

Е. С. Артамонова, В. А. Куркин

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ТРАВЫ ЧИСТОТЕЛА БОЛЬШОГО

Государственное общеобразовательное учреждение высшего профессионального образования Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Самара, Россия

Препаративное разделение экстракта чистотела большого с использованием невысоких слоев сорбента (силикагель) позволило нам выделить индивидуальное соединение, которое на основании данных УФ-, ЯМР-спектров и непосредственным сравнением с достоверным образцом идентифицировано как коптизин. В качестве методов качественного и количественного анализа алкалоидов травы чистотела большого предложены ТСХ-анализ и спектрофотометрия (аналитическая длина волны 360 нм). Обоснована необходимость использования в этих методиках ГСО коптизина. Суммарное содержание алкалоидов в траве чистотела большого варьирует в пределах от 0,9 до 1,75 % (в пересчете на коптизин). Ошибка единичного определения суммы алкалоидов в траве чистотела большого с достоверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,40$ %.

Трава чистотела большого (*Chelidonium majus* L., сем. Маковые — *Papaveraceae*) издавна применяется в медицинской практике и обладает разносторонней фармакологической активностью, которая обусловлена присутствием ряда природных биологически активных соединений (алкалоиды, флавоноиды, сапонины, аскорбиновая кислота, каротиноиды, органические кислоты) [1, 2]. Ранее учеными СамГМУ было установлено, что вопреки общепринятому мнению основным компонентом является не хелидонин, а коптизин (вещество красного цвета), который определяет окраску млечного сока [3, 4]. Кроме того, разработано новое лекарственное средство “Чистотела настойка”, а также методики качественного и количественного определения суммы алкалоидов в траве чистотела большого и в настойке чистотела [5, 6]. Однако, учитывая возрастающий интерес к Государственным стандартным образцам, актуальным является разработка стандартного образца коптизина, с помощью которого можно более объективно оценивать качество сырья и препаратов на его основе.

Цель настоящих исследований — разработка объективных методов стандартизации травы чистотела большого и препаратов на его основе.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования служили образцы травы чистотела большого, собранные в период с мая по июль 2005 и 2006 гг. в окрестностях г. Самары и Самарской области (окр. с. Воскресенка); водно-спиртовые извлечения из воздушно-сухой и свежесобранной травы чистотела большого; образцы настойки чистотела большого, полученные по разработанной технологии и стандартными методами, и рабочий стандартный образец (PCO) коптизина.

Измельченное (3–5 мм) воздушно-сухое растительное сырье чистотела большого (150 г) экстрагировали десятикратным количеством 70 % этилового спирта методом настаивания. Для полного истощения сырья 2

последующие экстракции проводили в условиях кипящего растворителя. Объединенные экстракты упаривали на ротационном упарителе под вакуумом при температуре 40–60 °С. Сгущенный экстракт высушивали на силикагеле L 40/100 (30 г).

Препаративное разделение экстрактивных веществ осуществляли методом адсорбционной колоночной хроматографии с использованием силикагеля марки L 40/100 мкм (Чехия). В хроматографическую колонку на слой силикагеля, сформированный в хлороформе (высота сорбента — 8 см, диаметр — 6 см), переносили сухой порошок (экстракт + силикагель). Колонку элюировали хлороформом, а также хлороформом, содержащим в различных концентрациях этиловый спирт (3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40 %).

Фракции, содержащие коптизин, объединяли, упаривали до небольшого объема и оставляли для кристаллизации. Выпавший осадок отделяли и перекристаллизовывали из воды. Отсутствие примесей в получаемых соединениях контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Полученное вещество имеет следующие физико-химические константы: т. пл. от 284 до 286 °С, λ_{\max} в этаноле 280, 360, 460 нм. ¹H ЯМР-спектр соединения в смеси *d*-аcetона и D₂O (1:1) содержит сигналы протонов, характерные для молекулы коптизина: 4 однопротонных синглетных сигнала при 9,79 м. д. (С-8), 8,76 м. д. (С-13), 7,87 м. д. (С-1) и 7,61 м. д. (С-4), 2 двухпротонных триплета с константой спин-спинового взаимодействия (J) 6 Гц при 3,29 (С-5) и 4,95 м. д. (С-6), 2 двухпротонных дублетных сигнала (J = 9 Гц) при 6,90 м. д. (С-11) и 7,98 м. д. (С-12), а также 2 двухпротонных синглетных сигнала при 6,09 и 6,45 м. д., принадлежащих метилendioксигруппам при С-2,3 и С-9,10 соответственно. Выделенное соединение на основании данных УФ-, ЯМР-спектров и непосредственным сравнением с достоверным образцом идентифицировано как коптизин.



Разработка ГСО коптизина позволит более объективно оценивать качество сырья и препаратов на основе чистотела большого, а также разработать унифицированные методики в ряду ЛРС — субстанция — лекарственная форма. В настоящее время проводится дальнейшее изучение выделенного вещества, а также разработка проекта Фармакопейной статьи “Коптизин — стандартный образец”.

С использованием РСО коптизина разработаны методики качественного и количественного анализа водно-спиртовых извлечений из травы чистотела большого. ТСХ-анализ экстрактов проводили в системе растворителей хлороформ — метанол — вода (26:14:3). Для анализа использовали пластинки “Сорбфил ПТСХ-ПА-УФ” (Россия). Пластинки предварительно активируют в сушильном шкафу не менее 1 ч при температуре 100 – 105 °С для четкого разделения компонентов. С той же целью хроматографическую камеру насыщают парами системы растворителей не менее 24 ч.

Методика качественного анализа травы чистотела большого методом ТСХ. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через фильтр (красная полоса) и охлаждают в течение 30 мин (извлечение из травы). На стартовую линию пластинки “Сорбфил ПТСХ-ПА-УФ” (Россия) наносят микропипеткой 0,02 мл извлечения и 0,02 мл раствора РСО коптизина. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, затем помещают в камеру со смесью растворителей хлороформ — метиловый спирт — вода (26:14:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 9 см, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе в течение 5 мин. Пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм до и после обработки хроматограмм реактивом Драгендорфа. При этом на хроматограмме на уровне пятна РСО коптизина обнаруживается доминирующее пятно с величиной R_f около 0,45, имеющее желтую окраску в видимом

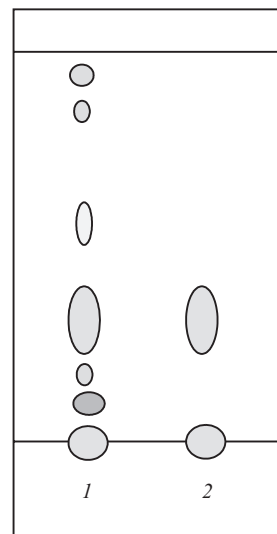


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из травы чистотела большого. 1 — Водно-спиртовое извлечение из травы чистотела большого. 2 — Раствор РСО коптизина.

свете и ярко-желтую флуоресценцию при просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 366 нм, а также кирпично-красную окраску при проявлении реактивом Драгендорфа (коптизин) (рис. 1).

Примечания

1. *Подготовка пластинок.* Пластинки “Сорбфил ПТСХ-ПА-УФ” (Россия) разрезают поперек линий накатки на 3 части размером 15 × 5 см и высушивают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 1 ч.

2. *Приготовление раствора РСО коптизина.* Около 0,02 г коптизина (точная навеска) растворяют в 15 мл этилового спирта 95 % в мерной колбе вместимостью 25 мл при нагревании на водяной бане при температуре от 70 до 90 °С. Раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки 95 % этиловым спиртом и перемешивают (раствор А). Помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл 1 мл раствора А, доводят объем раствора до метки спиртом 95 % и перемешивают (раствор Б).

С целью разработки методики количественного определения суммы алкалоидов в траве чистотела большого изучены УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из данного сырья (рис. 2). Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра Specord 40 (Analytik Jena). Раствором сравнения служил 95 % этиловый спирт.

С целью исключения завышенных результатов анализа нами введена стадия очистки водно-спиртового извлечения на оксиде алюминия. Полученный при этом очищенный элюат (испытуемый раствор) имеет характер кривой поглощения, близкий к таковому раствора РСО коптизина (рис. 3). Это находится в соответствии с результатами препаративного выделения коптизина, на долю которого, по нашим предварительным оценкам, приходится 50 % от всей суммы алкалоидов травы чистотела большого.

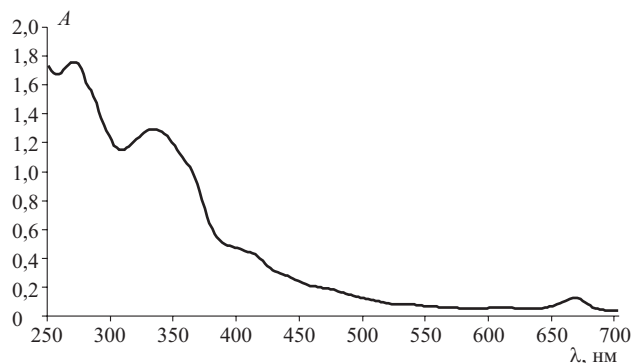


Рис. 2. УФ-спектр водно-спиртового извлечения травы чистотела большого

Так, УФ-спектр раствора РСО коптизина имеет максимумы поглощения при длине волны 280, 360 и 460 нм (рис. 4).

При этом наиболее показательным и для УФ-спектров раствора коптизина и очищенного испытуемого раствора является максимум поглощения при длине волны 360 нм. В качестве аналитической была выбрана длина волны 360 нм еще и по той причине, что в этой области поглощают и другие алкалоиды [7], содержащиеся в траве чистотела большого (хелидонин, сангвинарин, хелеритрин, берберин и др.) (табл. 1). Опыты с коптизином показали, что потери алкалоидов в условиях очистки на оксиде алюминия не наблюдаются.

Методика количественного анализа суммы алкалоидов в траве чистотела большого. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через фильтр (красная полоса) и охлаждают в течение 30 мин (извлечение из травы). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл извлечения наносят на колонку с оксидом алюминия, алкалоиды элюируют 20 мл 70 % этанола в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем

Таблица 1
Сравнительная характеристика УФ-спектров некоторых алкалоидов травы чистотела большого

Наименование алкалоида	λ_{\max} , нм
Хелидонин	289
Сангвинарин	285, 323, 358пл.
Хелеритрин	283, 330, 340пл.
Берберин	350, 429
Коптизин	280, 350пл., 360, 460

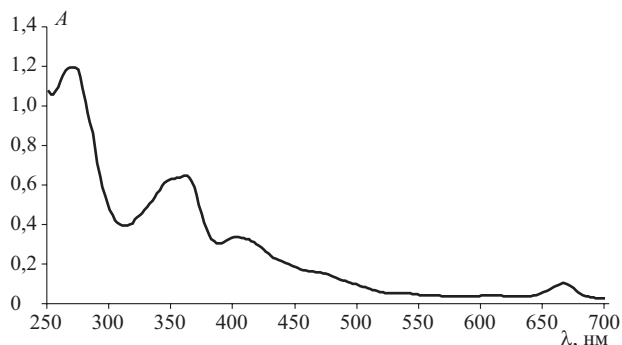


Рис. 3. УФ-спектр водно-спиртового извлечения травы чистотела большого, очищенного через оксид алюминия

раствора 70 % этанолом до метки и перемешивают (раствор А).

В качестве раствора сравнения используют 70 % этанол. Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 360 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора РСО коптизина при длине волны 360 нм (методику приготовления см. выше).

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на коптизин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 30 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 — оптическая плотность раствора РСО коптизина; m — масса сырья, г; m_0 — масса РСО коптизина, г; W — потеря в массе при высушивании в %.

С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов сырья и установлено, что содержание алкалоидов в траве чистотела большого варьирует в пределах от 0,90 до 1,75 %.

Метрологические характеристики разработанной методики количественного анализа суммы алкалоидов в траве чистотела большого методом спектрофотометрии с использованием РСО коптизина представлены в табл. 2.

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы алкалоидов в траве чистотела большого с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,40$ %.

Опыты с добавками РСО коптизина к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует

Таблица 2
Метрологические характеристики спектрофотометрической методики количественного определения суммы алкалоидов в траве чистотела большого

f	\bar{X}	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	1,59	0,0001	0,01	95	2,23	0,07	$\pm 4,40$

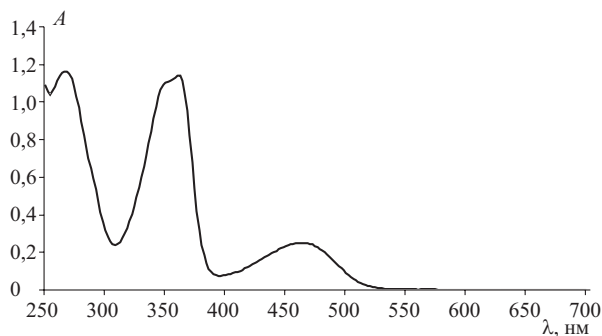


Рис. 4. УФ-спектр спиртового раствора коптизина

об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (опыты с добавками) (табл. 3).

Таким образом, выделено индивидуальное соединение, которое на основании данных УФ-, ЯМР-спектров и непосредственным сравнением с достоверным образцом идентифицировано как коптизин. В качестве методов качественного и количественного анализа алкалоидов травы чистотела большого предложены ТСХ-анализ и спектрофотометрия (аналитическая длина волны 360 нм). Обоснована необходимость использования в этих методиках ГСО коптизина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Н. Ерофеева, В. Н. Бубенчикова, Е. В. Баркалая, *Фармация*, **46**(6), 39 – 41 (1997).

Таблица 3
Содержание алкалоидов в сырье чистотела большого в зависимости от добавления коптизина

Исходное содержание суммы алкалоидов, мг/г	Добавление коптизина, мг/г	Содержание суммы алкалоидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная, мг	относительная, %
9,00	2,00 (в сырье)	11,00	10,85	- 0,15	- 1,38
9,00	4,50 (в сырье)	13,50	13,55	+ 0,05	+ 0,37
9,00	6,50 (в сырье)	15,50	15,48	- 0,02	- 0,13

2. В. А. Куркин, *Фармакогнозия (Учебник для студентов фармацевтических вузов)*, ООО “Офорт”, ГОУВПО “СамГМУ”, Самара (2004).

3. С. В. Первушкин, А. А. Сохина, В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, *Фармация*, **48**(2), 26 – 27 (1999).

4. А. А. Сохина, С. В. Первушкин, В. А. Куркин, Л. Д. Климова, *Труды VIII Международного конгресса “Актуальные проблемы экологии человека”*, Самара, 3 – 5 декабря 2002 г., Самара (2002), сс. 221 – 222.

5. А. А. Сохина, С. В. Первушкин, В. А. Куркин и др., *Материалы V Всероссийской научно-практической конференции “Здоровый образ жизни — системный подход”*, (1998), сс. 125 – 127.

6. А. А. Сохина, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Самара (1999).

7. Б. Ю. Кикалишвили, В. Ю. Вачнадзе, *Мед. новости Грузии*, **11**(104), 97 – 100 (2003).

Поступила 13.03.07

DEVELOPING METHODS FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF *Chelidonium majus* HERBS

E. S. Artamonova and V. A. Kurkin

Samara State Medical University, Samara, Russia

Using preparative separation of extract from greater celandine (*Chelidonium majus* L.) herbs by column chromatography on short columns of silica gel, an individual compound has been isolated, which is identified as coptisine on the basis of UV and NMR spectroscopy data. Qualitative and quantitative estimation of the total alkaloid contents in *Chelidonium majus* herbs is performed using of TLC analysis and spectrophotometry (analytical wavelength, 360 nm). The need for using a state standard sample of coptisine is substantiated. The total content of the alkaloids in *Chelidonium majus* herbs varies within 0.90 – 1.75% (recalculated for coptisine). The relative error of determination of the total alkaloid content using the proposed method at a confidence probability of 0.95 does not exceed $\pm 4.40\%$.