

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ВОДЯНИКИ ЧЕРНОЙ

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Нами в [1] разработан способ получения густого экстракта водяники черной из ацетонового извлечения, являющегося побочным продуктом при получении противосудорожного фитопрепарата “Эмпетрин”, в результате фармакологических исследований которого, проведенных в НИИ фармакологии ТНЦ РАМН, была установлена его антигипоксическая активность.

Химический состав густого экстракта водяники представлен флавоноидами, кумаринами, тритерпеноидами. Наибольший интерес из них представляет сумма флавоноидов, включающая малополярный флаванон — дезметоксиматтеуцинол, 2',4'-дигидроксиалкон и дигидроалконы: 2',4'-дигидрокси-3',5'-диметил-6'-метокси- α,β -дигидроалкон (анголетин), 2',4'-дигидрокси- α,β -дигидроалкон (эмпетрон), 4'-гидрокси-2'-метокси- α,β -дигидроалкон (метилэмпетрон), из которых два последних соединения выделены из водяники впервые [2].

Фармакологические испытания показали, что выделенный из густого экстракта 2',4'-дигидроксиалкон (2',4'-ДГХ) и составляющий от 4,83 до 5,94 % от его массы, проявляет отчетливое антигипоксическое действие. Исходя из этого и учитывая сравнительную легкость его получения и стабильность при хранении, стандартизацию густого экстракта водяники целесообразно проводить по указанному соединению. Настоящая работа посвящена разработке методов стандартизации данного экстракта.

Для установления подлинности густого экстракта использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках “Силуфол” [3]. Из различных систем растворителей для разделения суммы биологически активных веществ наилучшее распределение компонентов получили восходящим методом в системе гек-

сан – ацетон – уксусная кислота (20:10:0,1). С учетом многокомпонентности состава разделяемой смеси наиболее рациональным является параллельное использование двух детекторов: 1) УФ-излучения при длине волны 254 нм и 2) раствора родамина Ж с последующим просматриванием в УФ-свете при той же длине волны. Наличие в этих условиях пятна коричневого цвета с R_f 0,38, принадлежащего 2',4'-ДГХ, в густом экстракте водяники обязательно.

Для количественного определения суммы флавоноидов ГФ XI [5] рекомендует метод спектрофотометрии, основанный на поглощении электромагнитного излучения комплексом, образованным флавоноидами с алюминия хлоридом в кислой среде. Комплексные соединения, образованные алюминия хлоридом по *орто*-гидроксикарбонильной или *перу*-гидроксикарбонильной группировкам, имеющимся у большинства флавоноидов, сохраняют свою устойчивость в сильно-кислой среде, в то время как комплексы алюминия хлорида с *орто*-дигидрокси-группировками, присутствующие не только флавоноидам, но и другим полифенольным соединениям, в этих условиях нестабильны [6].

Для исключения поглощения исходного экстракта в области максимального поглощения комплекса алюминия хлорида с суммой флавоноидов использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, при этом раствор сравнения содержал те же компоненты, что и испытуемый, за исключением алюминия хлорида. В результате спектр экстракта приобрел четкий вид с ясно выраженным максимумом поглощения (рис. 1).

В качестве рабочего стандартного образца (РСО) был использован 2',4'-ДГХ, дающий аналогичный комплекс с алюминия хлоридом, максимум поглощения которого совпадает с максимальным поглощением густого экстракта водяники. Аналитической полосой поглощения была выбрана длина волны 415 нм (рис. 1).

Для установления области подчинения основному закону поглощения света получили ряд концентраций раствора РСО на 96 % этаноле из основного раствора (0,0504 %). После добавления 2 % этанольного раствора алюминия хлорида и хлористоводородной кислоты разведенной был построен калибровочный график (рис. 2).

На основании полученных данных было установлено, что зависимость величины оптической плотности от концентрации 2',4'-ДГХ носит линейный характер в пределах концентраций $0,6 \cdot 10^{-3}$ – $1,6 \cdot 10^{-3}$ %. Аналогично полученные алюминиевые комплексы на сериях разведений густого экстракта водяники показали, что в области оптических плотностей 0,2 – 0,6 на-

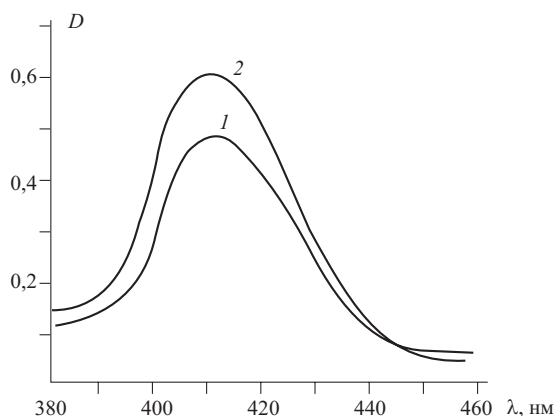


Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения комплексов флавоноидов с $AlCl_3$ в кислой среде. 1 — густой экстракт водяники; 2 — 2',4'-ДГХ.

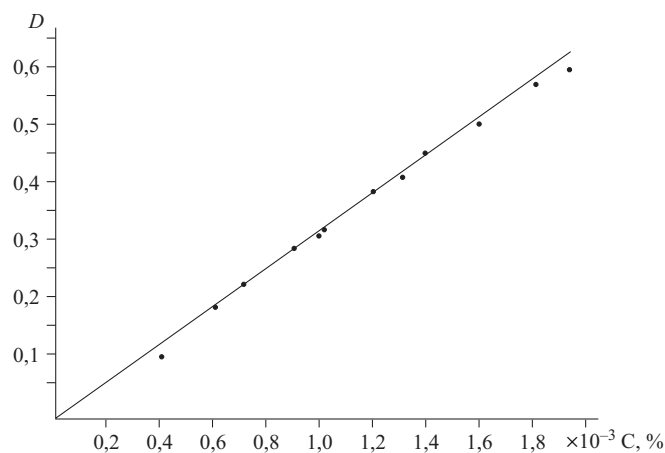


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации 2',4'-ДГХ.

блюдается линейная зависимость между концентрацией испытуемого раствора и величиной поглощения (рис. 3).

Были изучены и подобраны оптимальные условия проведения указанной реакции: количество 2 % этанольного раствора алюминия хлорида — 4 мл, кислоты хлористоводородной разведенной — 1,5 мл, экспозиция реакции — 40 мин.

Для проверки воспроизводимости методики было проведено определение флавоноидов в каждой из серий густого экстракта водяники в 12-ти повторностях. Таким образом, максимальная ошибка единичного определения с 95 % вероятностью составила $\pm 4,96\%$ (табл. 1).

Отсутствие систематической ошибки при осуществлении предложенной методики проверено в опытах с добавками РСО 2',4'-ДГХ непосредственно в спиртовой раствор густого экстракта водяники (табл. 2).

Нами использован метод вычисления содержания флавоноидов в густом экстракте водяники в процентах (X) по рассчитанному удельному показателю поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ комплекса 2',4'-ДГХ с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, значение которого составило 316 ± 2 (табл. 3).

Согласно требованиям ГФ-ХІ изд. и ОСТ № 91500.05.001-00 [4, 7] для густых экстрактов, помимо подлинности и количественного определения, необходимо устанавливать и другие показатели качества:

Таблица 1
Метрологические характеристики методики анализа (f , число степеней свободы, — 11; P , доверительная вероятность, — 95 %; критерий Стьюдента — 2,23)

№ серии	\bar{X}	S^2	S	$\pm \Delta X$	$\epsilon, \%$
070997	5,91	0,00915	0,0956	0,21	3,62
080997	4,82	0,0068	0,0822	0,18	3,79
120997	5,82	0,0168	0,1295	0,29	4,96
140997	5,79	0,0066	0,0811	0,18	3,12
150997	5,22	0,0077	0,088	0,19	3,76

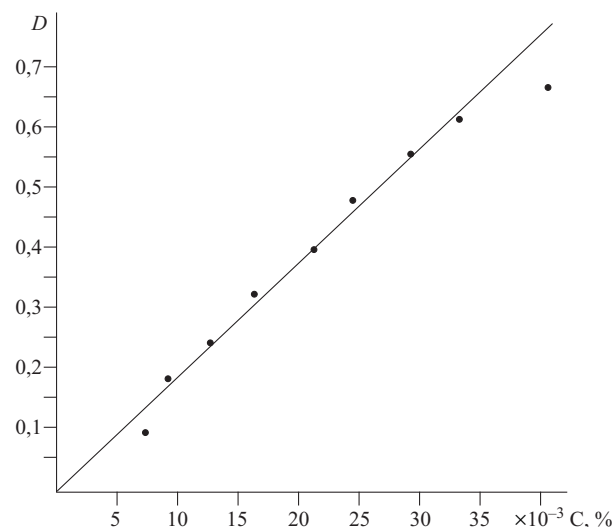


Рис. 3. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов в экстракте водяники густом.

влагу, содержание тяжёлых металлов, микробиологическую чистоту.

Потеря в массе при высушивании определена по методу ГФ ХІ изд. [4] на образцах 5 серий; исходя из полученных данных, потеря в массе при высушивании ограничена 8 %.

Тяжелые металлы определены в зольном остатке по методике, приведенной в ГФ ХІ изд. [4]. 1 г густого экстракта должен выдерживать испытания на тяжелые металлы (не более 0,001 % в препарате).

По микробиологической чистоте экстракт соответствует ГФ ХІ изд. [5], согласно требованиям которой в нестерильных лекарственных средствах не допускается наличие патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. В 1 г лекарственного средства для приема внутрь допускается наличие не более 1000 бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно).

Таблица 2
Результаты определения 2',4'-ДГХ в густом экстракте с добавками*

Найдено 2',4'-ДГХ в экстракте, г	Добавлено 2',4'-ДГХ, г	Должно быть 2',4'-ДГХ, г	Найдено 2',4'-ДГХ, г	Ошибка, $\pm \%$
0,0050	0,0009	0,0059	0,0060	1,63
			0,0061	3,39
			0,0057	1,63
0,0050	0,0017	0,0067	0,0069	2,99
			0,0068	1,49
			0,0068	1,49
0,0050	0,0026	0,0076	0,0077	1,32
			0,0078	2,63
			0,0078	2,63

* Содержание 2',4'-ДГХ в навеске густого экстракта — 0,0982 г (в м/к 50 мл) с учетом влажности — 5,5 %.

Экспериментальная часть

Густой экстракт получали из водяники черной (*Empetrum nigrum L.*) семейства шикшевых — Empetraceae по технологии, приведенной ранее [1].

В работе использовали рабочий стандартный образец 2',4'-ДГХ, полученный из побегов водяники, представляющий собой желтое кристаллическое вещество со следующими константами: т. пл. 144 – 145 °С (бензол), λ_{\max} нм, этанол, (lg ϵ): 317 (4,7), 345 (4,4) пл., λ_{\min} нм, 245; ИК-спектр (ν , см⁻¹, KBr) 3320, 2980, 1650, 1580, 1520, 1380, 1316, 1250, 1160, 1050, 990 см⁻¹; ¹H ЯМР-спектр (300 МГц, ацетон-d₆, δ , м.д.) 6,45 (1H, д, Н-3', J 2,3 Гц), 6,55 (1H, дд, Н-5', J 9,8 и 2,3 Гц), 7,38 – 7,70 (5H, м), 7,58 (1H, д, J 15 Гц), 7,84 (1H, д, Н-6', J 9,8 Гц), 7,89 (1H, д, J 15 Гц), 9,60 (1H, с, ОН), 13,50 (1H, с, ОН), масс-спектр (U 70 эВ) m/z (отн. инт., %) 240 [M]⁺ (100), 239 [M-H]⁺ (72), 223 [M-OH]⁺ (11), 163 [M-C₈H₅]⁺ (90), 137 [M-C₈H₇]⁺ (35), 104 [C₈H₈]⁺ (39), 103 [C₈H₇]⁺ (36), 77 [C₆H₅]⁺ (44). Литературные данные: т. пл. 145 – 146 °С (бензол), λ_{\max} этанол, нм: 317, 345 [8], ¹H ЯМР-спектр (δ , м.д.) 6,44 (1H, д, J_{6,8} 1,5 Гц), 6,45 (1H, дд, J_{6,8} 1,5 и J_{8,9} 7,9 Гц), 7,03 – 7,74 (5H, м), 7,58 (1H, д, J_{ab} 9,4 Гц), 7,85 (1H, д, J_{8,9} 7,9 Гц), 7,90 (1H, д, J_{ab} 9,4 Гц) [9], масс-спектр m/z (отн. инт., %) 240 [M]⁺ (100), 239 (68), 223 [M-OH]⁺ (11), 163 [M-77]⁺ (84), 137 [M-103]⁺ (86), 103(26), 77 (28) [8].

Методика определения подлинности. Около 0,01 г (точная навеска) густого экстракта водяники растворяют в 1,0 мл хлороформа. 0,005 мл (50 мкг) полученного раствора микропипеткой наносят на линию старта пластинки “Силуфол” размером 3 × 15 см. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают вертикально в камеру с системой растворителей гексан – ацетон – уксусная кислота (20:10:0,1) (без насыщения) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 12 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе и проявляют в фильтрованном УФ-свете при длине волны 254 нм, затем погружают в 0,005 % водный раствор родамина Ж и

мгновенно вынимают, переводя в горизонтальное положение. Затем пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. В УФ-свете на хроматограмме должны обнаруживаться не менее трех пятен коричневого цвета с R_f 0,01; 0,38; 0,45, не менее одного пятна желтого цвета с R_f 0,40 и трех пятен голубого цвета с R_f 0,23; 0,27; 0,63; допускается наличие других пятен и коричневого шлейфа в интервале R_f 0,00 – 0,38. При проявлении пластинки раствором родамина Ж и просматривании в фильтрованном УФ-свете дополнительно появляются четыре пятна желтого цвета с R_f 0,50; 0,55; 0,59; 0,72.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в густом экстракте.

Около 0,1 г (точная навеска) густого экстракта водяники помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл 96 % этанола, растворяют при встряхивании, объем раствора доводят 96 % этанолом до метки (раствор А). 3 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл 2 % этанольного раствора алюминия хлорида и 1,5 мл кислоты хлористоводородной разведенной, доводят объем раствора 96 % этанолом до метки и перемешивают (раствор Б). Через 40 мин измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют смесь из 3 мл раствора А и 1,5 мл кислоты хлористоводородной разведенной, доведенную 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в густом экстракте водяники в пересчете на 2',4'-ДГХ в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 316 \cdot 3 \cdot (100 - W)}$$

где D — оптическая плотность; 316 — удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ комплекса 2',4'-дигидрокси-халкона с алюминия хлоридом; m — точная масса густого экстракта водяники, г; W — потеря в массе при высушивании, %; 50, 3, 25 — разведение.

Установлено, что содержание суммы флавоноидов в густом экстракте водяники в пересчете на 2',4'-ДГХ с учетом потери в массе при высушивании должно быть не менее 4,0 % (табл. 1).

Для установления сроков хранения густого экстракта водяники был проведен контроль всех показателей через каждые полгода в течение трех лет. Кроме того, после указанного срока хранения густого экстракта водяники был проведен фармакологический контроль на антигипоксическую активность. Полученные результаты показали пригодность экстракта водяники густого, обладающего антигипоксической активностью, после трех лет хранения.

По результатам проведенных исследований нами составлен проект фармакопейной статьи предприятия

Таблица 3

Расчет величины удельного показателя поглощения комплекса 2',4'-ДГХ с алюминия хлоридом

Навеска вещества, г	Концентрация раствора, %	Оптическая плотность (D)	Удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$	Среднее значение удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$
0,01510	0,000605	0,192	317	316 ± 2
0,01835	0,000734	0,230	313	
0,02235	0,000894	0,283	317	
0,02455	0,000982	0,309	315	
0,02533	0,001013	0,322	318	
0,03030	0,001212	0,378	312	
0,03213	0,001285	0,405	315	
0,03528	0,001411	0,449	318	

на экстракт водяники густой, обладающий антигипоксической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Ермилова, Т. В. Кадырова, Е. А. Краснов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(11), 26 – 28 (2001).
2. Е. А. Краснов, А. С. Саратиков, Е. В. Ермилова, *Тез. докл. Третьей Украинской конференции по медицинской ботанике*, Ч. 1, Киев (1992), сс. 81 – 82.
3. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии*, Ч. 2., Мир, Москва (1980), сс. 301 – 621.
4. *Государственная фармакопея СССР*, Вып. 1., 11-е изд., Медицина, Москва (1987), сс. 172, 176.
5. *Государственная фармакопея СССР*, Вып. 2., 11-е изд., Медицина, Москва (1989), сс. 330 – 334.
6. J. V. Harborne, T. J. Mabry, *The flavonoids: advance in research*, Chapman and Hall, London, N. Y. (1982).
7. ОСТ № 91500.05.001-00 “Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения”.
8. E. Wollenweber, M. Dorr, R. Stelzer, et al., *Bot. Acta*, **105**, 300 – 305 (1992).
9. N. Tanrisever, F. R. Fronczek, N. Y. Fischer, et al., *Phytochem.*, **26**(1), 175 – 179 (1987).

Поступила 17.12.01.