УДК 615.32: 547.9

СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ ГОРЦА ПОЧЕЧУЙНОГО (POLYGONUM PERSICARIA 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 горца почечуйного (Polygonum persicaria L.). Из травы исследуемого растения выделены доминирующие флавоноиды пиностробин, изокверцитрин, а также новое природное соединение – 6^1-гидрокси-2^1,4^1-диметоксихалкон (персикохалкон), имеющие диагностическое значение. Разработаны методики качественного анализа травы горца почечуйного с использованием тонкослойной хроматографии (обнаружение пиностробина) и спектрофотометрии (максимумы поглощения при длине волны 274 ± 3 и 350 ± 3 нм). Разработана методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве горца почечуйного с использованием дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 410 нм. Определено, что содержание суммы флавоноидов в траве горца почечуйного варьируется от 1,77 до 2,58 % (в пересчете на изокверцитрин). Ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов с доверительной вероятностью 95 % составляет ±4,15 %.

Ключевые слова: горец почечуйный, Polygonum persicaria L., трава, флавоноиды, халконы, флаваноны, флавонолы, пиностробин, персикохалкон, изокверцитрин, колоночная хроматография, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, стандартизация

THE STANDARDIZATION OF THE DRUGS OF POLYGONUM PERSICARIA 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 persicaria L. There were isolated from the investigated plant the predominant flavonoids pinostrobin, isoquercitrin and also a new natural compound – 6^1-hydroxy-2^1,4^1-dimethoxychalcone (persicochalcone), which have the diagnostic significance. There was developed the methods of qualitative analysis of Polygonum persicaria L. herbs with using of thin layer chromatography (determination of pinostrobin) and spectrophotometry (the absorption maxima at 274 ± 3 and 350 ±3 nm). There was developed the method of quantitative determination of total flavonoids using differential spectrophotometry with analytical wavelength at 410 nm. There was established that the content of total flavonoids in the Polygonum persicaria L. herbs varies from 1,77 to 2,58 % (calculated on isoquercitrin). 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 persicaria L., herb, flavonoids, flavanones, chalcones, flavonols, pinostrobin, persicochalcone, isoquercitrin, column chromatography, thin layer chromatography, spectrophotometry, standardization

Лекарственные препараты на основе надземной части горца почечуйного, или почечуйной травы (*Polygonum persicaria* L., сем. Гречишных – *Polygonaceae*) обладают кровоостанавливающими, противовоспалительными, бактерицидными, обезболивающими и диуретическими свойствами [1, 3, 5]. Фармакологическое действие препаратов данного растения обусловлено целым рядом веществ, в том числе флавоноидами [3, 5], однако литературные данные относительно их компонентного состава достаточно противоречивы. В отечественной литературе сообщается, что в траве горца почечуйного содержатся кверцетин, авикулярин, кверцитрин, изокверцитрин, гиперозид, рутин [3, 5]. По данным зарубежных ученых [6, 7], в траве данного растения наряду с рутином и кверцетином содержатся таксифолин, рамнетин, кемпферол, лютеолин.

В фармакопейной статье 58 Государственной фармакопеи СССР XI издания «Горца почечуйного трава» отсутствуют разделы «Качественные реакции» и «Количественное определение», что свидетельствует об актуальности научного обоснования разработки методик качественного и количественного анализа с использованием современных инструментальных возможностей (ТСХ, УФ-спектроскопия и др.) [2, 4].

Цель настоящего исследования – разработка методик качественного анализа количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве горца почечуйного.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служила надземная часть почечуйной травы, заготовленная в июле 2012 г. в Самарской обл. (окр. г. Самары). Воздушно-сухую надземную часть горца почечуйного (100 г) подвергали 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 (99:1; 98:2; 97:3; 95:5; 93:7; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30, 60:40, 50:50). 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 *н*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2). Фракции, содержащие вещество **1**, были объединены, а выпавшие из них осадки отделены и затем перекристаллизованы из водного спирта. Фракции, содержащие вещества **2** и **3**, подвергали рехроматографированию на колонке с силикагелем L 40/100 с использованием смеси гексана и хлороформа в градиентном режиме. Перекристаллизацию соединений **2 и 3** осуществляли из смеси хлороформ-гексан. В ходе разработки методики количественного определения содержания суммы флавоноидов изучены УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из травы горца почечуйного. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

Спектры ЯМР ^{1}H получали на приборах «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований из надземной части почечуйной травы выделены три флавоноида – изокверцитрин (**1**), пиностробин (**2**) и персикохалкон (**3**), являющийся новым природным соединением.

1. Изокверцитрин (3-O-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3^1,4^1-пентагидроксифлавона**).** Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$ с т.пл. 224–226 °C (водный спирт), масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): 300 (M^+ аглигона, 100 %), 153 (15), 152 (43), 121 (9). УФ-спектр: λ_{max} 257, 268 пл, 361 нм; + NaOAc 273, 380 нм; + NaOAc + H_3BO_3 262, 378 нм; +A1C1$_3$ 274, 415 нм; +A1C1$_3$ + HCl 270, 404 нм, ^{1}H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d$_6$, δ, м.д., J/Гц): 12.64 (1 H, c, 5-OH), 7,68 (1H, дд, 2.5 и 9 Гц, H-6^1), 7.53 (д, 2,5 Гц, H-2^1), 6,82 (1 H, д, 9 Гц, H-5^1), 6.31 (1 H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,20 (1 H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,38 (д, 7 Гц, H-1^{11} глюкозы), 3,1–4,5 (м, 6H глюкозы).

2. Пиностробин (5-гидрокси-7-метоксифлаванон) – блестящие пластинчатые кристаллы белого цвета состава $C_{16}H_{14}O_4$, 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. ^{1}H-ЯМР-спектр в дейтерохлороформе (300 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д., J/Гц): 12.04 (1H, c, 5-OH), 7.15-7.60 (5H-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 (3H, c, CH_3O), 3.12 (1 H, дд, 12 и 17 Гц, H-3ax), 2,83 (1 H, дд, 4 и 17 Гц, 3-eq).

3. Персикохалкон (6^1-гидрокси-2^1,4^1-диметоксихалкон) – аморфный порошок оранжевого цвета состава $C_{17}H_{16}O_4$, масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): M^+ 284 (100 %), 196 (65), 183 (3), 181 (22), 168 (8), 167 (17), 166 (30), 153 (5), 152 (8), 138 (28), 95 (63). λ_{max} EtOH 341 нм, ^{1}H-ЯМР-спектр (300 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д., J/Гц): 14.30 (1 H, c, 6^1-OH), 7.93 (1 H, д, 16 Гц, H-β), 7,81 (1H, д, 16 Гц, H-α), 7,35–7,70 (5 H-Ar, м), 6,16 (1 H, д, 2 Гц, H-5^1), 5,98 (1 H, д, 2 Гц, H-3^1), 4^1-CH_3O, 3,95 (3 H, c, 4^1-CH_3O), 3.85 (3 H, c, 2^1-CH_3O).

Нами изучена возможность определения подлинности с использованием в разделе ТСХ и УФ-спектроскопии. Показано, что на уровне ГСО пиностробина обнаруживается пятно с величиной R_f около 0,8, имеющее ярко-голубую флуоресценцию при длине волны 366 нм и приобретающее после проявления раствором диазобензолсульфокислоты желтую окраску (пиностробин). Достаточно информативен и электронный спектр водно-спиртового извлечения из травы горца почечуйного (рис. 1): два интенсивных максимума поглощения при длине волны λ_{max} = 274 ± 3 нм и «350 ± 3 нм (флавоноиды) (рис. 1).

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье «Горца почечуйного 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 410 нм (рис. 2). Для расчета содержания суммы флавоноидов нами определен удельный показатель поглощения изокверцитрина, который, по нашим данным, является доминирующим флавоноловым гликозидом и во многом определяет спектральные характеристики (рис. 3).

Следовательно, для количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве горца почечуйного целесообразно использовать метод дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 410 нм, используя при этом значение удельного показателя поглощения ($E^{1\%}_{1см}$) = 300.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве горца почечуйного. 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 ±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 полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3%-го спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95%-м 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 410 нм.

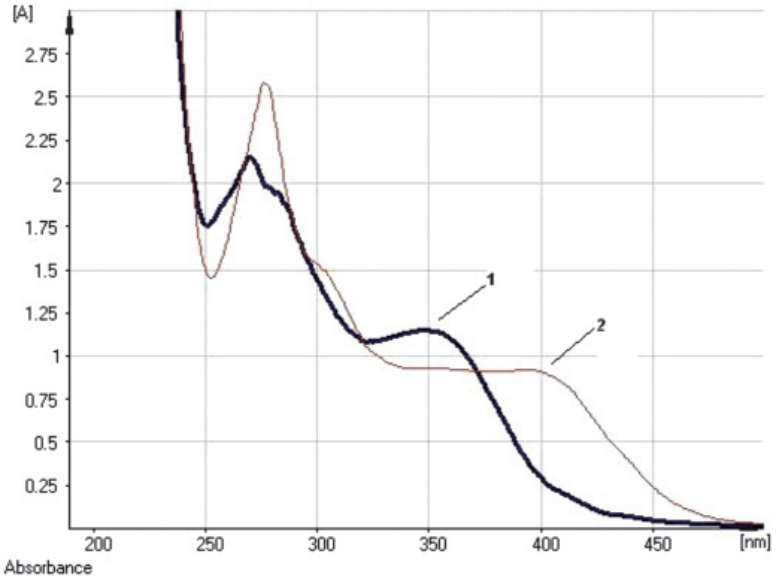

Рис. 1. УФ-спектр спиртового раствора водно-спиртового извлечения из травы горца почечуйного:
1 – извлечение; 2 – извлечение с добавлением алюминия хлорида

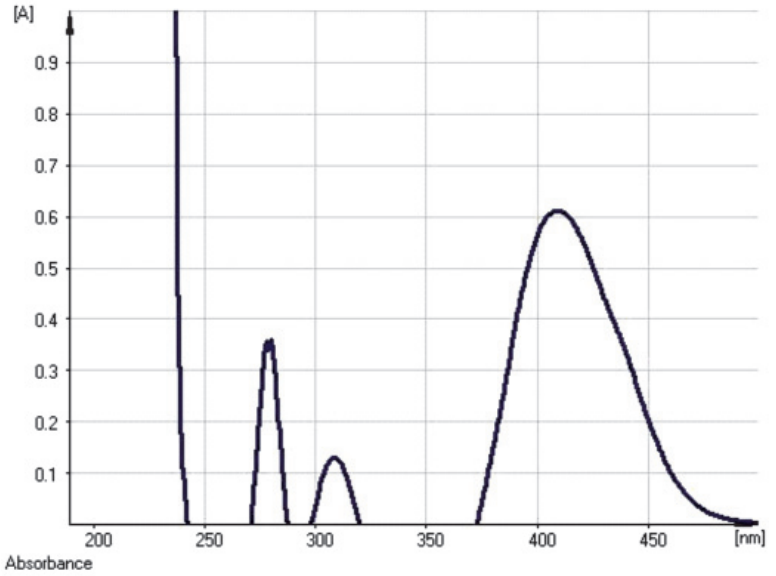

Рис. 2. УФ-спектр спиртового раствора водно-спиртового извлечения из травы горца почечуйного (дифференциальный вариант)

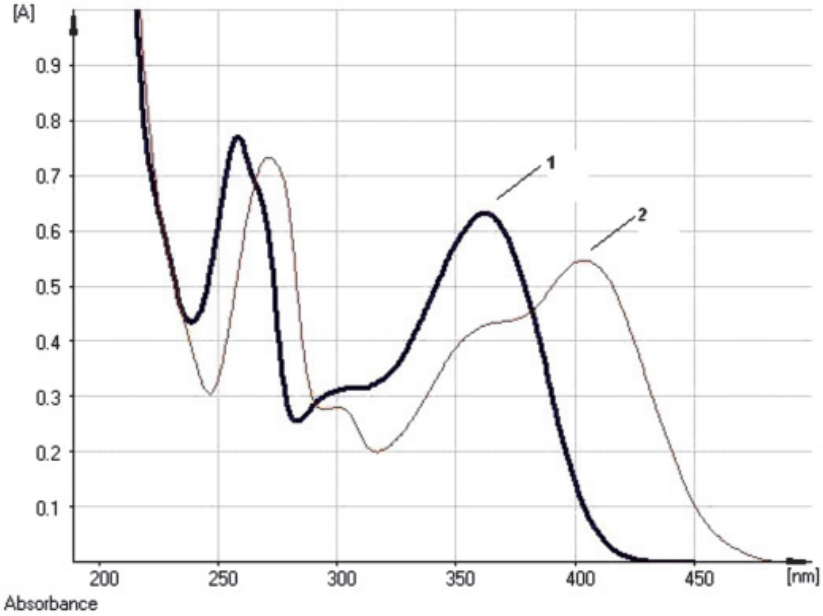

Рис. 3. УФ-спектр спиртового раствора изокверцитрина:
1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида

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

$$X = \frac{D \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{300 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 300 – удельный показатель поглощения изокверцитрина, г; W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов травы горца почечуйного и показано, что содержание суммы флавоноидов в образцах сырья варьируется в пределах от 1,77 до 2,58 % (в пересчете на изокверцитрин). Это позволяет предварительно рекомендовать в качестве числового показателя «содержание суммы флавоноидов» значение «не менее 1,5 %». Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве горца почечуйного с доверительной вероятностью 95 % составляет ±4,15 %.

Выводы

Из травы горца почечуйного выделены доминирующие флавоноиды пиностробин, изокверцитрин, а также новое природное соединение – 6^1-гидрокси-2^1,4^1-диметоксихалкон (персикохалкон), имеющие диагностическое значение. Разработаны методики качественного анализа травы горца почечуйного с использованием тонкослойной хроматографии (обнаружение пиностробина) и спектрофотометрии (максимумы поглощения при длине волны 274 ± 3 нм и 350 ± 3 нм). Разработана методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве горца почечуйного с использованием дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 410 нм. Определено, что содержание суммы флавоноидов в траве горца почечуйного варьируется от 1,77 до 2,58 % (в пересчете на изокверцитрин).

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. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстиков. – 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, Ulmaceae, Moraceae, Cannabiaceae, Urticaceae; отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: 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. 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. *Gosudarstvennaia Farmakopeia SSSR: Vip. 2. Obshie metody analiza. Lekarstvennoe rastitelnoe syr'e / MZ SSSR. 11-e izdani, dop*. Moscow: Meditsina, 1989. 400 p.

2. Korulkin D.Y., Abilov Z.A., Muzychkina 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: Monografia. Samara: OOO «Ofort», GOU VPO «SamGMU Roszdrava», 2012. 262 p.

5. Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastuschie tsvetkovye rastenia, ikh komponentnyi sostav I biologicheskaya aktivnost'. T. 1. Semeystva Magnoliaceae Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabiaceae, Urticaceae, Otv. Redactor A.L. Budantsev, SPb.; Moscow: Tovarischestvo 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. 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 Российской Федерации, г. Самара;

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

Работа поступила в редакцию 21.07.2013.