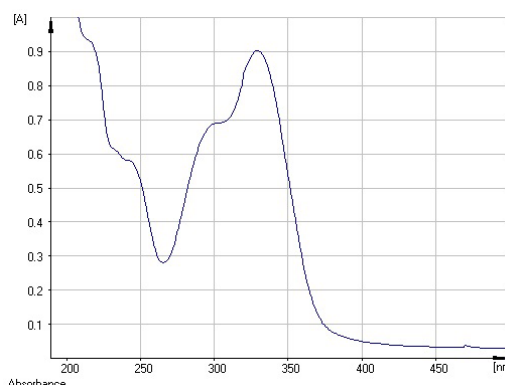


Рис. 2. УФ-спектр спиртового раствора соединения 6

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в пижмы обыкновенной цветках изучены условия

экстракции целевых веществ из сырья данного растения. Сырье экстрагировали 40%, 70% и 96% спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент 1:30, 1:50 и 1:100 в течение 30 мин, 45 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин. Результаты данного исследования свидетельствуют, что оптимальными условиями экстракции сырья являются: экстрагент – 70% этиловый спирт, соотношение сырье-экстрагент – 1:50, время экстракции – 60 мин.

В ходе разработки методики изучены УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из пижмы обыкновенной цветков. Как известно, флавоноиды образуют комплексы с алюминием хлоридом (AlCl_3), что позволяет применять для оценки качества сырья метод дифференциальной спектрофотометрии в присутствии AlCl_3 . При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов использовали реакцию комплексообразования с раствором алюминия хлорида для исключения вклада в значение оптической плотности других групп соединений, в частности, гидроксикоричных кислот, обуславливающих характер кривой поглощения УФ-спектра раствора извлечения из пижмы обыкновенной цветков. В этом случае наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов, который обнаруживается в УФ-спектре в виде максимума поглощения при длине волны 400 нм (рис. 3).

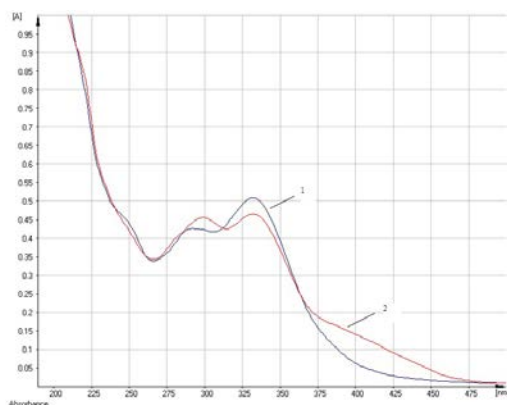


Рис. 3. УФ-спектры растворов водно-спиртового извлечения из пижмы обыкновенной цветков:

1 – раствор извлечения из пижмы обыкновенной цветков; 2 – раствор извлечения из пижмы обыкновенной цветков с добавлением алюминия хлорида

Изучение УФ-спектров ГСО цинарозида показало (рис. 4), что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет тот же максимум поглощения (400 нм). Следовательно, цинарозид может быть использован в методике анализа в качестве ГСО.

УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из пижмы обыкновенной цветков и ГСО цинарозида в условиях дифференциальной спектрофотометрии имеют максимум поглощения при 400 нм (рис. 5 и 6). В этой связи в качестве метода количественного анализа нами предложен метод дифференциальной спектрофотометрии с определением суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид. Использование

для этих целей ГСО лютеолина, как это имеет в случае фармакопейной методики, на наш взгляд, является нецелесообразным, так как, во-первых, данный компонент практически не обнаруживается в цветках пижмы обыкновенной, а во-вторых, в сырье данного растения преобладающими компонентами являются флавоноидные гликозиды, близкие по спектральным характеристикам к цинарозиду.

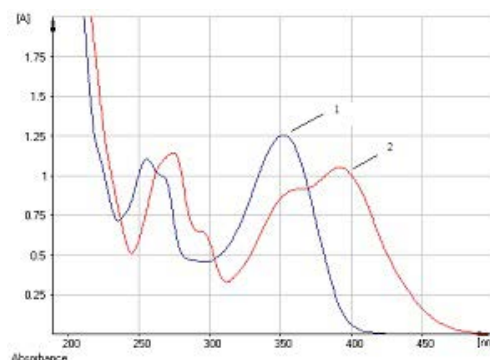


Рис. 4. Спектр спиртового раствора ГСО цинарозида:

1 – раствор ГСО цинарозида; 2 – раствор ГСО цинарозида с добавлением алюминия хлорида

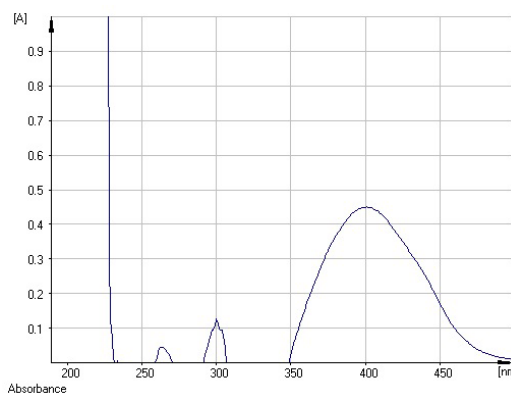


Рис. 5. УФ-спектр раствора водно-спиртового извлечения из пижмы обыкновенной цветков (дифференциальный спектр) алюминия хлорида

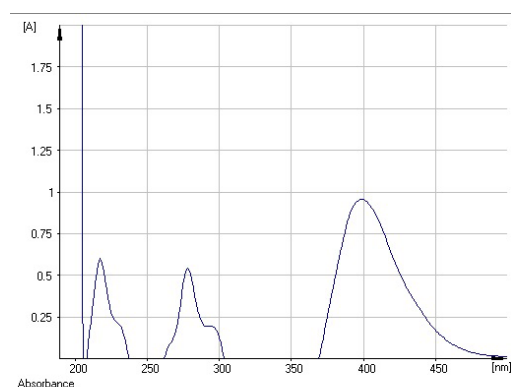


Рис. 6. УФ-спектр раствора ГСО цинарозида (дифференциальный спектр)

В пользу выбора дифференциальной спектрофотометрии свидетельствуют также данные УФ-спектра буферного раствора спиртового извлечения пижмы обыкновенной цветков, в котором

максимум поглощения составляет 350 нм, хотя аналитическая длина волны (310 нм), используемая в фармакопейной методике, приходится на минимум в кривой поглощения (рис. 7). С применением разработанных методик проанализирован ряд образцов сырья пижмы и лекарственного и показано, что содержание флавоноидов в пижме обыкновенной варьирует в пределах от 1,58% до 1,98%.

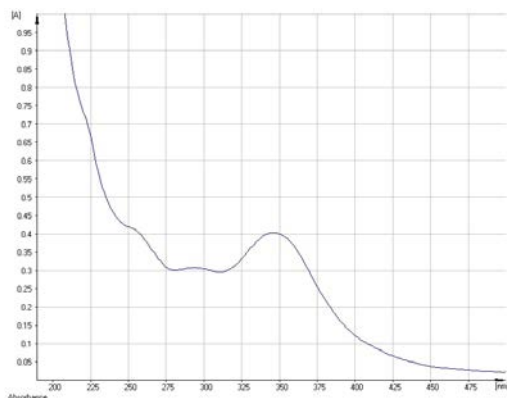


Рис. 7. УФ-спектр буферного раствора спиртового извлечения цветков пижмы обыкновенной (ГФ СССР XI издания)

Выводы:

1. Анатомо-морфологическое исследование сырья пижмы обыкновенной с использованием цифровой микроскопии позволило детальным образом изучить диагностические признаки сырья данного лекарственного растения.
2. Уточнены данные о химическом составе цветков пижмы обыкновенной. При этом тилианин (доминирующий флавоноид) и космосиин впервые выделены из данного сырья.

3. На основе фитохимических исследований обоснованы новые подходы к оценке качества сырья пижмы обыкновенной и разработаны методики качественного анализа и количественного определения.

4. Разработанные методики включены в проект нормативной документации ФС «Пижмы обыкновенной цветки» (изменение к ФС 11 «Пижмы обыкновенной цветки», ГФ XI издания, вып. 2).

5. Выявленные оптимальные условия экстракции и новые подходы контроля качества цветков пижмы обыкновенной способствуют обоснования ресурсосберегающих технологий в рамках стандартизации лекарственного растительного сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Государственная Фармакопея СССР. 11-е издание / МЗ СССР. – Вып. 1 и 2. – М.: Медицина, 1990. 400 с.
2. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года: в 2-х т. Т.1. – М.: Издательство «Медицинский совет», 2009. 1359 с.
3. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. 963 с.
4. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. 1239 с.
5. ОСТ 91500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. (утв. приказом Минздрава РФ от 1 ноября 2001 г. N 388).
6. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). – СПб.: Наука, 1993. С. 190-192.

OPTIMIZATION OF APPROACHES TO STANDARDIZATION OF TANSY ORDINARY RAW MATERIALS WITHIN RESOURCE-SAVING TECHNOLOGIES

© 2013 A.I. Khusainova, A.V. Kurkina

Samara State Medical University

The morphological and anatomic analysis and phytochemical research of tansy ordinary (*Tanacetum vulgare* L.) flowers are carried out. Results of research promoted justification of new approaches to assessment of quality of tansy ordinary raw materials that allowed to develop methods of qualitative analysis and quantitative definition of raw materials of this plant. New approaches to standardization allow to realize a number of resource-saving problems within rational use of vegetable resources.

Key words: *tansy ordinary*, *Tanacetum vulgare* L., *flavonoids*, *medicinal vegetable raw materials*, *standardization*

Aliya Khusainova, Post-graduate Student
Anna Kurkina, Candidate of Pharmacy, Associate Professor
at the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases
of Phytotherapy. E-mail: kurkina-av@yandex.ru