

ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

М.Н. Вернигорова, Г.Н. Бузук

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА В ЦВЕТКАХ БУЗИНЫ ЧЕРНОЙ (*SAMBUCUS NIGRA* L.) ХРОМАТОДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Проанализированы извлечения из цветков бузины черной методом ВЭЖХ и хроматоденситометрическим методом. Подобраны система растворителей, концентрация реагента-проявителя для хроматоденситометрической методики определения рутина в цветках бузины черной. Изучен характер зависимости цветометрических характеристик зон рутина от его количества в хроматографической зоне. Относительная погрешность предложенной методики составляет 1,89%. Правильность предложенной методики проверена путем сравнения с методикой ВЭЖХ. Результаты, полученные по предложенной методике, статистически не отличаются от результатов методики сравнения: $t_{\text{экс}} < t_{\text{крит}}$; $t_{\text{экс}} = 1,89$; $t_{\text{крит}} (p=0,05; f=10) = 2,23$.

Ключевые слова: Sambucus nigra L., бузина черная, цветки бузины черной, ВЭЖХ, хроматоденситометрический метод, хроматографическая зона.

ВВЕДЕНИЕ

В ассортименте любой современной аптеки всегда присутствует лекарственное растительное сырье (ЛРС), а также лекарственные средства на основе экстрактов либо отдельных веществ, выделенных из лекарственных растений. Поэтому разработка новых и совершенствование уже существующих методов контроля качества ЛРС были и остаются актуальными. В статье приведены два способа, используемых для определения рутина в цветках бузины черной. Цветки бузины черной являются перспективным ЛРС. Опыт применения бузины известен еще с древних времен. Настой из цветков бузины черной принимали при ревматизме, подагре, заболеваниях почек и отеках. В настоящее время настои применяются в качестве потогонного средства при простудных заболеваниях, при ангинах и бронхитах. Существуют также лекарственные средства, содержащие экстракт цветков бузины черной, такие как «Новопасит», «Синупрет» и другие.

Фармакологические свойства цветков бузины черной обусловлены содержанием в них органических кислот (яблочная, уксусная, валериановая); фенолкарбоновых кислот, витаминов С, А, В₆, флавоноидов (рутин, кверцетин, кемпферол, астрагаллин), антоцианов [1, 2].

Стандартизацию цветков бузины чер-

ной проводят по изокверцитрозиду и рутину [3–5]. В ГФ РБ предложен спектрофотометрический способ количественного определения рутина в цветках бузины черной, основанный на измерении оптической плотности окрашенного продукта реакции флавоноидов с алюминия хлоридом. Однако данный способ достаточно длительный [6].

Несмотря на то, что метод ВЭЖХ широко используется в аналитических лабораториях, он является дорогостоящим и требует специального оборудования. Хроматоденситометрический метод может осуществляться на более дешевом оборудовании и с наименьшими временными затратами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали цветки бузины черной, заготовленные в июне 2013 г. в местах естественного произрастания в окрестностях г. Витебска (Республика Беларусь). Образцы подвергали воздушно-теневого сушке. До проведения анализа образцы хранились в бумажных пакетах при комнатной температуре.

Определение рутина в цветках бузины методом ВЭЖХ выполняли на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100 в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A,

диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A. Обработку хроматограмм проводили с помощью программы Agilent ChemStation.

К навеске сырья массой 0,1 г прибавляли 5 мл экстрагента. Экстракцию проводили на водяной бане. Центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в чистую емкость. Определение рутина методом ВЭЖХ проводили на хроматографической колонке Zorbax StableBondC-18 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм, температура колонки 30°C. В качестве подвижной фазы использовали раствор 0,01 М калия дигидрофосфата Р (значение рН=3,0±0,2 создается при помощи фосфорной кислоты Р) и ацетонитрил для хроматографии, скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем инжестируемой пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длине волны 360 нм.

В качестве стандарта использовали рутин (Sigma). Стандартный раствор рутина готовили путем растворения 5 мг стандартного образца (СО) рутина в 10 мл спирта этилового (70% об/об) Р. Содержание рутина рассчитывали по формуле (1):

$$X = \frac{S_x \times C \times 0,5}{S_r \times m}, \quad (1)$$

где X – содержание рутина (%) в исследуемом экстракте;

S_x – площадь пика рутина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_r – площадь пика рутина на хроматограмме стандартного раствора;

C – содержание рутина в растворе сравнения, мг/мл;

m – масса навески испытуемого сырья, г.

Хроматоденситометрическое определение рутина в цветках бузины черной проводили по разработанной методике, включающей экстракцию рутина из ЛРС, разделение экстракта в тонком слое силикагеля, проявление хроматограммы гидроксидом натрия, преобразование проявленной хроматограммы в ее цифровое изображение, последующую обработку цифрового изображения в программе Imagej.

Эффективность экстракции определяли по площадям пиков хроматографических зон рутина, полученных на хроматограмме.

Количественное определение рутина в цветках бузины черной хроматоденситометрической методикой проводили поэтапно. Готовое извлечение в количестве 3 мкл капилляром наносили на хроматографическую пластинку с тонким слоем силикагеля в виде полос. В том же количестве наносили стандарт рутина. Пластинку с нанесенным извлечением из цветков бузины черной и стандартным раствором рутина помещали в камеру с системой н-бутанол:кислота уксусная концентрированная:вода (4:1:2). Хроматограмму проявляли 5% раствором натрия гидроксида. Проявленные зоны адсорбции рутина в извлечении из цветков бузины черной и СО рутина сканировали и обрабатывали при помощи компьютерной программы Imagej. Содержание рутина определяли по площади пика хроматографической зоны рутина в извлечении из цветков бузины черной в пересчете на содержание рутина в хроматографической зоне СО по формуле (1). Далее в этом же извлечении определяли содержание рутина методом ВЭЖХ.

Также в ходе эксперимента определяли наибольший выход рутина при различных условиях экстракции. Для этого были приготовлены экстракты из цветков бузины черной с различным измельчением сырья (от 0,25 до 2 мм), временем экстракции (от 20 мин до 90 мин) и типом экстрагента (вода, спирт этиловый в различных концентрациях). Определение рутина параллельно проводили методами хроматоденситометрии и ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления характера зависимости интенсивности окраски зон СО рутина от его количества в исследуемой зоне наносили различные количества рутина на хроматографическую бумагу в количестве от 1 мл до 8 мл (рисунок 1) и хроматографическую пластину в количестве от 1 мкл до 8 мкл (рисунок 3). Далее хроматографическую бумагу обрабатывали 5% раствором натрия гидроксида и тем же раствором обрабатывали хроматографическую пластину после разделения в тонком слое сорбента. Полученные желтые зоны адсорбции рутина сканировали и с помощью программы Imagej получали денситограммы исследуемых растворов (рисунки 2, 4).

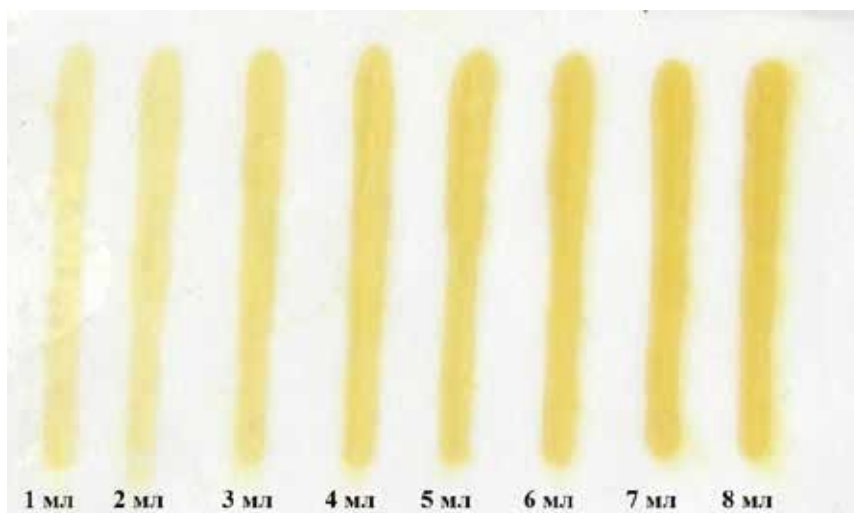


Рисунок 1 – Окрашенные зоны СО рутина, нанесенные на хроматографическую бумагу в количестве от 1 до 8 мл, после обработки 5% спиртовым раствором NaOH

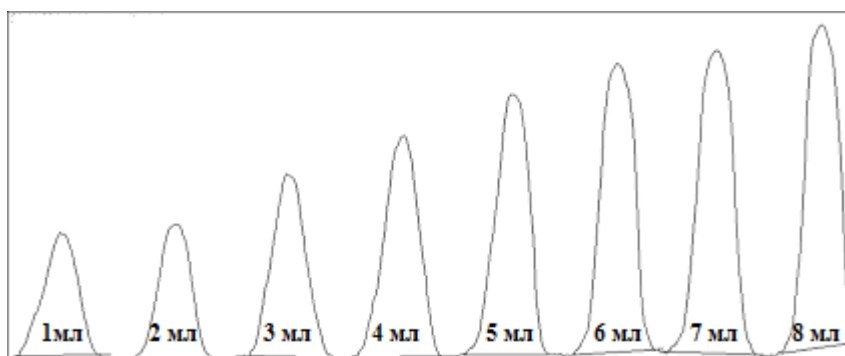


Рисунок 2 – Денситограмма СО рутина в количестве от 1 до 8 мл

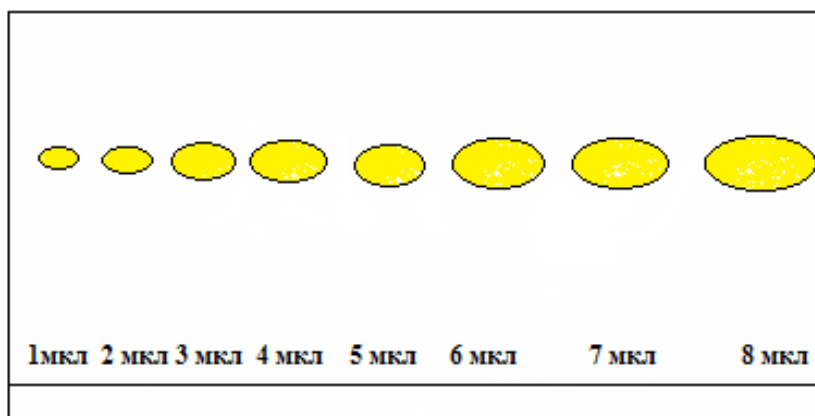


Рисунок 3 – Хроматограмма в тонком слое сорбента СО рутина, нанесенного в количестве от 1 мкл до 8 мкл, после обработки 5% спиртовым раствором NaOH

На денситограммах прослеживается зависимость высоты и площади пиков интенсивности окраски хроматографических зон рутина от его количества в хроматографической зоне.

По результатам эксперимента были построены градуировочные графики зависимости площади (в пикселях) пиков окраски пятен рутина от его количества в хроматографической зоне (рисунки 5,6).

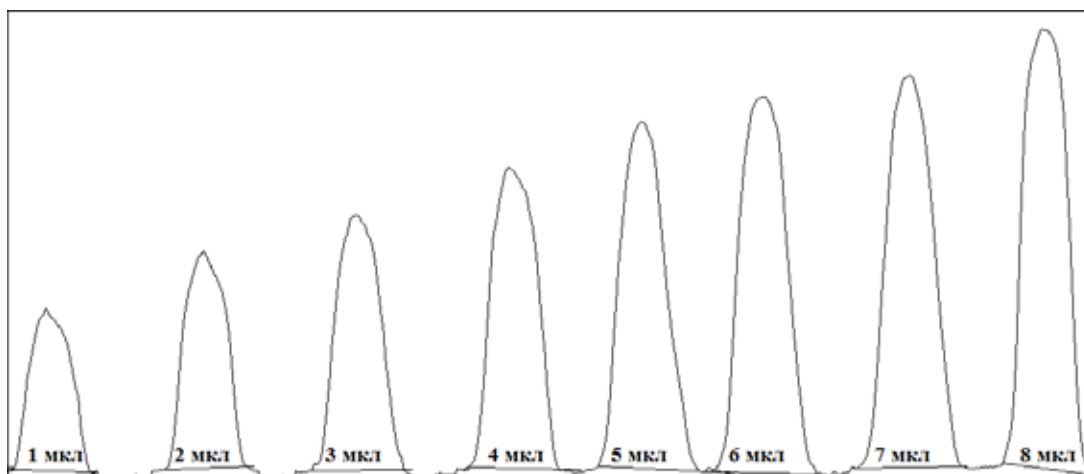


Рисунок 4 – Денситограмма стандартных образцов рутина в объеме от 1 мкл до 8 мкл

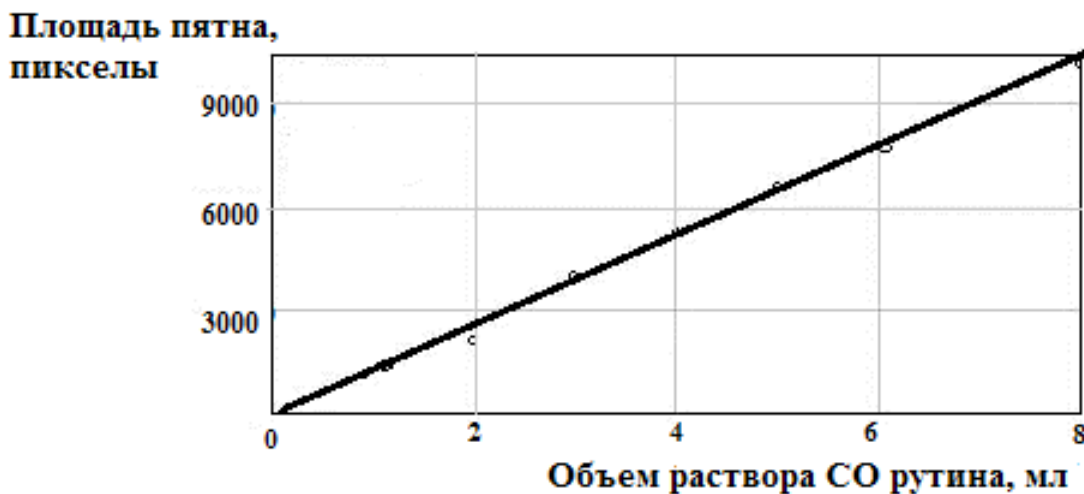


Рисунок 5 – График зависимости площади пятна (в пикселях) от количества рутина в хроматографической зоне на бумаге

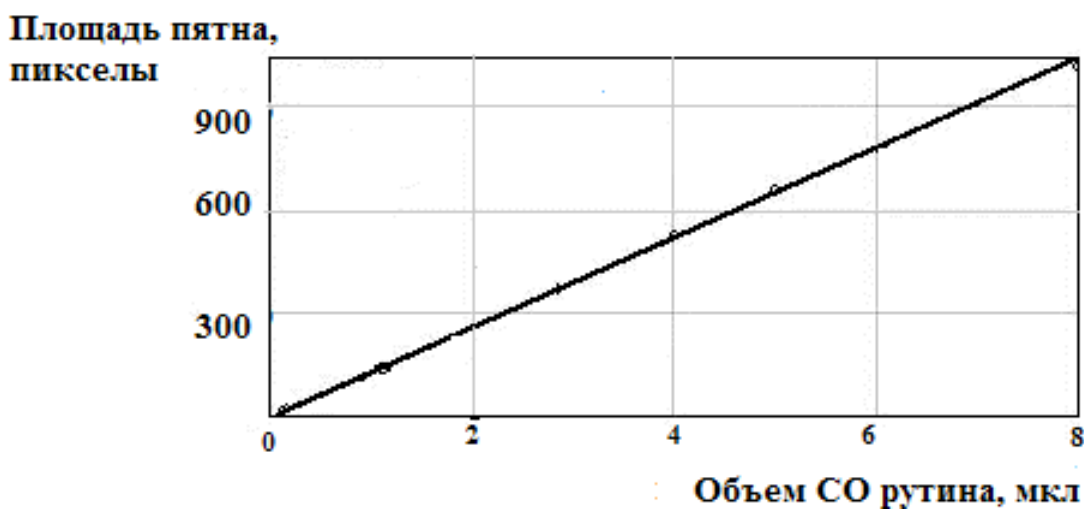


Рисунок 6 – График зависимости площади пятна (в пикселях) от количества рутина в хроматографической зоне в тонком слое сорбента

На рисунках 5 и 6 наблюдается линейная зависимость между площадью пиков окраски пятен рутина и его количества в хроматографической зоне. Уравнение градуировочного графика:

$$Y = a + bX = 1027,8 + 1153,8X$$

$$(R^2 = 0,994)$$

Таким образом, полученные результаты дают возможность использовать данную методику для количественного определения рутина в извлечении из цветков бузины черной.

Для сравнения результатов определе-

ния рутина в извлечении из цветков бузины черной методами ВЭЖХ и хроматоденситометрии использовали извлечение, полученное с использованием спирта (70% об/об, P). Данный образец проанализирован на содержание рутина методом ВЭЖХ и параллельно хроматоденситометрией (рисунок 7). Содержание рутина в извлечении из цветков бузины черной, определенное методом ВЭЖХ, составило 1,84%, по хроматоденситометрической методике – 1,85%.

Метрологические данные результатов количественного определения рутина представлены в таблице.

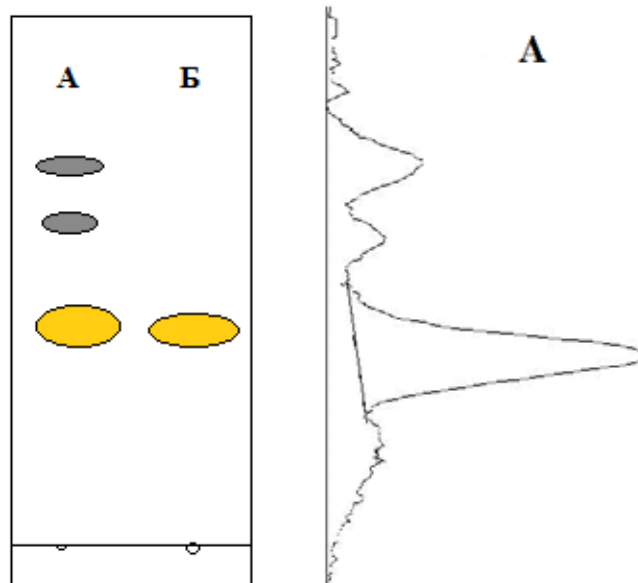


Рисунок 7 – Хроматограмма в тонком слое сорбента извлечения цветков бузины (А), стандартного раствора рутина (Б) и денситограмма извлечения цветков бузины

Таблица – Метрологическая характеристика методики количественного определения рутина в цветках бузины черной

$\bar{X}, \%$	n	S	S ²	t(p,f)	Δx	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{n=3}, \%$
1,9	10	0,06	0,003	2,23	0,04	1,89	1,09

Как можно видеть из приведенных в таблице данных, относительная погрешность предложенной методики не превышает 1,89%.

Правильность [7] разработанной методики проверяли, сравнивая полученные результаты с результатами определения рутина в цветках бузины черной методом ВЭЖХ.

Результаты, полученные по предложенному нами методу, статистически не отличаются от результатов метода сравнения: $t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}}$; $t_{\text{эксп}} = 1,89$; $t_{\text{крит}} (p=0,05; f=10) = 2,23$.

Далее изучены оптимальные условия

эффективной экстракции рутина из цветков бузины черной. Для этого проанализированы образцы извлечений с различной степенью измельчения сырья (рисунок 8), временем экстракции (рисунок 9) и различным типом экстрагента (рисунок 10).

Установлено, что максимальная экстракция рутина из цветков бузины черной достигается при степени измельчения сырья 0,25 – 0,5 мм. Оптимальное время экстракции – 40 мин. Наиболее полная экстракция рутина из цветков бузины черной происходила при использовании спирта этилового (70%, об/об) P.

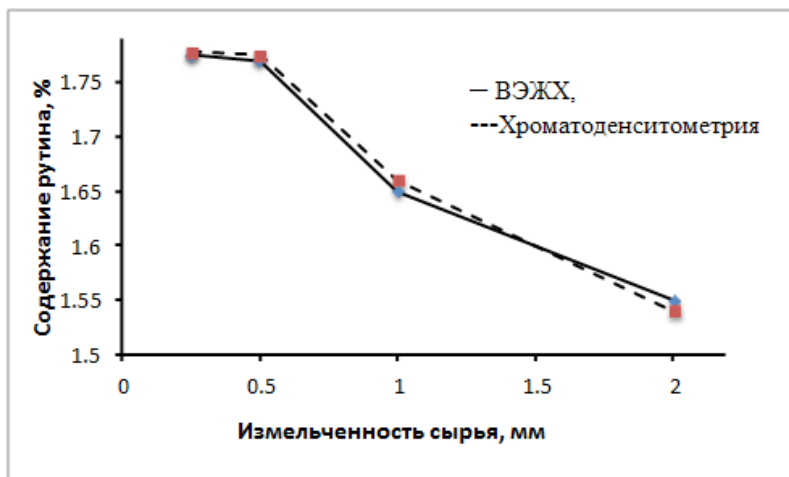


Рисунок 8 – Зависимость степени экстракции рутина из цветков бузины черной от измельченности сырья

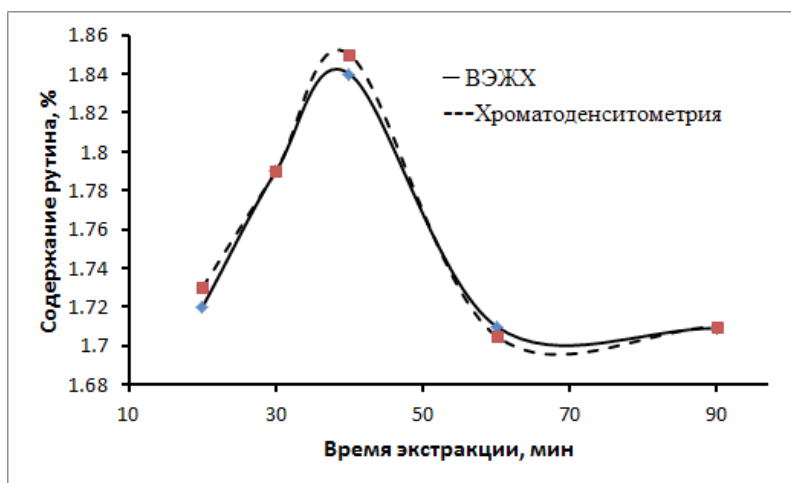


Рисунок 9 – Зависимость степени экстракции рутина от времени экстракции

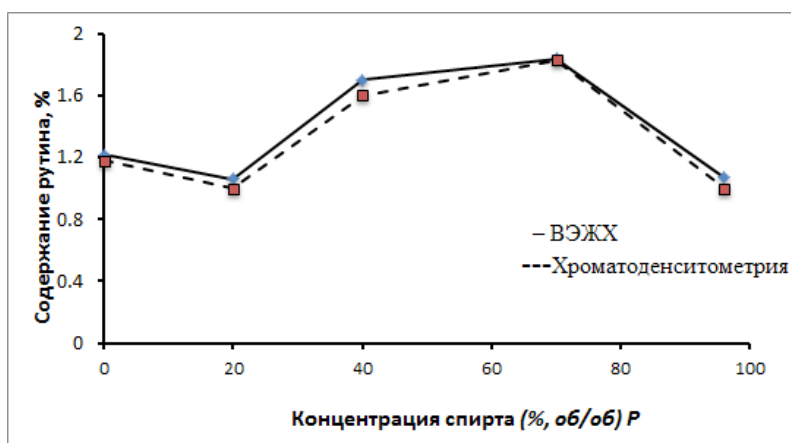


Рисунок 10 – График зависимости экстракции рутина (%) от концентрации спирта этилового (% об/об) P

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнительное определение степени извлечения рутина из цветков бузины черной методами ВЭЖХ и хроматоденситометрии. Установлено, что между результатами, полученными двумя методами, нет статистически достоверных отличий, что дает возможность использовать хроматоденситометрический метод наравне с методом ВЭЖХ.

2. Установлены оптимальные условия экстракции рутина из цветков бузины черной: степень измельченности сырья – 0,5 мм; тип экстрагента – спирт этиловый (70%, об/об) *P*; время экстракции – 40 мин.

SUMMARY

M.N. Vernigorova, G.N. Buzuk
THE DETERMINATION OF RUTIN
IN FLOWERS OF BLACK ELDER
(*SAMBUCUS NIGRA* L.) BY
CHROMATODENSITOMETRIC METHOD

Extracts from flowers of black elder by HPLC method and chromatodensitometric method are analysed. The system of solvents, concentration of reagent-developer for a chromatodensitometric method of determination of rutin in black elder flowers are selected. Optimum conditions of extraction of rutin from black elder are selected. The correctness of the suggested technique has been tested by means of comparing with the HPLC method. The results, obtained according to the suggested methodics, do not differ statistically from the results of the comparative methodics: $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}}=1,89$; $t_{\text{crit}}(p=0,05; f=10)=2,23$.

Keywords: *Sambucus nigra* L., black elder, flowers of black elder, HPLC, chromatodensitometric method, chromatographic zone.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аносова, О.Г. Химический состав различных видов бузины (*Sambucus* L.) и их

применение в медицине / О.Г. Аносова, Д.М. Попов // Фармация. – 1996. – Т. 45. – №1.

2. Перспектива создания жидкого экстракта из цветков бузины черной, произрастающей на Северном Кавказе / С.А. Рожнова [и др.] // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. – 1999. – С. 44 – 45.

3. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions / M. Ozgen [et al.] // Pharm. Magazine. – 2010. – Vol. 23. – P. 198 – 203.

4. Куркин, В.А. Флавоноиды наземной части *Hypericum perforatum* L. / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // Химия природных соединений. – 2007. – № 5. – С. 512 – 513.

5. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», 2007. – 1239 с.

6. Бузины черной цветки / Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2: Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Типография «Победа», 2008. – С. 326 – 328.

7. Дёрффель, К. Статистика в аналитической химии / К. Дёрффель; под ред. Ю.П. Адлера. – М.: Мир., 1994. – 267 с.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра фармакогнозии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8(0212) 37-09-29,
Вернигорова М.Н.

Поступила 14.04.2014 г.