

УДК 6.05.04

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ГРУДНОГО СБОРА № 3 И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА

© 2004 г. Т.С. Шилина, В.А. Ермакова, И.А. Самылина, А.И. Бардаков

ММА им. И.М. Сеченова

По результатам исследований последних лет очевидна перспектива перевода многокомпонентных сборов из лекарственного растительного сырья в водорастворимые сухие экстракты. Основываясь на этом, нами были подобраны основные управляющие факторы, влияющие на получение сухого экстракта из сбора грудного № 3, используемого в качестве отхаркивающего, противовоспалительного средства при заболеваниях верхних дыхательных путей и получен суммарный препарат в количестве 0,575 г. Методом ТСХ был изучен качественный состав сбора и сухого экстракта, в результате которого идентифицировано 13 соединений фенольной природы: рутин, нарингенин, гиперозид, нарингенин-5-гликозид, кверцетин, лютеолин-7-гликозид, лютеолин, кемпферол, апигенин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, галловая кислота, глицирризиновая кислота. Методом ВЭЖХ в водном извлечении Сб. Гр. 3 подтверждено присутствие 11 соединений: изоферуловая кислота, кофейная кислота, нарингенин-5-гликозид, хлорогеновая кислота, глицирризиновая кислота, гиперозид, галловая кислота, рутин, кемпферол, дигидрокверцетин, лютеолин-7-гликозид, а в сухом экстракте 10 соединений: изоферуловая кислота, кофейная кислота, нарингенин-5-гликозид, нарингенин, ликвиритогенин, глицирризиновая кислота, гиперозид, рутин, гесперидин, кверцетин. Нами так же была проведена стандартизация сухого экстракта и сбора по содержанию флавоноидов в пересчете на рутин. Этот показатель для сбора составил $1,942 \pm 0,66$, а для сухого экстракта $4,625 \pm 0,09$ %.

ВВЕДЕНИЕ

По результатам исследований последних лет очевидна перспектива перевода сборов и индивидуальных видов лекарственного растительного сырья в водорастворимые сухие экстракты (концентраты), как рациональную форму для получения стандартизованных водных извлечений как в аптечных, так и в домашних условиях. Суммарные экстракционные препараты сохраняют все свойства многокомпонентных сборов и обеспечивают максимальное содержание биологически активных веществ, точность дозирования и комплексное фармакологическое действие входящих в состав сбора компонентов [3, 4, 5, 6].

Целью настоящего исследования явилось получение сухого экстракта на основе Грудного сбора № 3 (Гр. Сб. 3), разрешенного для медицинского применения в Российской Федерации и изучение его химического состава. Гр. Сб. 3 состоит из пяти компонентов: корней солодки, корней алтея, листьев шалфея, плодов аниса обыкновенного, почек сосны, и применяется в качестве противовоспалительного, отхаркивающего средства при заболеваниях верхних дыхательных путей [8]. Исследования проводили на промышленных

образцах Гр. Сб. 3 ЗАО “Фирма Здоровье”.

Согласно литературным данным и результатам собственных исследований Гр. Сб. 3 содержит такие группы биологически активных веществ как эфирные масла, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, полисахариды, сапонины, слизи, дубильные вещества, витамины [1, 2, 7]. Нами было проведено детальное изучение фенольного комплекса сбора и водорастворимого комплекса сухого экстракта в сравнительном аспекте.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения сухого экстракта в лабораторных условиях на опытных образцах сбора были подобраны оптимальные условия экстракции, в результате которых установлено, что оптимальное соотношение сырья и экстрагента – 1:10, температура экстракции – 90°. Изучение влияния продолжительности и кратности экстракции на выход действующих веществ проводили по содержанию полисахаридов, экстрактивных и дубильных веществ в пятикратной повторности. Результаты исследований по контактам фаз и времени экстракции позволили определить, что равновесное состояние при трех

контактах фаз достигается через 1 час.

Получение сухого экстракта проводили на базе АООТ “Биохиммаш”. Технология получения сухого экстракта включает следующие стадии: подготовка сырья, экстрагирование сырья с целью получения водного извлечения, очистка извлечения, его упаривание и сушка.

Для получения сухого экстракта использовали 3 кг Гр. Сб. 3 измельченностью 7 мм, который заливали десятикратным количеством воды (90° С), с учетом коэффициента водопоглощения (2,84).

Экстрагирование проводили трехкратно, при двух последующих экстракциях экстрагент добавляли в количестве, равном предыдущему отпуску. В качестве экстрагента использовали воду очищенную. Температура экстракции 90° С. Экстрагирование вели в экстракторе из нержавеющей стали с ложным дном, имеющем мешалку лопастного типа, делающую 60 об/мин, паровую рубашку и гильзу для термометра. Объем экстрактора 250 л. Каждое экстрагирование вели в течение 60 мин.

Очистка водного извлечения: после трехкратной экстракции водные извлечения объединяли и фильтровали через 4 слоя марли и 2 слоя бязи.

Упаривание: для упаривания водного извлечения использовали однокорпусной вакуум-выпарной аппарат ВВУ-50 с естественной циркуляцией и производительностью 50-100 кг/час по испаренной влаге. Глубина вакуума 0,92 Атм, температура греющего пара 60° С, температура упариваемой жидкости 45-50° С. Упаривание вели в течении 2-х часов, приблизительно до 1/10 первоначального объема.

Сушка: условия сушки были предварительно экспериментально подобраны, чтобы получить продукт с остаточной влажностью не более 5%. Полученную сиропообразную массу сушили с помощью распылительной установки “Мобильный минор” фирмы “Атомайзер-Ниро” (Дания) при давлении 5,2 кгс/см² (0,52 Мпа), при температуре на входе 165° С, на выходе 75° С. Скорость подачи жидкости поддерживалась в пределах 2,5 л/час.

Выход готового продукта составил 19,16%.

Полученный экстракт представляет собой аморфный порошок желто-коричневого цвета с зеленоватым оттенком. Запах специфический. Вкус горьковато-сладковатый. Полученный продукт гигроскопичен и комкуется при хранении. Влажность полученного экстракта – 4,87%. Экстракт хорошо растворим в горячей воде, плохо растворим в спирте, не растворим в хлороформе, ацетоне, эфире.

Изучение качественного химического состава сухого экстракта проводилось методом тонкослойной хроматографии на пластинках Kieselgel 60 F254 фир-

мы “Merk” с размерами 20x10см в системах растворителей этилацетат : уксусная кислота : вода (5:1:1) и этилацетат : метилэтилкетон : муравьиная кислота : вода (50:30:10:10). В качестве исследуемых растворов использовали водную вытяжку из Гр. Сб. 3, а также водный раствор экстракта. Водное извлечение из сбора получали по следующей методике: 10,0 г сбора помещали в круглодонную колбу, прибавляли 100 мл воды, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 минут. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтровали через шесть слоев марли, а затем через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мм. Раствор экстракта получали путем растворения 1,00г экстракта в 100 мл горячей воды (при необходимости содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане для лучшего растворения препарата). По 10 мл извлечений упаривали на водяной бане и сухие остатки растворяли в смеси этилацетат: метанол в соотношении 95:5, фильтровали через фильтровальную бумагу во флакон.

Для обнаружения фенольных соединений полученные извлечения хроматографировали восходящим методом. Для идентификации зон адсорбции исследуемых извлечений на линию старта полосой 8 мм наносили по 5 мкл исследуемых извлечений и по 3 мкл 0,05 % метанольных растворов ГСО рутина, гиперозида, лютеолин-7-гликозида, лютеолина, кверцетина, глицирризиновой кислоты и РСО нарингенин-5-гликозида, кемпферола, нарингенина, апигенина, галловой кислоты, хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты.

Детектирование зон адсорбции осуществляли в видимом свете, УФ-свете при длине волны 254 нм, а также опрыскиванием 5% раствором алюминия хлорида в 95% этаноле, 5% раствором фосфорномолибденовой кислоты в 95% этаноле, действием паров аммиака.

В результате проведенных исследований с использованием в качестве подвижной фазы этилацетат : уксусная кислота : вода (5:1:1) в водном извлечении сбора было обнаружено 14 зон адсорбции, из которых идентифицировано 7: рутин (Rf – 0.29), гиперозид (Rf – 0.39), лютеолин-7-гликозид (Rf- 0.42), нарингенин-5-гликозид (Rf- 0.53), лютеолин (Rf- 0.94), кемпферол (Rf – 0.96), нарингенин (Rf – 0.96), апигенин (Rf – 0.96), кверцетин (Rf- 0.97); в водном растворе сухого экстракта было обнаружено 13 зон адсорбции, из которых идентифицировано 6: рутин (Rf – 0.29), гиперозид (Rf – 0.39), нарингенин-5-гликозид (Rf – 0.53), лютеолин (Rf -0.94), кемпферол (Rf – 0.96), нарингенин (Rf – 0.96), апигенин (Rf – 0.96), кверцетин (Rf – 0.97). В том случае, когда в качестве подвижной фазы выступала система растворителей этилацетат : метилэтилкетон : муравьиная

кислота : вода (50:30:10:10), в водном извлечении сбора и сухом экстракте было обнаружено 16 зон адсорбции, из которых идентифицировано 11: рутин (Rf-0.41), глицирризиновая кислота (Rf – 0.44), лютеолин-7-гликозид (Rf-0.46), хлорогеновая кислота (Rf – 0.48), гиперозид (Rf-0.53), нарингенин-5-гликозид (Rf -0.78), нарингенин (Rf – 0.88), галловая кислота (Rf – 0.92), кофейная кислота (Rf- 0.95), лютеолин (Rf- 0.98), кверцетин (Rf- 0.99).

Нами также было проведено изучение фенольного комплекса Гр. Сб. 3 и сухого экстракта методом ВЭЖХ. Изучение фенольного комплекса сбора и сухого экстракта проводили по методике, предложенной фирмой “Alltech” США, с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы Мультихром для “Windows”.

Условия хроматографирования. Изучение фенольного комплекса грудного сбора и сухого экстракта проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы “GILSTON”, Франция. В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка PLATINUM EPS C – 18 100 А размером 4,6x250 мм. Подвижная фаза метанол – вода – фосфорная кислота концентрированная в соотношении 40:60:0,5. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0,5 мл/мин. Продолжительность анализа 95,49 минуты. Детектирование проводили с помощью УФ – детектора при длине волны 254 нм.

Подготовка образца для анализа. Для приготовления испытуемого раствора экстракта 1,00 г (точная навеска) экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 горячей мл воды, пере-

мешивали до растворения препарата (при необходимости содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане) и доводили тем же растворителем до метки. При изготовлении водного извлечения 10,00 г сбора (точная навеска) помещали в круглодонную колбу, прибавляли 100 мл воды, присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 минут, а затем охлаждали в течение 45 минут. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтровали через четыре слоя марли в колбу вместимостью 100 мл, и доводя объем тем же растворителем до метки, а затем через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм. По 20 мкл исследуемых растворов и рабочих стандартных образцов вводили в хроматограф и хроматографировали по вышеприведенной методике. Хроматограммы представлены на рисунке 1,2.

Подготовка образцов стандартов. Около 0,05 г (точная навеска) ГСО кверцетина, лютеолина, лютеолина-7-гликозида, гиперозида, глицирризиновой кислоты, РСО галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, апигенина, гесперидина, ликуразида, ликвиритона, ликвиритогенина, дигидрокверцетина, изоферуловой кислоты, нарингенина, нарингенин-5-гликозида, кемпферола помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл спирта этилового 95 %, после чего доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. Результаты проведенных исследований приведены в таблицах 1,2.

По результатам проведенных исследований было доказано присутствие в сухом экстракте 21 компонента, из которых идентифицировано 9: рутин, кверцетин,

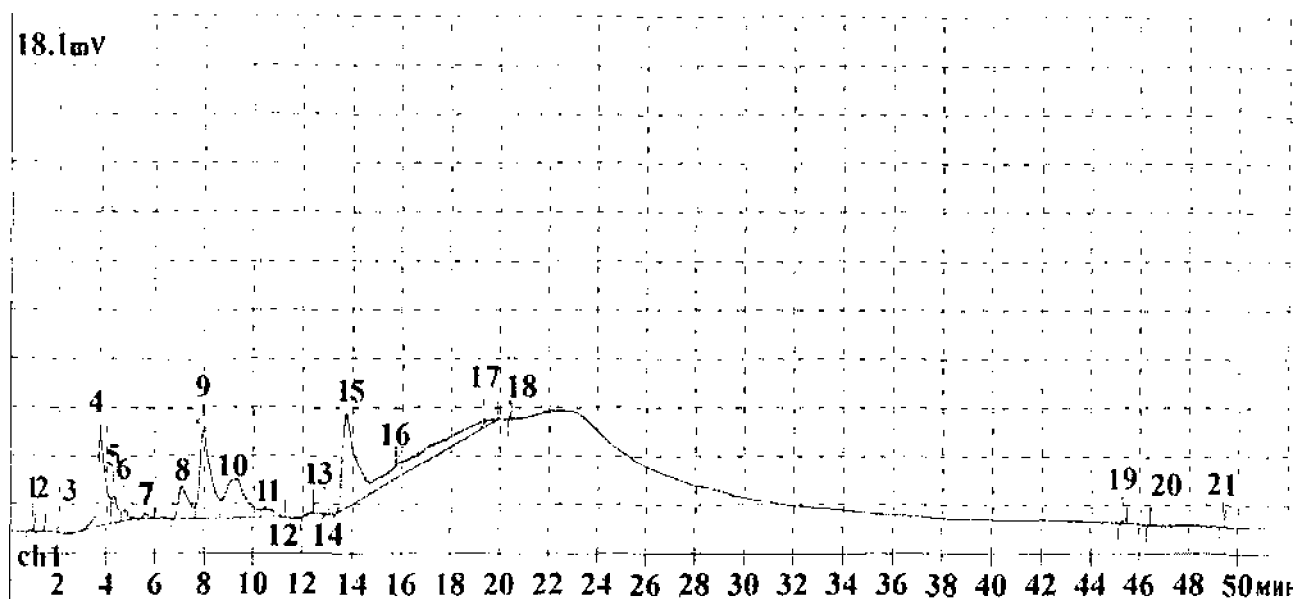


Рис. 1. ВЭЖХ — хроматограмма фенольных соединений сухого экстракта Гр. Сб. 3.

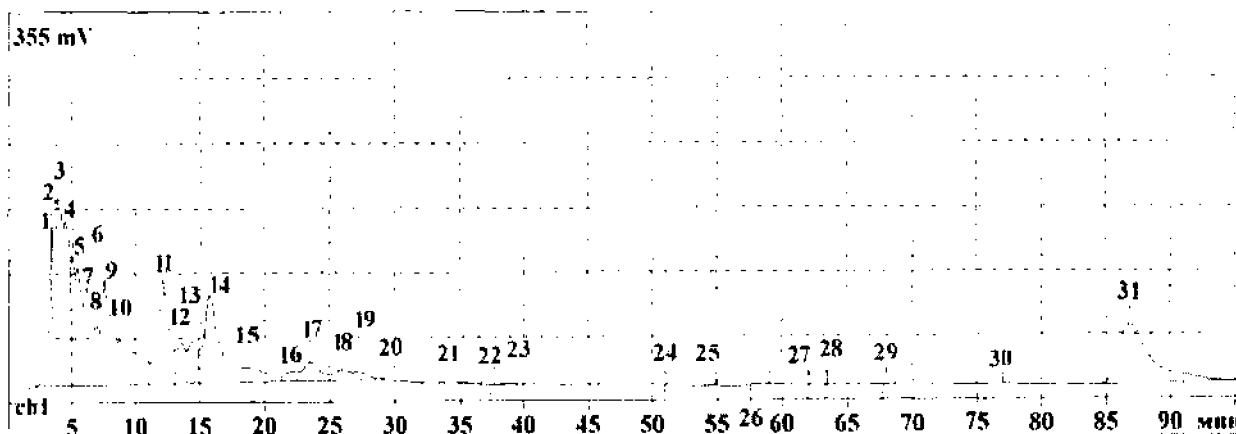


Рис. 2. ВЭЖХ – хроматограмма фенольных соединений водного извлечения сбора.

кофейная кислота, гиперозид, ликвиритогенин, глицирризиновая кислота, нарингенин-5-гликозид, изоферуловая кислота, нарингенин; в водном извлечении сбора 25 компонентов, из которых идентифицировано 10: рутин, кверцетин, кофейная кислота, гиперозид, ликвиритогенин, глицирризиновая кислота, нарингенин-5-гликозид, изоферуловая кислота, нарингенин, геспередин. Методом внутренней нормализации определено, что наибольшее количество среди флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в % отношении в сухом экстракте приходится на рутин (10,60%), глицирризиновую кислоту (7,86%), хлорогеновую кислоту (7,84%), а в водном извлечении Гр. Сб. 3 на гиперозид (21,74%), рутин (19,15%), нарингенин (14,45%).

Согласно фармакопейной статье (ФС 42-1219-78) на Гр. Сб. 3 для оценки качества сбора по содержанию действующих веществ проводят определение эфирного масла. Определяют содержание эфирного масла по методу 1 ГФ XI, вып. 1, стр. 290 со следующими дополнениями: навеска сбора 20 г., время пе-

регонки – 2 часа. Исходя из этого ФС на Гр. Сб. 3 регламентирует содержание эфирного масла не менее 0,4%.

Учитывая, что в составе сбора содержится достаточное количество соединений фенольной природы, мы сочли целесообразным предложить в качестве альтернативной методики – методику оценки качества сбора по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

С целью количественной оценки содержания флавоноидов был использован общепринятый в фармакопейном анализе метод спектрофотометрии, с использованием реакции со спиртовым раствором алюминия хлорида с получением комплекса, окрашенного в желтый цвет.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывали в пересчете на рутин, используя с этой целью в качестве рабочего стандартного образца раствор рутина в 95 % этаноле. Для этого около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина (ФС 42-2508-87), растворяли

Таблица 1

Содержание фенольных соединений в сухом экстракте Гр. Сб. 3.

№ пика	Время удерживания, сек	Площадь пика, mV/сек	Содержание отдельного компонента в %	Название компонента фенольного комплекса
2	223,2	1850,27	5,06	Изоферуловая кислота
6	327,1	1697,30	4,64	Кофейная кислота
8	416,5	719,18	1,97	Нарингенин-5-гликозид
9	450,1	2865,58	7,84	Хлорогеновая кислота
11	727,6	2874,62	7,86	Глицирризиновая кислота
12	812,9	947,58	2,59	Гиперозид
13	864,1	1046,51	2,86	Галловая кислота
14	946,2	3875,72	10,60	Рутин
16	1328	310,50	0,85	Кемпферол
18	1556	423,80	1,16	Дигидрокверцетин
21	2050	152,49	0,42	Лютеолин-7-гликозид

Содержание фенольных соединений в водном извлечении Гр. Сб. 3.

№ пика	Время удерживания, сек	Площадь пика, mV/сек	Содержание отдельного компонента в %	Название компонента фенольного комплекса
4	222,3	38,27	12,33	Изоферуловая кислота
7	224,3	1,69	0,55	Кофейная кислота
8	423	18,09	5,83	Нарингенин-5-гликозид
10	558,3	44,85	14,45	Нарингенин
11	624,5	5,91	1,90	Ликвиритогенин
13	743,2	0,63	0,20	Глицирризиновая кислота
15	823,4	67,45	21,74	Гиперозид
16	944,9	59,43	19,15	Рутин
18	1224	0,11	0,04	Гесперидин
20	2782	0,04	0,01	Кверцетин

в мерной колбе вместимостью 100 мл в 50 мл этанола и доводили объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивали.

Подготовка испытуемого образца: а) около 10,00 г (точная навеска) Сб. Гр. 3, измельченного до размера частиц 2 мм, помещали в колбу объемом 200 мл, прибавляли 70 мл 70% этилового спирта, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течении 1 часа с момента закипания спиртоводной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали в мерную колбу объемом 100 мл через бумажный фильтр и объем доводили тем же растворителем до метки б) 1,00 г (точная навеска) сухого экстракта помещали в колбу объемом 100 мл и растворяли в 50 мл воды (при необходимости содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане), затем объем доводили тем же растворителем до метки.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл испытуемого раствора, прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этаноле и доводили объем тем же спиртом до метки, перемешивали и через 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на саморегистрирующем спектрофотометре "ГЕЛИОС" при длине волны 409 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл испытуемого раствора 0,1 мл разведенной уксусной кислоты, доведенный 95% этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор должен быть свежеприготовленным).

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляли по формуле:

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

где,

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина;

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m_0 – масса ГСО рутина в граммах;

m – масса испытуемого образца в граммах;

W – потеря в массе при высушивании испытуемого образца в процентах.

Спектры представлены на рисунках 3, 4, 5.

Результаты проведенных испытаний показывают, что содержание флавоноидов в сухом экстракте составляет $4,62 \pm 0,09\%$, а в Сб. Гр. 3 $1,94 \pm 0,06\%$.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика получения сухого водорастворимого экстракта из Гр. Сб. 3, включающая следующие основные этапы: экстракция сбора, очистка, концентрирование экстракта, сушка; получено 0,575 г готового продукта.

2. Проведена сравнительная оценка химического состава Сб. Гр. 3. и сухого экстракта методом ТСХ, в результате которой установлено наличие в них следующих соединений: рутин, апигенин, глицирризиновая кислота, лютеолин-7-гликозид, хлорогеновая кислота, гиперозид, нарингенин-5-гликозид, нарингенин, галловая кислота, кофейная кислота, лютеолин, кверцетин.

3. Изучен качественный состав фенольного комплекса сбора экстракта методом ВЭЖХ, в результате которого в сухом экстракте установлено присутствие изоферуловой кислоты, кофейной кислоты, нарингенин-5-гликозида, хлорогеновой кислоты, глицирризиновой кислоты, гиперозида, галловой кислоты, рутина, кемпферола, дигидрок-

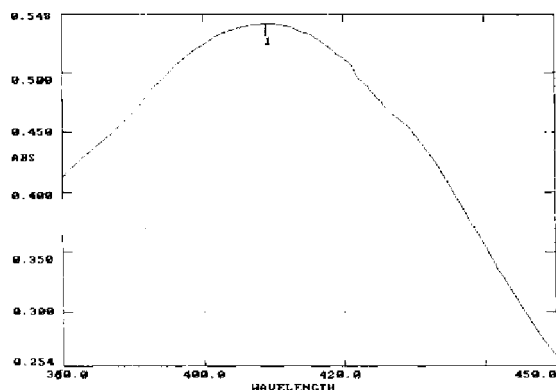


Рис. 3. Спектр поглощения комплекса рутина с $AlCl_3$.

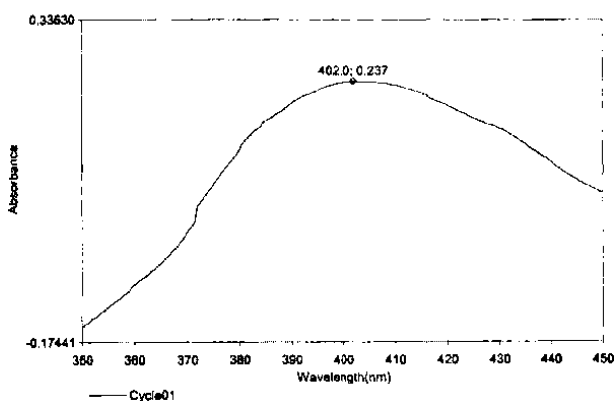


Рис. 4. Спектр поглощения водного раствора сухого экстракта после добавления $AlCl_3$.

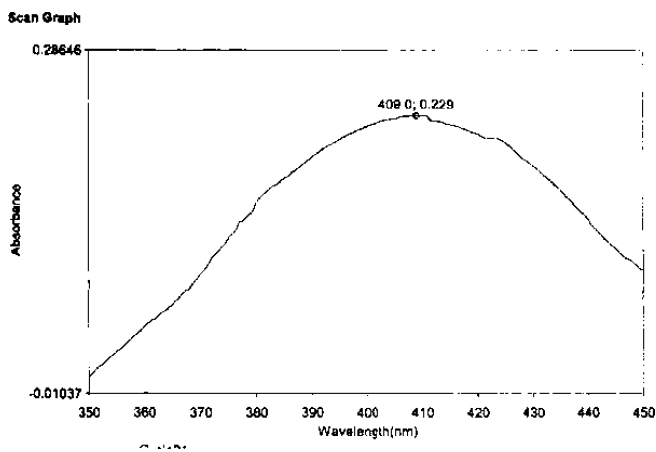


Рис. 5. Спектр поглощения спиртового извлечения из сбора после добавления $AlCl_3$.

Таблица 3

Метрологические характеристики количественного определения флавоноидов в сухом экстракте

Содержание флавоноидов, %	X	ДХ	P, %	t(p, f)	E, %
4,69; 4,53; 4,68; 4,68; 4,55	4,62	0,09	95	2,78	2,07

Таблица 4

Метрологические характеристики количественного определения флавоноидов в Гр. Сб. 3

Содержание флавоноидов, %	X	ДХ	P, %	t(p, f)	E, %
1,89; 1,98; 1,87; 1,99; 1,98	1,94	0,06	96	2,78	3,65

верцетина, лютеолин-7-гликозида, а в сборе – изоферуловой кислоты, кофейной кислоты, нарингенин-5-гликозида, нарингенина, ликвиритогенина, глицирризиновой кислоты, гиперозида, рутина, гесперидина, кверцетина.

4. Разработана методика определения суммы флавоноидов в сборе и сухом экстракте методом спектрофотометрии с использованием качественной реакции с хлоридом алюминия; содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сборе составило $1,94 \pm 0,06$ %, а в сухом экстракте $4,62 \pm 0,09$ %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея СССР. 11 изд. – М.: Медицина, 1990, вып. 2 с. 268-343.
2. Государственная фармакопея СССР. 10 изд. – М.: Медицина, 1968, с.582-584.
3. Даргаева Т.Д. Теоретическое и экспериментальное обоснование технологии и стандартизации многокомпонентных растительных препаратов, применяемых при заболеваниях пищеварительной системы. Дисс. на соискание уч. степ. д.ф.н. – М. – 1994. – с. 34-41.
4. Ковалева Т.Ю. Фармакологическое изучение урологического (мочегонного) сбора и сухого экстракта. Дисс. канд. фарм. наук. – М. - 2003.-С.147-152.
5. Литвинов В.Л., Ветров П.П. Взаимосвязь основных технологических параметров при экстракции растительного сырья. // Хим.-фарм.журнал, 1982, т. 16, № 4, с. 456 – 466.
6. Маркарян А.А. Исследования по разработке методов контроля качества желудочно-кишечного сбора и полученного из него сухого экстракта. Автореф. дис. канд. фарм. наук. – Москва. -. 2001. -24 с.
7. Шилина Т.С., Ермакова В.А., Пахомов В.П. Идентификация фенольных соединений в сборе грудном № 3 // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сборник научных трудов. – Москва: 2003. – с.231-237.
8. ФС 42 – 1219 -78. Грудной сбор № 3.