

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 615.074

СОЧЕТАНИЕ ДВУХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А.Н. Кузьменко, В.Ю. Решетняк, В.А. Попков, Е.Б. Пашкова*, А.В. Пирогов*

(Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; e-mail: kuzmenko.mta@mail.ru; *кафедра аналитической химии МГУ)

Для изучения химического состава и стандартизации лекарственного растительного сырья предложены два взаимодополняющих хроматографических метода - ионо-эксклюзионная и газожидкостная хроматография. На примере лекарственных растений - валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*) и тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*) показаны возможности и ограничения этих методов. Найдены хроматографические условия для определения аскорбиновой кислоты методом ионо-эксклюзионной хроматографии.

Ключевые слова: газожидкостная хроматография, ионно-эксклюзионная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, стандартизация растительного лекарственного сырья и растительных сборов, вещества-маркеры.

Газожидкостная хроматография с масс-селективным детектированием – эффективный метод стандартизации лекарственного растительного сырья и сборов на его основе [1, 2]. Вещества-маркеры, используемые при идентификации того или иного вида лекарственного растительного сырья, относятся к разным классам химических соединений, среди них много терпенов и терпеноидов, но могут встречаться и более специфические вещества, например, 1,6-диоксаспиро[4.4]нон-3-ен,2-(2,4-гексадивинилиден) для ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*), производные нафталина для календулы лекарственной (*Calendula officinalis*), производные фурана для ягодных растений из семейства брусничных (*Vacciniaceae*) и т.д. Сводные данные для ряда лекарственных растений, входящих в ГФ XI, представлены в [3]. Среди веществ-маркеров можно выделить как высокоспецифические вещества, даже малое содержание которых в лекарственном сырье или в сборе не мешает их стандартизации, так и неспецифические вещества, присущие нескольким видам лекарственных растений. Из веществ первого типа можно отметить уже упомянутый 1,6-диоксаспиро[4.4]нон-3-ен,2-(2,4-гексадивинилиден), присущий сырью ромашки лекарственной, производные циклогексена и циклогексана (ментол, ментон, пиперитон, пулегон), характерные для мяты перечной (*Mentha piperita*), ледол и палюстрол, встречающиеся в основном в сырье багульника болотного (*Ledum palustre*). К высокоспе-

цифичным веществам относится также изовалериановая кислота, присущая прежде всего сырью валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*).

В то же время можно отметить некоторые виды лекарственных растений, в составе которых идентифицируется целый набор не слишком специфических соединений, большая часть которых относится к терпенам и терпеноидам. В качестве примеров можно привести душицу обыкновенную (*Origanum vulgare*), в составе которой идентифицируются β -фелландрен, *n*-цимен, β -оцимен, бурбонен, кариофиллен, гермакрен Д и спатуленол; можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis*) (β -туйен, лимонен, копаен, гермакрен Д, γ -элемен), пижму обыкновенную (*Tanacetum vulgare*) с высоким содержанием камфоры и эвкалиптола. Два последних вещества идентифицируются также в составе таких растений, как эвкалипт прутовидный, шалфей лекарственный и тысячелистник обыкновенный. Очевидно, что идентификацию таких растений следует проводить с привлечением цельного “хроматографического образа”. В ряде случаев в качестве альтернативного или дополняющего метода идентификации может выступать ионно-эксклюзионная хроматография (ИЭХ).

Экспериментальная часть

Экстракты растительного сырья получали методом ремацерации. Экстрагент (пятикратный объем) разделялся на порции. Общее время настаивания составля-

ло семь суток. Вначале растительное сырье экстрагировали четверо суток трехкратным объемом экстрагента, после прессования экстракцию проводили однократным объемом экстрагента в течение двух суток и затем в течение еще одних суток оставшимся однократным объемом экстрагента.

Пробоподготовка заключалась в том, что флакон с полученным экстрактом помещали на 10 мин в ультразвуковую ванну-мешалку "Canfup" без нагрева. Затем отбирали 10 мл экстракта в пластиковую колбу для центрифугирования и центрифугировали на центрифуге "Ohaus Split 16000 rpm" при 16000 об/мин в течение 2 мин. Отбирали микродозатором 1 мл экстракта с поверхности для предотвращения попадания частиц сырья и помещали в барабан инжектора хромато-масс-спектрометра.

Анализ проводили на газовом хроматографе "Agilent Technologies 6850 Series II" с масс-селективным детектором "Agilent Technologies 5973 Network". Условия хроматографирования: колонка "Agilent Technologies HP-5MS" длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, температура колонки 30–240°C. Скорость подъема температуры 5°/мин; конечный изотермический участок 10 мин. Температура испарителя 200°C, температура инжектора 30°C; скорость газа-носителя (гелий) 1 мл/мин.

При использовании метода ионно-эксклюзионной хроматографии работу проводили на приборе "Цвет 3006" с кондуктометрическим детектором на сорбенте "Aminex Q-15S" с 5 мМ раствором бензойной кислоты в качестве элюента кроме тех случаев, когда требовалось лучшее разделение кислот, имеющих близкие времена удерживания (щавелевая, янтарная и

фумаровая кислоты). В этих случаях настои и отвары растений исследовались на приборе "Kontron" на сорбенте "Aminex A5" при использовании УФ-детектора ($\lambda = 210$ нм). В частности, на сорбенте "Aminex Q-15S" невозможно было получить разделение щавелевой кислоты и неорганических кислот, тогда как и та, и другие в значительных количествах присутствуют практически во всех лекарственных растениях. Эта задача решалась при параллельном измерении на приборе "Kontron", так как времена удерживания неорганических кислот и щавелевой кислоты составляли соответственно 2,3 и 7,5 мин ($F = 0,8$ мл/мин). Неорганические ионы не удерживаются на колонке.

Результаты и их обсуждение

Для сырья валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*) в качестве веществ-маркеров выступают прежде всего изовалериановая кислота – высокоспецифичное вещество для данного вида сырья, а также борнеолацетат. На рис. 1 представлены хроматограммы для двух серий сырья валерианы лекарственной, полученные для разных хроматографических условий. В целом, профили хроматограмм совпадают с большей степенью точности. Изовалериановая кислота является весьма надежным маркером присутствия валерианы лекарственной в сборах. В этом отношении характерна хроматограмма для "Седативного сбора № 2" ОАО "Красногорсклекарств" (рис. 2) (трава пустырника 40%, шишки хмеля 20%, трава мяты 15%, корневища валерианы 15%, корневища солодки 10%), в состав которого входят пять видов сырья, и из них всего лишь два вида лекар-

Т а б л и ц а 1

Оценка воспроизводимости определения аскорбиновой кислоты по высоте пиков и времени удерживания (элюент – 5 мМ раствор бензойной кислоты, колонка: 8×300 мм, "Aminex Q-15S", скорость подачи элюента 0,7 мл/мин, объем вводимой пробы 100 мкл)

Показатель	S^2	S	S_r	$\bar{X} \pm \frac{t(P; f) \cdot S}{\sqrt{n}}$
Метрологическая характеристика для высот пиков	0,002	0,045	0,044	$1,0 \pm 0,1$
Метрологическая характеристика для времен удерживания	0,013	0,114	0,010	$11,0 \pm 0,1$

$P = 0,95$; $n = 5$ (выборка из пяти измерений), $t(0,95; 4) = 2,78$; $\sqrt{n} = \sqrt{5} = 2,236$.

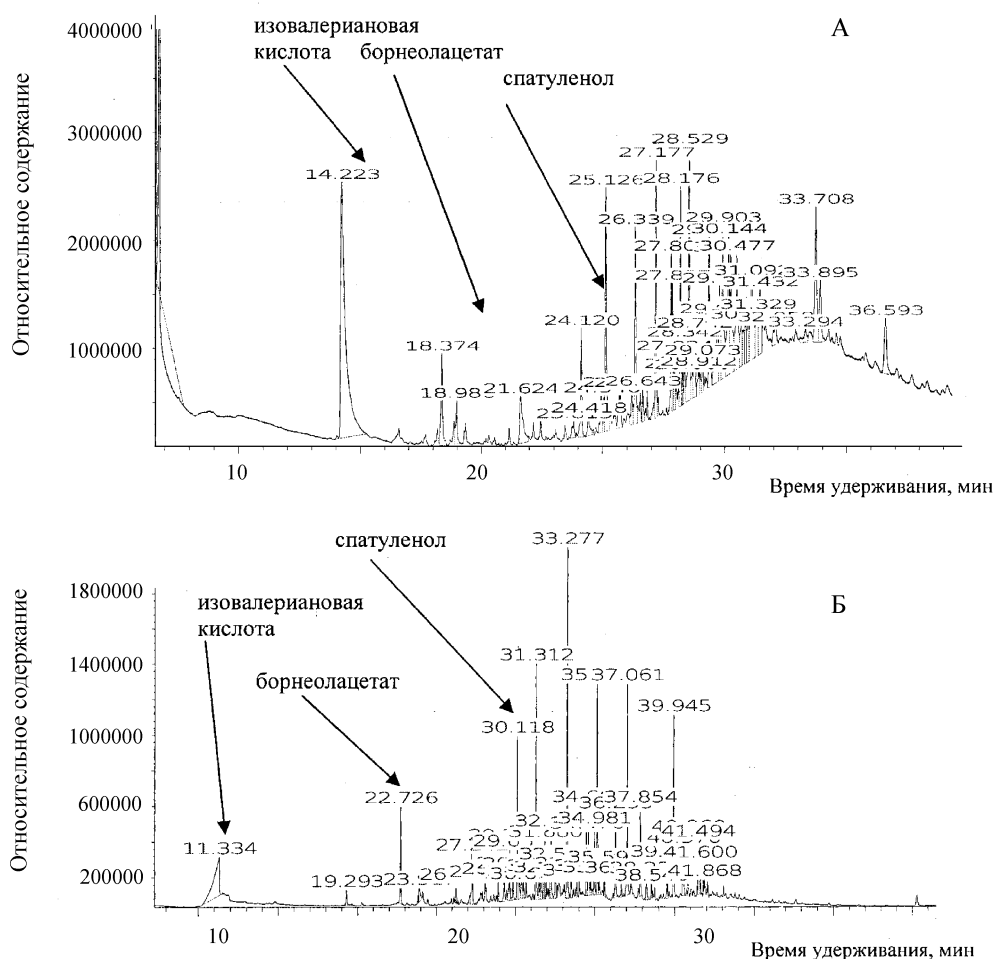


Рис. 1. Типичные хроматограммы экстракта сырья валерианы лекарственной А (серия 1). Условия хроматографирования: колонка "Agilent Technologies HP-5MS" длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм; температура колонки 30–240°C; скорость подъема температуры 5°/мин; конечный изотермический участок 10 мин; температура испарителя 200°C; температура инжектора 30°C; скорость газ-носителя (гелий) 1мл/мин. Б (серия 2). Градиент температуры 35°C (3 мин), 35–220°C (по 5°/мин), 220°C (10 мин), 220–240°C (по 2°/мин), 240°C (5 мин), 35°C (5 мин). Температура детектора 200°C

ственных растений, для которых есть явные вещества-маркеры (валериана лекарственная и мята перечная). Несмотря на небольшое содержание валерианы (15%), изовалериановая кислота наблюдается среди немногочисленных пиков на данной хроматограмме. Также обращает на себя внимание наличие характерных для мяты перечной веществ-маркеров – производных циклогексена и циклогексана.

Наряду с хорошо воспроизводимыми данным методом результатами для этого вида лекарственных растений может применяться и метод ионно-эксклюзионной хроматографии, при этом определяется характерный набор карбоновых кислот: щавелевая (3,2%), лимонная (2,4%), яблочная (2,8%), аскорбино-

вая (5,2%), фумаровая (1,8%), уксусная (1,5%) и изовалериановая (1,1%) (рис. 3). Данный набор кислот достаточно редок и может использоваться для подтверждения подлинности этого вида сырья.

Аскорбиновая кислота является чрезвычайно редкой при исследованиях с использованием ионно-эксклюзионной хроматографии (ИЭХ). Одно из упоминаний о ней встречается в [4], но лишь в качестве указания на возможность ее определения в безалкогольных напитках, без нахождения аналитических характеристик. Чтобы восполнить этот дефицит информации, мы определили некоторые из аналитических характеристик ИЭХ-определения этой кислоты, учитывая ее распространенность в составе лекарственных

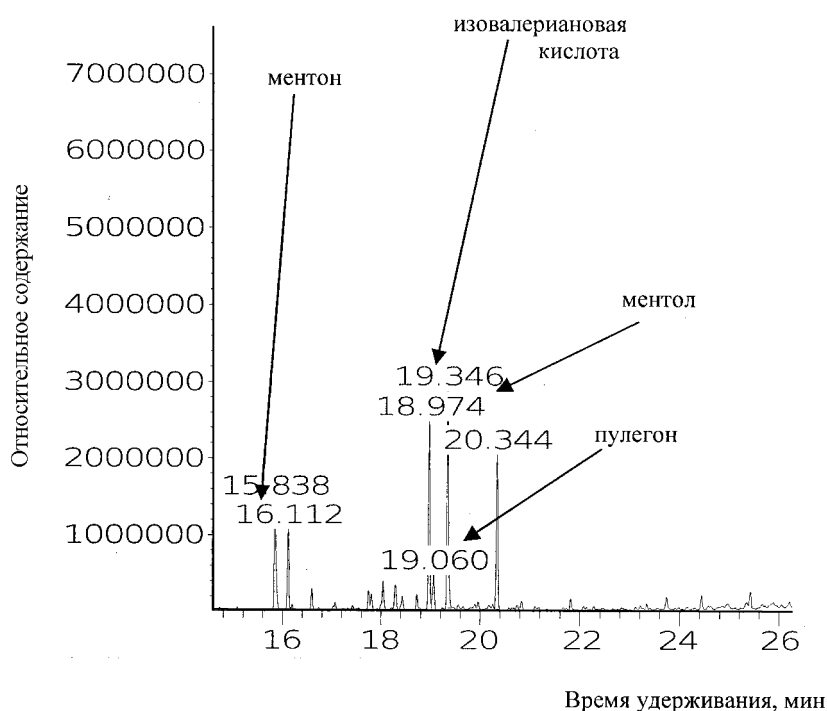


Рис. 2. Типичная хроматограмма экстракта растительного сбора “Седативный сбор № 2” (ОАО “Красногорск-лексредства”) (состав сбора: трава пустырника 40%, шишки хмеля 20%, трава мяты 15%, корневища валерианы 15%, корневища солодки 10%)

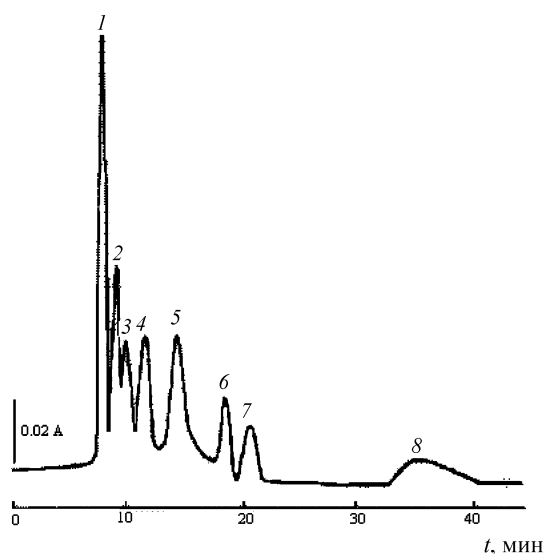


Рис. 3. Типичная хроматограмма отвара валерианы лекарственной: 1 – неорганические кислоты; 2 – щавелевая; 3 – лимонная; 4 – яблочная; 5 – аскорбиновая; 6 – фумаровая; 7 – уксусная; 8 – валериановая. УФ-детектор (210 нм). Элюент – серная кислота (20 мМ), скорость потока 0,8 мл/мин, колонка – “Aminex A5” (6×250 мм)

растений. Время удерживания ее при скорости потока 0,8 мл/мин составило 11,2 мин (“Цвет 3006”), предел обнаружения – 40 мг/л, линейность градуировочного графика соблюдалась в диапазоне 50–1200 мг/л.

Была проведена оценка воспроизводимости определения аскорбиновой кислоты по высотам пиков и временам удерживания при использовании стандартного раствора аскорбиновой кислоты (табл. 1). Были взя-

Т а б л и ц а 2

Кратность избыточных количеств кислот, не мешающих определению карбоновых кислот
(элюент – 5 мМ раствор бензойной кислоты, колонка: 8×300 мм, “Aminex Q-15S”)

Кислота	Лимонная	Уксусная	Фумаровая	Малеиновая	Аскорбиновая	Янтарная	Яблочная
Лимонная	–	1200	>300	40	1500	1000	>300
Уксусная	400	–	150	250	100	80	450
Фумаровая	>300	>400	–	200	800	50	500
Малеиновая	40	800	>200	–	500	1500	100
Аскорбиновая	200	100	400	300	–	250	300
Янтарная	400	500	50	800	450	–	500
Яблочная	150	800	1000	100	800	100	–

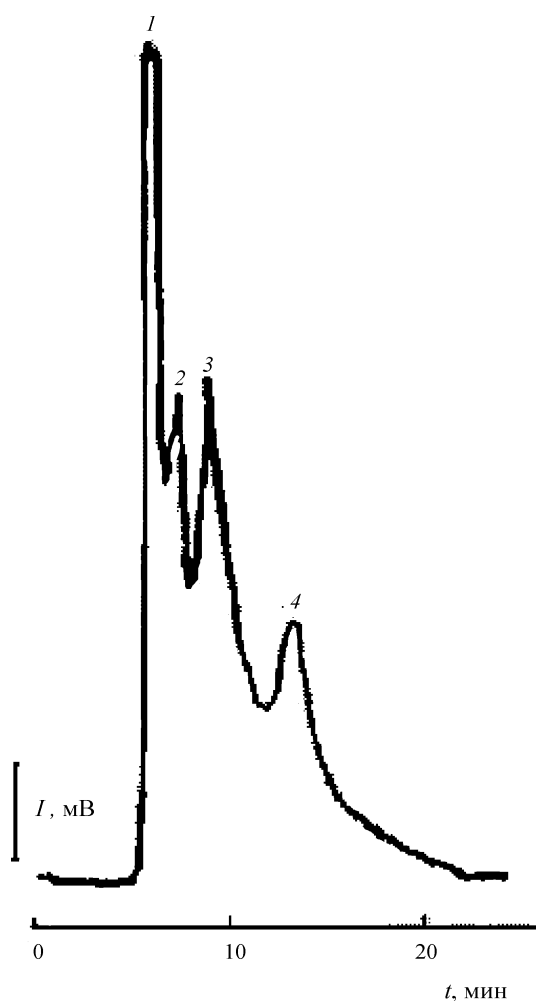


Рис. 4. Типичная хроматограмма отвара тысячелистника обыкновенного: 1 – неорганические и щавелевая кислоты; 2 – лимонная; 3 – яблочная; 4 – фумаровая. Детектор кондуктометрический, элюент 5 мМ бензойная кислота, скорость потока 0,7 мл/мин, колонка “Aminex Q-15S” (8×300 мм)

ты выборки из пяти результатов измерений высот пиков и времен удерживания. Оценка мешающего влияния некоторых кислот при определении аскорбиновой кислоты представлена в табл. 2. Как видно из приведенных данных, недостаточно хорошо разделяются при использованных условиях янтарная и фумаровая кислоты, играющие важную роль в фармакологии лекарственных растений. Для их лучшего разделения использовали УФ-детектирование и H_2SO_4 в качестве элюента. Это помогало и отделению оксалат-иона от неорганических кислот, так как при использовании в качестве элюента бензойной кислоты щавелевая кислота и неорганические кислоты выходят одним пиком (рис. 3, 4).

Сырье тысячелистника обыкновенного "*Achillea millefolium*" обладает богатым набором летучих веществ. Данный вид растения содержит набор не слишком специфических, но составляющих характер-

ную композицию соединений. В первую очередь это всегда присутствующий эвкалиптол, а также камфора, изомеры терпинеола, изоборнеолацетат, борнеол. При этом камфора, альфа-терпинеол, бета-пинен и борнеол суммарно составляют 60,7% эфирного масла. Для данного растения в дополнение к анализу с привлечением "хроматографического образа" при использовании метода газожидкостной хроматографии можно применять и ИЭХ (рис. 4). Лимонная и яблочная кислоты характерны для различных растений, в то время как фумаровая кислота является более редкой [5]. Содержание данных кислот в сырье тысячелистника составляет 0,6; 0,6 и 2,0% соответственно.

Таким образом, два хроматографических метода – газожидкостная и ионно-эксклюзионная хроматографии, могут быть взаимодополняющими при стандартизации сырья лекарственных растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьменко А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 212.
2. Кузьменко А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 278.
3. Разживин Р.В., Решетняк В.Ю., Кузьменко А.Н., Нестерова О.В., Попков В.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 67.
4. Glod B.K. // Acta Chromatographica. 1997. **7**. P.72.
5. Кузьменко А.Н., Попков В.А. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2007. **4**. С. 8.

Поступила в редакцию 20.01.10

COMBINATION OF TWO CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR USE IN THE INVESTIGATION OF OFFICIAL HERBS CHEMICAL COMPOSITION

A.N. Kuz'menko, V.Yu. Reshetnyak, V.A. Popkov, Ye.B. Pashkova*, A.V. Pirogov*

(I. M. Sechenov First Moscow State Medicine University,* M.V. Lomonosov Moscow State University)

Two chromatographic methods- gas-liquid chromatography with mass-selective detector and ion-exclusion chromatography offers for the standartisation of the raw plant material and herb mixtures. *Valeriana officinalis* and *Achillea millefolium* describes as patterns for chemical markers search. Isovaleric acid is the chemical marker for the first herb plant and some chemical markers for the second. Chromatographic conditions for the ascorbic acid ion-exclusion determination describes.

Key words: gas-liquid chromatography with mass-selective detector, ion- exclusion chromatography, officinal herbs, standartisation of the raw plant material and herb mixtures.

Сведения об авторах: Кузьменко Алексей Николаевич – доцент кафедры общей химии Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, канд. хим. наук (*kuzmenko.mma@mail.ru*); Решетняк Владимир Юрьевич – профессор кафедры общей химии Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, докт. фарм. наук; Попков Владимир Андреевич – профессор кафедры общей химии Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, докт. фарм. наук; Пашкова Елена Борисовна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ; Пирогов Андрей Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук.