

## ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ГЛАУЦИНА В МАЧКЕ ЖЕЛТОМ В ТЕЧЕНИЕ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА

Д. В. Моисеев

*Витебский государственный медицинский университет*

Поступила в редакцию 27.12.2011 г.

Аннотация. Экспериментально обоснован период заготовки травы мачка желтого (период активного цветения). Разработана и валидирована специфическая и чувствительная методика идентификации и количественного анализа глауцина в траве мачка желтого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определение глауцина проводится на обращенно-фазовой колонке (Zorbax SB C-18 250×4,6 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования (0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH = 3,0 и ацетонитрил), температура колонки 30°C.

Ключевые слова: Мачок желтый, *Glaucium flavum*, ВЭЖХ, глауцин.

Abstract. The experimentally proved the period of collecton of a grass Yellow hornpoppy (the period of active flowering). Specific and sensitive procedure for identification and assay of glaucine in Yellow hornpoppy (*Glaucium flavum*) by high-performance chromatography is described and validated. Determination of glaucine are provided in reverse-phase column (Zorbax SB C-18 250×4,6 mm, 5 mcm) in gradient eluation (0,01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=3,0) and acetonitrile; column temperature 30°C.

Keywords: Yellow hornpoppy, *Glaucium flavum*, HPLC, glaucine.

### ВВЕДЕНИЕ

Мачок желтый (*Glaucium flavum* Crantz – лат., Yellow hornpoppy – англ.) относится к семейству маковые – Papaveraceae. Одно-, двух-, реже многолетнее травянистое растение высотой до 1 м. Культивируется в Краснодарском крае, Южном Казахстане, на Украине, в Молдавии. В траве мачка желтого обнаружены алкалоиды изохинолинового ряда с наибольшим содержанием глауцина (до 3%). Кроме этого, растение содержит алкалоиды ауротензин, коридин, изокоридин, хелидонин, аллокриптопин, хелирубин, сангвинарин, хелеритрин, протопин (сумма алкалоидов до 3,9%). Клинические исследования показали высокую терапевтическую эффективность глауцина при заболеваниях органов дыхания (бронхит, бронхопневмония, крупозная пневмония, абсцесс легкого, фиброзно-очаговый туберкулез легких, экссудативный плеврит). По силе и продолжительности глауцин превосходит кодеин, но не оказывает угнетающе-

го действия на дыхание, не вызывает привыкания [1, 2].

Целью данной работы являлось изучение динамики накопления глауцина в мачке желтом в течение вегетационного периода с позиций оптимизации периода его заготовки. Для получения прецизионных результатов была разработана, валидирована и апробирована методика определения глауцина в траве мачка желтого методом ВЭЖХ.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования выполняли на жидкостном хроматографе фирмы Agilent 1100 с диодно-матричным детектором. Сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D. Для снижения времени анализа без потери качества разделения веществ использовали градиентный режим. Для разделения использовали хроматографическую колонку Zorbax SB C-18 (размер частиц 5 мкм, 250×4,6 мм). Система раство-

рителей: 0,01 М раствор дигидрофосфата калия (х.ч.) рН = 3,0 и ацетонитрил (for LC, «Merck»), температура колонки 30°C. Длина волны детекции 300 нм.

Таблица 1

*Режим подачи подвижной фазы*

Время, мин	Содержание ацетонитрила, об. %
0-16,0 мин	10-50%
16,0-16,1 мин	50-10%
16,1-18,0 мин	10%

При проведении эксперимента использовали стандартный образец глауцина гидробромида (CAS [5996-06-5], secondary HPLC (SH)=99,2%).

Для экстракции глауцина из растительно-го сырья использовали смесь растворителей, предложенную А.Г. Сережечкиным и соавторами, а именно 1% фосфорную кислоту и этанол в соотношении 40:60 по объему [3, 4]. Для получения прецизионных данных необходимо выполнение следующих исследований: проведение валидации процесса экстракции по параметру «робастность»; проведение валидации методики хроматографического определения. Кроме этого нами была изучена возможность сокращения времени пробоподготовки за счет нагревания экстрагируемой пробы с обратным холодильником при различных температурах в течение 1 часа (в оригинальной методике используется настаивание в течение двух часов при комнатной температуре).

Заготовку мячка желтого проводили в окрестностях г. Витебска в 2009, 2010 и 2011 годах в соответствии с рекомендациями ГАСР (Надлежащая практика сельскохозяйственного производства лекарственного растительного сырья).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рисунке 1 приведены хроматограммы стандартного образца глауцина и экстракта травы мячка желтого. Кроме основного хроматографического пика глауцина (время удерживания 12,9 минуты), на хроматограмме экстракта по спектральным характеристикам в ультрафиолетовой области к соединениям флавоноидной природы был отнесен

пик вещества со временем удерживания около 10 минут и к фенольным кислотам пики веществ со временами удерживания около 6,5 и 8 минут.

Согласно полученным данным, оптимальное соотношение сырья и экстрагента для количественного определения глауцина составляет 1 : 50, при этом соотношении достигается наилучшая воспроизводимость результатов (таблица 2).

Таблица 2

*Зависимость содержания глауцина в экстрагенте от соотношения сырья и экстрагента (n = 5, P = 0,95)*

Соотношение сырья и экстрагента	1 : 10	1 : 25	1 : 50	1 : 100
Относительная полнота извлечения глауцина, %	95,4	99,5	100,0	99,1
Относительное стандартное отклонение, %	1,76	1,22	0,93	2,18

При проверке влияния температуры экстракции оказалось, что максимальное извлечение глауцина из сырья и наилучшая воспроизводимость результатов анализа достигаются при экстракции при температуре 20°C (таблица 3).

При увеличении времени экстракции до 4 часов значимых отклонений в результатах определения выявлено не было.

Таблица 3

*Влияние температуры экстракции на полноту извлечения глауцина из травы мячка жёлтого (n = 5, P = 0,95)*

Температура экстрагирования, °С	100	80	60	40	20
Относительное содержание глауцина, %	91,9	94,9	95,7	97,0	100,0
Относительное стандартное отклонение, %	3,29	2,37	1,63	1,42	0,93

Валидация методики хроматографического определения проводилась в соответствии с рекомендациями [5-7] по показателям: специфичность, эффективность разделения, линейность, воспроизводимость, робастность, стабильность растворов и точность. Методику апробировали на трех различных сериях травы мячка жёлтого, заготовленных в 2009,

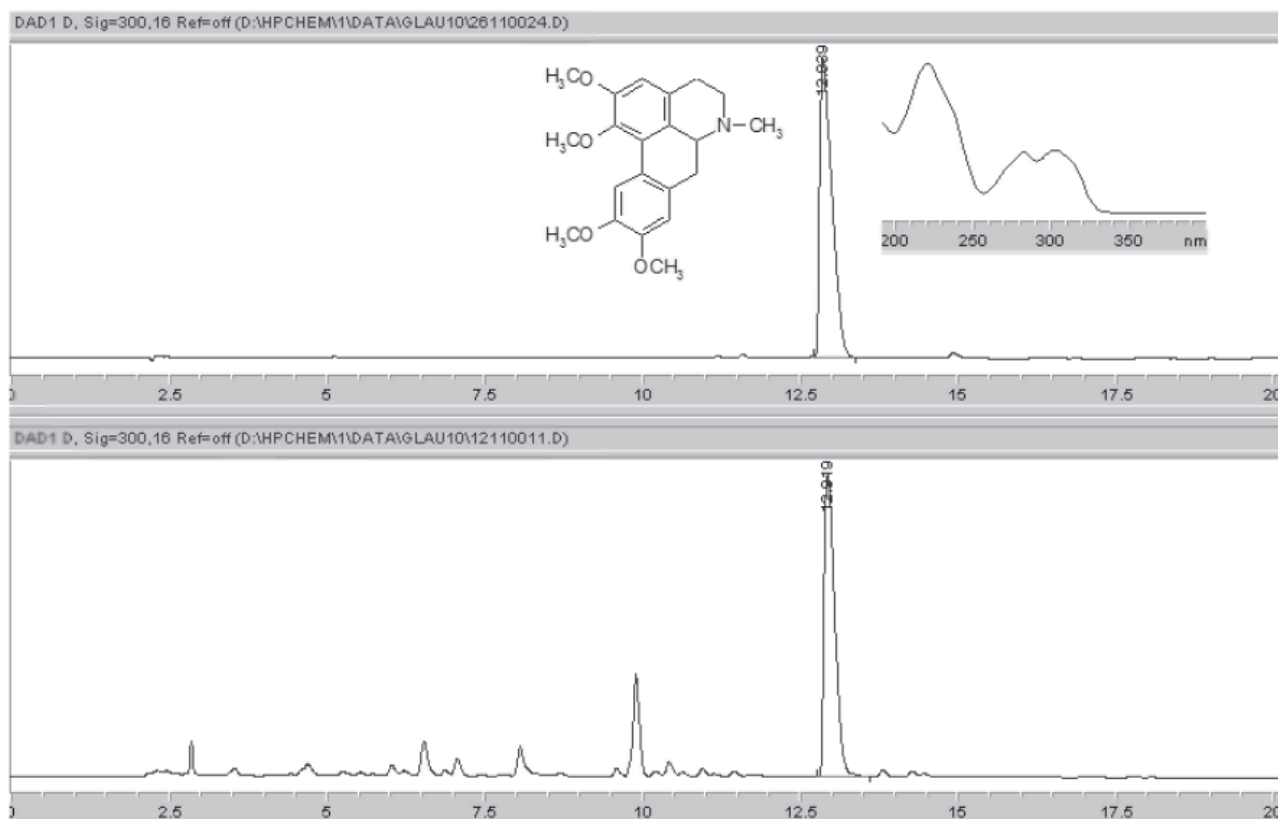


Рис. 1. Хроматограммы: сверху – стандартного образца глауцина (структурная формула и спектр поглощения в УФ-области); внизу – экстракта травы мачка желтого.

2010 и 2011 годах. Содержание глауцина колебалось в пределах 1,73-2,94%.

Таким образом, после проведения валидационных процедур мы предлагаем *методику анализа глауцина в траве мачка желтого*:

Точную навеску (около 0,500 г) измельченного ЛРС (700 мкм) помещают в герметично закрывающийся стеклянный флакон, добавляют 25,0 мл смеси спирта этилового и 1 % фосфорной кислоты в соотношении 6:4 по объёму. Экстрагирование проводят в течение 4 часов при комнатной температуре, пробу периодически встряхивают. Отбирают около 1 мл в пластиковый контейнер и центрифугируют при 5000g 5 минут. Отбирают 0,5 мл надосадочной жидкости в виалу и 10 мкл инжeksiруют в хроматограф.

*Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO)*. 50,0 мг стандартного образца глауцина растворяют в смеси спирта этилового и 1% фосфорной кислоты в соотношении 6:4 по объёму в мерной колбе объёмом 100,0 мл.

Расчет количественного содержания глауцина в % проводят по формуле 1:

$$X = \frac{S_1 \times g_2 \times 5}{S_2 \times g_1 \times (100 - W)} \quad (1)$$

где  $S_1$  – среднее значение площади пика глауцина на хроматограмме испытуемого образца, вычисленное из пяти хроматограмм;  $S_2$  – среднее значение площади пика глауцина на хроматограмме PCO, вычисленное из пяти хроматограмм;  $g_1$  – навеска сырья, г;  $g_2$  – масса глауцина в растворе PCO, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании (влажность сырья), %.

Динамику накопления глауцина в надземных органах мачка желтого первого года жизни изучали в растениях, собранных в период с мая по октябрь 2011 года. Сырье подвергли воздушно-теневого сушке, выход сухого сырья из свежесобранного составлял 25-27%. Определение глауцина проводили по разработанной методике, эксперимент выполняли в трех повторностях.

После высушивания надземную часть мачка желтого разделяли на следующие части: прикорневые листья, стеблевые листья, нижняя, средняя и верхняя трети стебля, бутоны, цветки, плоды. Основную массу рас-

тения составляли: стебель (от 27% - в начале отрастания и до 94% в фазы плодоношения и увядания) и листья – стеблевые и прикорневые (от 100% в начале вегетации и до 5% в фазу плодоношения). Остальные части растения в сумме составляли не более 4% от общей массы (рисунок 2).

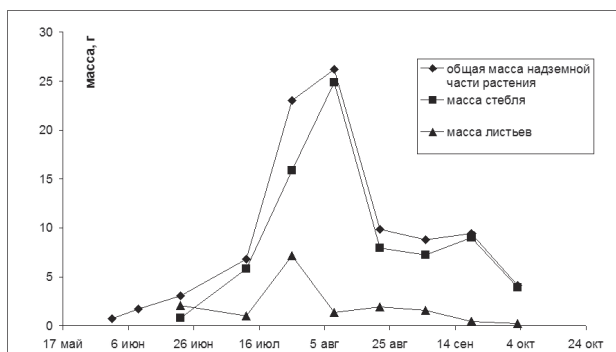


Рис. 2. Изменение массы растения в течение вегетационного периода

При изучении локализации глауцина в отдельных органах мачка желтого оказалось, что его содержание в прикорневых листьях колеблется в пределах 1,65-3,07%, в стеблевых листьях от 2,78 до 4,54% (в фазе увядания снижается до 0,51%), в верхней части стебля 2,24-5,57%, средней части 0,95-2,22%, в нижней части стебля 0,31-1,37%, в бутонах около 2,9%, в корневой системе 0,07-0,19%. Как видно из рисунка 3, наибольшее содержание глауцина в стеблях мачка наблюдается в середине июля, т.е. в период активного отрастания (длина стебля в течение двух недель увеличилась в 2 раза); в листьях максимальное содержание достигается к концу августа (окончание цветения).

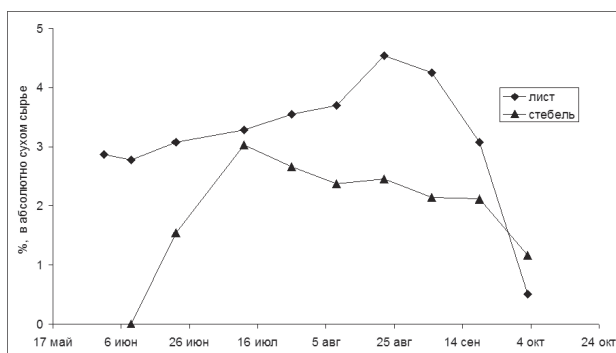


Рис. 3. Изменение содержания глауцина в органах мачка желтого в течение вегетационного периода

С точки зрения экономической целесообразности, мачок желтый следует заготавливать при наибольшем содержании глауцина в пересчете на одно растение, при этом разделение его на отдельные части (лист, стебель, цветки) нецелесообразно. Оптимальное соотношение сырьевой массы (средняя масса одного растения) и содержания в ней глауцина наступает в период активного цветения, который наступает во второй половине июля – первой половине августа (рисунок 4).

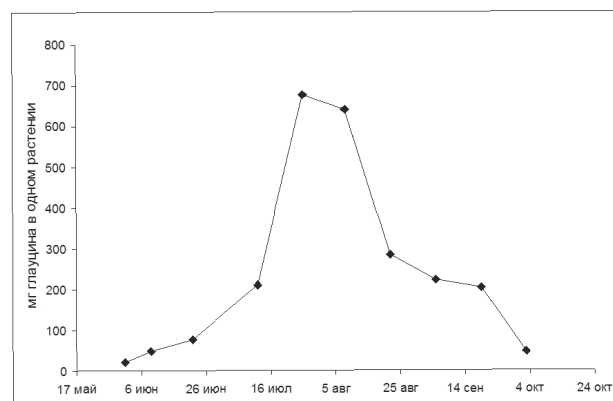


Рис. 4. Изменение содержания глауцина в пересчете на одно растение в течение вегетационного периода

Разработана и валидирована высоко-специфическая, чувствительная методика определения глауцина в траве мачка желтого методом ВЭЖХ, позволяющая определять глауцин в диапазоне концентраций 0,9-1150 мкг/мл. Экспериментально обоснованы такие параметры пробоподготовки, как температура экстракции, соотношение сырья и экстрагента. Методика апробирована на трех разных сериях растительного сырья, относительное стандартное отклонение среднего результата определения оставалась на приемлемом для метода ВЭЖХ уровне (RSD<3%).

Изучена динамика накопления глауцина в траве мачка желтого в течение вегетационного периода. Установлено, что максимальное количество глауцина содержится в верхней трети стебля (около 5,5%) в период активного роста и бутонизации (вторая и третья декада июля) и стеблевых листьях (около 4,5%) в фазу плодообразования (третья декада августа-первая декада сентября). Оптимальное время заготовки травы мачка наступает в

период активного цветения растения (вторая половина июля – первая половина августа). Содержание глауцина в собранном сырье составило  $2,94 \pm 0,04\%$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитотермакология: Руководство для врачей / С.Я. Соколов. — М.: Медицинское информационное агентство, 2000. — 976 с.

2. Шретер Г.К. Мачок желтый – новое лекарственное растение / Г.К. Шретер // Хим.-фарм. ж. — 1976. — Т.10, №4. — С. 77-83.

3. Сережечкин А.Г. Усовершенствование технологии получения глауцина и методов его стандартизации: автореф. дис. ...канд. фармац. наук: 15.00.02 / А.Г. Сережечкин. — М.: ВИЛАР РАСХН, 2004. — 24 с.

4. Количественное определение содержания глауцина в траве мачка желтого (*Glaucium flavum Crantz*) методом ВЭЖХ / Г.Б. Лапа [и др.] // Хим.-фарм. ж. — 2004. — Т. 38, № 8. — С. 32-33.

5. <http://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/>. Дата доступа: 11.03.2011.

6. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. Т.1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертиз и испытания в здравоохранении // Под общ. ред. Г.В. Годовальникова — Минск: Минский госуд. ПТК полиграфии. — 2006. — 656 с.

7. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н.А. Эпштейн // Хим.-фарм. ж. — 2004. — Т. 38, № 4. — С. 40-56.

---

*Моисеев Дмитрий Владимирович* — доцент, заведующий кафедрой стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета; e-mail: [ussr80@narod.ru](mailto:ussr80@narod.ru)

*Moiseev Dmitry V.* — Associate professor, Head of department of standardization of drugs, The Vitebsk State Medicinal University, e-mail: [ussr80@narod.ru](mailto:ussr80@narod.ru)