

УДК 615.32: 547.9

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ПЕРЦА ВОДЯНОГО (POLYGONUM HYDROPIPER L.)

Куркина А.В.*ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, e-mail: kurkina-av@yandex.ru*

В настоящей работе обсуждаются результаты исследований в области стандартизации сырья перца водяного (*Polygonum hydropiper* L.). Из травы исследуемого растения выделены доминирующие флавоноиды пиностробин, а также новое природное соединение – 2',6'-дигидрокси-4',5'-диметоксихалкон (полигохалкон), имеющие диагностическое значение. Разработаны методики качественного анализа травы перца водяного с использованием тонкослойной хроматографии (обнаружение пиностробина) и спектрофотометрии (максимум поглощения при длине волны 283 ± 3 нм и «плечо» при 340–360 нм). Разработана методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве перца водяного с использованием дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 394 нм. Определено, что содержание суммы флавоноидов в траве перца водяного варьируется от 2,47 до 4,45% (в пересчете на пиностробин). Ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов с доверительной вероятностью 95% составляет + 4,08%.

Ключевые слова: перец водяной, *Polygonum hydropiper* L., трава, флавоноиды, халконы, флаваноны, пиностробин, полигохалкон, колоночная хроматография, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, стандартизация

THE NEW PATHWAYS TO THE STANDARDIZATION OF THE DRUGS OF POLYGONUM HYDROPIPER L.

Kurkina A.V.*Samara State Medical University, Samara, e-mail: kurkina-av@yandex.ru*

In the present paper are discussed the results of the investigations in the field of standardization of plant material of *Polygonum hydropiper* L. There were isolated from the investigated plant the predominant flavonoids pinostrobin and also a new natural compound – 2',6'-dihydroxy-4',5'-dimethoxychalcone (polygochalcone), which have the diagnostic significance. There was developed the methods of qualitative analysis of *Polygonum hydropiper* L. herbs with using of thin layer chromatography (determination of pinostrobin) and spectrophotometry (the maximum of absorption at 283 ± 3 nm and «shoulder» at 340–360 nm). There was developed the method of quantitative determination of total flavonoids *Polygonum hydropiper* L. herbs using differential spectrophotometry with analytical wavelength at 394 nm. There was established that the content of total flavonoids in the *Polygonum hydropiper* L. herbs varies from 2,47 to 4,45% (calculated on pinostrobin). The relative degree of the determination of the total flavonoids in the *Polygonum persicaria* L. herbs in developed method with confidence probability 0,95 is no more than + 4,15%.

Keywords: polygonum hydropiper L., herb, flavonoids, flavanones, chalcones, pinostrobin, polygochalcone, column chromatography, thin layer chromatography, spectrophotometry, standardization

Фармакологическое действие лекарственных препаратов на основе травы перца водяного, или горца перчатого (*Polygonum hydropiper* L., сем. Гречишных – *Polygonaceae*) обусловлено целым рядом веществ, в том числе флавоноидами [3, 5], однако литературные данные относительно их компонентного состава достаточно противоречивы. Так, в отечественной литературе сообщается, что в траве перца водяного содержатся кверцетин, кемпферол, лютеолин, мирицетин, изорамнетин, рамназин, кверцитрин, гиперозид, 7-метилловый эфир персикарина, рутин [3, 5]. По данным зарубежных ученых [6–8], в траве данного растения наряду с кверцетином и кверцитрином содержатся таксифолин, кверцетин-3-сульфат, (+)-катехин. На наш взгляд, это обстоятельство является причиной того факта, что вопросы стандартизации сырья данного растения решены не в полной мере. Так, в фармакопейной статье 57 Государственной фармакопеи СССР XI издания

[1] имеются разделы «Качественные реакции» и «Количественное определение», однако они не лишены недостатков. В разделе «Качественные реакции» используется лишь пробирочная реакция с раствором алюминия хлорида, хотя в настоящее время для этих целей в современной фармации успешно используются такие методы, как тонкослойная хроматография (ТСХ) и УФ-спектроскопия [2, 4]. Что касается раздела «Количественное определение», то он также не лишен недостатков. Данная методика слишком громоздка, так как предусматривает многократную экстракцию в условиях кислотного гидролиза.

Цель настоящей работы – научное обоснование новых подходов к стандартизации сырья перца водяного.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служила надземная часть перца водяного, заготовленная в июле 2012 г. в Самарской обл. (с. Рождествено). Воздушно-сухую надземную часть перца водяного (100 г) подверга-

ли исчерпывающему экстрагированию 70% этиловым спиртом, сочетая при этом способ мацерации (24 ч) с последующей экстракцией при температуре 85–90 °С. Водно-спиртовые экстракты упаривали под вакуумом до густого остатка (около 50 мл). Сгущенный экстракт высушивали на силикагеле L 40/100 и полученный порошок (экстракт + силикагель) наносили на слой силикагеля, сформированный в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях. Контроль за разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системах «хлороформ-этанол» (9:1), «хлороформ-метанол-вода» (26:14:3), а также «*n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода» (4:1:2). Соответствующие фракции, содержащие вещества **1** и **2**, были объединены и далее были подвергнуты рехроматографии на колонке с силикагелем L 40/100 с использованием смеси гексана и хлороформа в градиентном режиме. Очистку веществ **1** и **2** осуществляли перекристаллизацией из смеси хлороформ-гексан.

В ходе разработки методики количественного определения содержания суммы флавоноидов изучены УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из травы перца водяного. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате изучения флавоноидного состава надземной части перца водяного выделены и охарактеризованы с использованием ¹H-ЯМР-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии доминирующие флавоноиды: пиностробин (5-гидрокси-7-метоксифлаванон) и новое природное соединение – 2¹,6¹-дигидрокси-4¹,5¹-диметоксихалкон, названный нами полигохалконом.

1. Пиностробин (5-гидрокси-7-метоксифлаванон) – блестящие пластинчатые кристаллы белого цвета состава C₁₆H₁₄O₄, масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): M⁺ 270 (98%), 193 (72), 167 (18), 166 (62),

149 (100), 105 (62), т. пл. 124–126 °C (из смеси хлороформ-гексан). λ_{max} EtOH 290, 325 (пл.) нм. ¹H-ЯМР-спектр в дейтеро-хлороформе (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 12,04 (1 H, с, 5-OH), 7,15–7,60 (5 H-Ar, м), 6,09 (1 H, д, J = 2,5, H-8), 6,07 (1 H, д, J = 2,5, H-6), 5,44 (дд, 4 и 12 Гц, H-2ax), 3,82 (3 H, с, CH₃O), 3,12 (1 H, дд, 12 и 17 Гц, H-3ax), 2,83 (1 H, дд, 4 и 17 Гц, 3-eq).

2. 2¹,6¹-дигидрокси-4¹,5¹-диметоксихалкон – аморфный порошок оранжевого цвета состава C₁₇H₁₆O₅ (M⁺ 300), C₁₇H₁₆O₅, масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): M⁺ 300 (100%), 197 (28), 196 (83), 183 (5), 182 (22), 181 (38), 168 (8), 167 (12), 153 (48), 149 (36), 105 (43), 91 (50). λ_{max} EtOH 351 нм. ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 14,35 (1 H, с, 2¹-OH), 7,92 (1 H, д, 16 Гц, H-β), 7,80 (1 H, д, 16 Гц, H-α), 7,30–7,70 (5 H-Ar, м), 6,08 (1 H, с, H-3¹), 3,95 (3 H, с, 4¹-CH₃O), 3,92 (3 H, с, 5¹-CH₃O).

Результаты исследования флавоноидного состава травы перца водяного свидетельствуют о том, что доминирующими компонентами являются пиностробин (флаванон) и 2¹,6¹-дигидрокси-4¹,5¹-диметоксихалкон (халкон). Нами изучена возможность определения подлинности с использованием ТСХ и УФ-спектроскопии. Показано, что на уровне Государственного стандартного образца (ГСО) пиностробина обнаруживается пятно, имеющее яркую голубую флуоресценцию при длине волны 366 нм, которое после проявления раствором диазобензолсульфокислоты приобретает желтую окраску с величиной R_f около 0,8. Достаточно информативен и электронный спектр водно-спиртового извлечения из травы перца водяного (рис. 1): интенсивный максимум поглощения при длине волны λ_{max} = 283 ± 3 нм и «плечо» в области 340–360 нм (флавоноиды) (рис. 1).

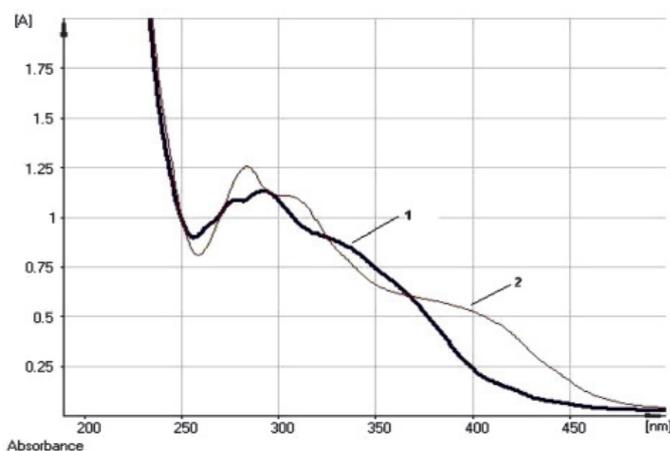


Рис. 1. УФ-спектр спиртового раствора водно-спиртового извлечения из травы перца водяного. Обозначения: 1 – извлечение; 2 – извлечение с добавлением алюминия хлорида

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье «Перца водяного трава» нами определены оптимальные параметры: экстракция 70% этиловым спиртом в соотношении «сырье – экстрагент» – 1:30, экстракция на кипящей водяной бане в течение 60 мин,

определение оптической плотности раствора в условиях дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 394 нм (рис. 2). В качестве стандартного образца обосновано использовать ГСО пиностробина, имеющего сопоставимые спектральные характеристики (рис. 3).

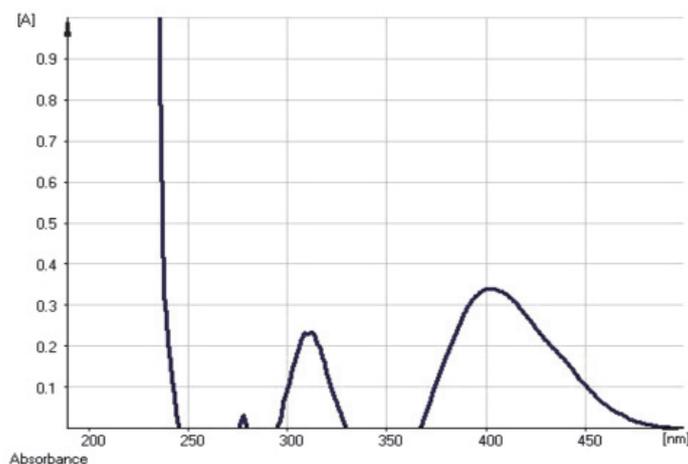


Рис. 2. УФ-спектр спиртового раствора водно-спиртового извлечения из травы горца почечуйного (дифференциальный вариант)

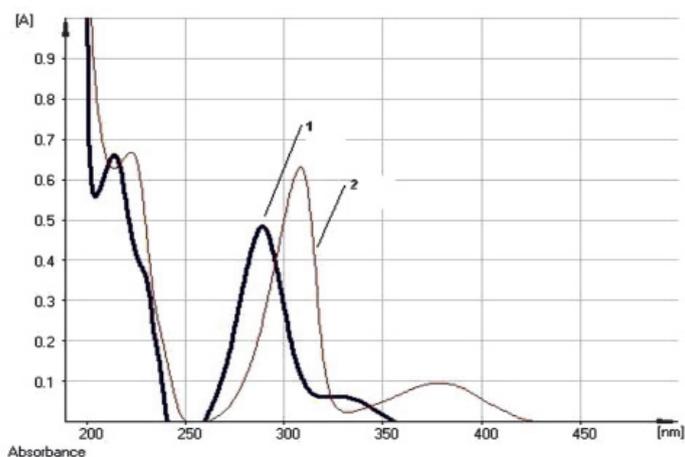


Рис. 3. УФ-спектр спиртового раствора пиностробина. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида

Таким образом, для количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве перца водяного целесообразно использовать метод дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 394 нм, используя при этом в методике анализа ГСО пиностробина.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье «Горца перечного трава». 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 $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 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 полу-

ченного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный при тех же условиях, но без добавления алюминия хлорида (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 394 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО пиностробина (ФС 42-0073-01) при длине волны 394 нм, приготовленного по аналогии с испытуемым раствором.

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

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 30 \cdot 1.25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 1.25 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО пиностробина; m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО пиностробина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов травы горца перечного и показано, что содержание суммы флавоноидов в образцах сырья варьирует в пределах от 2,47 до 4,44% (в пересчете на пиностробин). Это позволяет предварительно рекомендовать в качестве числового показателя «содержание суммы флавоноидов» значение «не менее 2,0%» (взамен «содержание суммы флавоноидов не менее 0,5%»).

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве горца перечного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,08\%$.

Выводы

Из травы перца водяного выделены доминирующие флавоноиды пиностробин, а также новое природное соединение – 2¹,6¹-дигидрокси-4¹,5¹-диметоксихалкон (полигохалкон), имеющие диагностическое значение. Научно обоснованы новые подходы к стандартизации сырья исследуемого растения, заключающиеся в определении подлинности сырья с использованием метода ТСХ (обнаружение пиностробина), а также спектрофотометрии по характеру кривой поглощений электронного спектра. Разработана методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве перца водяного с использованием дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 394 нм. Определено, что содержание суммы флаво-

ноидов в траве перца водяного варьируется от 2,47 до 4,45% (в пересчете на пиностробин).

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
2. Коруйкин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. – Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2007. – 232 с.
3. 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.
4. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2012. – 262 с.
5. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 1. Семейства Magnoliaceae – Juglandaceae, Moraceae, Cannabiaceae, Urticaceae, отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 421 с.
6. Smolarz H.D. Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of Polygonum L., Acta Poloniae Pharmaceutica // Drug Research. – 2002. – Vol. 59, № 2. – P. 145–148.
7. Dau N.V., Thang V.N. Flavonoids from Polygonum hydropiper L. (Polygonaceae) // Journal of Chemistry. – 2004. – Vol. 42, № 4. – P. 512–515.
8. Dzoyem J.P., Nkuete A.H.L., Kuete V., Tala M.F., Wabo H.K., Guru S.K., Rajput V.S., Sharma A., Tane P., Khan I.A., Saxena A.K., Laatsch H., Tan N.H., Cytotoxicity and antimicrobial activity of the methanol extract and compounds from Polygonum limbatum, Planta Medica. – 2012. – Vol. 78, № 8. – P. 787–792.

References

1. Gosudarstvennaya Farmakopeia SSSR: Vip. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitelnoe syr'e / MZ SSSR. 11-e izdani, dop. Moscow: Meditsina, 1989. 400 p.
2. Korulkin D. Yu., Abilov Zh.A., Muzychkin R.A., Tolstikov G.A. Prirodnye flavonoidy. Novosibirsk, Akademicheskoe izdatelstvo «Geo», 2007. 232 p.
3. Kurkin V.A. Farmakognozia: Uchebnik dlya studentov farmatsevticheskikh vuzov (fakul'tetov). 2-e izd., pererab. i dop. [Pharmacognosy: A textbook for students of schools (faculties) of Pharmacy. 2nd ed., rev. and add.]. Samara, 2007, 1239 p.
4. Kurkina A.V. Flavonoidy farmakopeynykh rasteniy: Monografiya. Samara: ООО «Ofort», GOU VPO «SamGMU Roszdava», 2012. 262 p.
5. Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastushchie tsvetkovye rasteniya, ikh komponentnyi sostav i biologicheskaya aktivnost'. T. 1. Semeystva Magnoliaceae Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabiaceae, Urticaceae, Otv. Redactor A.L. Budantsev, SPb.; Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2008. 421 p.
6. Smolarz H.D. Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of Polygonum L., Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research, 2002. Vol. 59, no. 2, pp. 145–148.
7. Dau N.V., Thang V.N. Flavonoids from Polygonum hydropiper L. (Polygonaceae) // Journal of Chemistry, 2004, Vol. 42, no. 4, pp. 512–515.
8. Dzoyem J.P., Nkuete A.H.L., Kuete V., Tala M.F., Wabo H.K., Guru S.K., Rajput V.S., Sharma A., Tane P., Khan I.A., Saxena A.K., Laatsch H., Tan N.H., Cytotoxicity and antimicrobial activity of the methanol extract and compounds from Polygonum limbatum, Planta Medica, 2012, Vol. 78, no. 8, pp. 787–792.

Рецензенты:

Первушкин С.В., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической технологии, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара;

Шаталаев И.Ф., д.б.н., профессор, зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 21.07.2013.