



УДК 543.544.943.3.068.7

Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ

Тринеева О.В., Воропаева С.В., Сливкин А.И.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 9.11.2012 г.

Аннотация

Листья крапивы двудомной содержат комплекс природных пигментов, основными из которых являются производные хлорофилла и каротиноиды, представленные каротинами и ксантофиллами. В настоящей работе изучены различные элюирующие системы и приведено теоретическое обоснование выбора оптимальных условий хроматографирования, позволяющих провести разделение и определение пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ. Результаты исследования могут быть использованы для разработки и совершенствования нормативной документации на лекарственное растительное сырье крапивы двудомной.

Ключевые слова: листья крапивы двудомной, хлорофилл а и b, β -каротин, тонкослойная хроматография

Leaves of *Urtica dioica* contain a complex of natural pigments, derivatives of a chlorophyll and the carotinoids presented of carotins and ksantophylls are basic of which. In the real work various systems are studied and theoretical justification of a choice of optimum conditions of the chromatography, allowing to carry out division and definition of pigments of leaves of a *Urtica dioica* by a TLC method is given. Results of research can be used for development and improvement of standard documentation on medicinal vegetative raw materials of a *Urtica dioica*.

Keywords: leaves of *Urtica dioica*, chlorophyll a and b, β -carotene, thin layer chromatography

Введение

Несмотря на то, что наша страна обладает огромными запасами дикорастущих лекарственных растений, количество их не безгранично. Существует проблема их рационального использования, и уже сегодня многие занесены в Красную книгу. Крапива двудомная издавна используется в медицине и ее запасы легко воспроизводимы. Комплекс биологически активных веществ (БАВ) оказывает благотворное влияние на состояние эпидермиса и волосяных луковиц, применяется в качестве кровоостанавливающего средства [1]. Листья крапивы выпускаются в виде индивидуального лекарственного растительного сырья в фильтр-пакетах и пачках различной расфасовки, а также входит в состав некоторых сборов. Данное лекарственное растение разрешено к применению для детей до 14 лет. Листья крапивы являются официальным растительным сырьем, включенным в ГФ XI изд. [2]. Однако в ФС отсутствуют методики количественного определения действующих веществ, что не соответствует современному уровню развития фармацевтической

науки в целом. Листья содержат комплекс природных пигментов, основными из которых являются производные хлорофилла (рис. 1) и каротиноиды, представленные каротинами и ксантофиллами [3-8]. В литературе имеется информация по качественной идентификации данных БАВ методом ТСХ [1-4,9]. Используют различные типы сорбентов, элюирующих систем и условия хроматографирования. Тем не менее, отсутствуют единые подходы к определению пигментов листьев крапивы методом ТСХ, а также теоретическое обоснование выбора параметров хроматографического анализа.

Поэтому целью настоящей работы явилось изучение различных элюирующих систем и теоретическое обоснование выбора оптимальных условий хроматографирования, позволяющих провести разделение и определение пигментов листьев крапивы двудомной (хлорофиллов и каротиноидов) методом ТСХ.

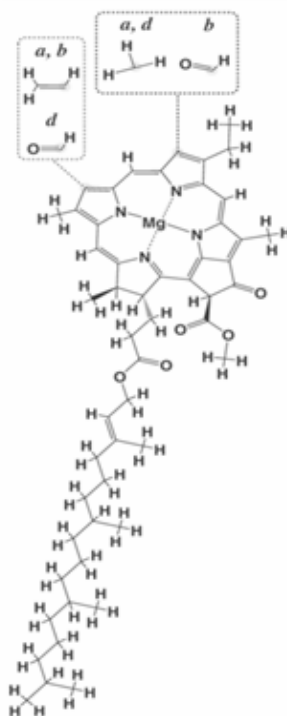


Рис. 1. Структурная формула хлорофиллов а, b и d

Эксперимент

В качестве объекта исследования использовали готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной, выпускаемое отечественным производителем. Извлечения готовили путем нагревания ЛРС с экстрагентом в соотношении 1,5:100 на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 минут. В качестве экстрагента был выбран ацетон согласно рекомендациям литературы [4,5] для максимального извлечения исследуемых пигментов. Полученные извлечения декантировали с остатка сырья и фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата, и наносили на стартовую линию хроматографической пластины марки «Sorbfil» ПТСХ-УФ в количестве 40 мкл.

В эксперименте изучено девять типов элюирующих систем с различными значениями полярности (табл.1). В литературе для этих целей чаще всего предлагаются многокомпонентные системы [1-4,9-11], наиболее часто содержащие такие элюенты как петролейный эфир и ацетон. Вид полученных хроматограмм

представлен на рис. 2. В работе использованы реактивы марки х.ч. (ЗАО «Вектон, Россия).

Таблица 1. Характеристика элюирующих систем

№ п/п	Состав элюента	Полярность
1	Ацетон-петролейный эфир (3:7)	1.62
2	Петролейный эфир-этанол (16:1)	0.31
3	Петролейный эфир-метанол (98:2)	0.13
4	Петролейный эфир-ацетон (95:5)	0.27
5	Метанол-ацетон-вода (20:4:3)	6.68
6	Петролейный эфир-хлороформ (3:1)	1.10
7	Петролейный эфир-бензол-ацетон-кислота уксусная (80:20:2:1)	0.75
8	Петролейный эфир-ацетон (1:1)	2.70
9	Этилацетат-лед. уксусная кислота-вода (7.5:1.5:1.5)	5.24

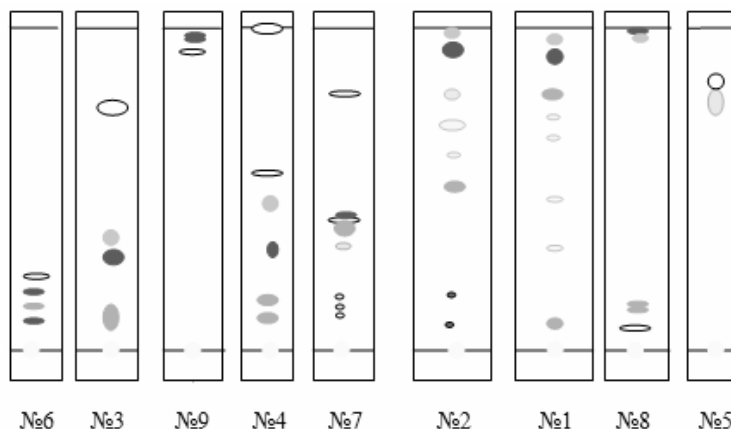


Рис. 2. Вид хроматограмм извлечения из листьев крапивы двудомной, полученных в системах №1-9 (неокрашенные зоны проявлялись в УФ-свете)

Для обоснования возможности использования теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографирования извлечения из листьев крапивы, необходимо было изучить влияние полярности элюентов на хроматографическую подвижность разделяемых пигментов в тонком слое (рис. 3).

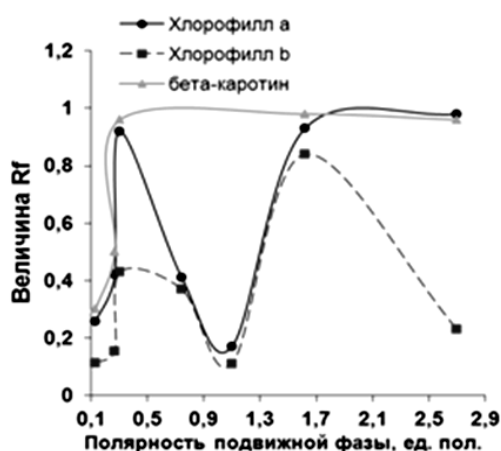


Рис. 3. Влияние полярности элюента на хроматографическую подвижность разделяемых пигментов в тонком слое (на примере хлорофиллов а, b и β -каротина)

Обсуждение результатов

Для каждой элюирующей системы рассчитаны такие хроматографические параметры изучаемых пигментов, как величина (R_f), коэффициент распределения (K) и величина селективности сорбции (L) [12,13] (табл. 2). Идентификацию веществ на хроматограммах осуществляли в видимом и УФ-свете по характерному цвету зон и величинам R_f , описанным в литературе [4,10,11]. Установлено, что элюирующие системы № 5 и 9 не могут быть использованы для разделения и идентификации пигментов листьев крапивы двудомной (рис. 2), поэтому для дальнейших расчетов их не использовали.

Таблица 2. Идентификация хроматографических зон на хроматограммах

№ зоны	Rf±0,02	K	L	Окраска в видимом свете	Окраска в УФ-свете (365нм)	Идентификация вещества [4,10,11]
1	2	3	4	5	6	7
Элюирующая система № 1						
1	0.16	5.25	2.59	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
2	0.33	2.03	4.51	желтая	-	ксантофиллы
3	0.69	0.45	1.22		-	
4	0.73	0.37	1.48		-	
5	0.80	0.25	1.32		-	
6	0.84	0.19	2.53	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
7	0.93	0.08	3.75	темно-зеленая		хлорофилл a
8	0.98	0.02		оранжевая	-	β-каротин
Элюирующая система № 2						
1	0.10	9.00	3.00	коричневая	-	-
2	0.25	3.00	2.26		-	-
3	0.43	1.33	1.50	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0.53	0.89	4.67	желтая	-	ксантофиллы
5	0.84	0.19	1.40		-	
6	0.88	0.14	1.51		-	
7	0.92	0.09	2.14	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
8	0.96	0.04		оранжевая	-	β-каротин
Элюирующая система № 3						
1	0.11	7.77	2.69	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
2	0.26	2.89	1.24	темно-зеленая		хлорофилл a
3	0.30	2.33	10.13	оранжевая	-	β-каротин
4	0.81	0.23		-	желтая	флавоноид
Элюирующая система № 4						
1	0.12	7.33	1.34	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
2	0.16	5.45	3.98	светло-зеленая		хлорофилл b
3	0.42	1.37	1.31	темно-зеленая		хлорофилл a
4	0.49	1.05	1.43	оранжевая	-	β-каротин
5	0.58	0.73	36.5	-	желтая	флавоноид
6	0.98	0.02		-		флавоноид
Элюирующая система № 6						
1	0.08	11.50	1.42	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
2	0.11	8.09	1.66	светло-зеленая		хлорофилл b

1	2	3	4	5	6	7
3	0.17	4.88	1.71	темно-зеленая		хлорофилл а
4	0.26	2.85		-	желтая	флавоноид
Элюирующая система № 7						
1	0.16	5.25	1.40	желтая	-	ксантофиллы
2	0.21	3.76	1.25			
3	0.25	3.00	1.29			
4	0.30	2.33	1.37			
5	0.37	1.70	1.14	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
6	0.40	1.50	1.04	-	желтая	флавоноид
7	0.41	1.44	7.58	темно-зеленая	розовая	хлорофилл а
8	0.84	0.19		-	желтая	флавоноид
Элюирующая система № 8						
1	0.10	9.00	2.25	-	желтая	флавоноид
2	0.20	4.00	1.19	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
3	0.23	3.35	63.21	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0.95	0.053	2.65	оранжевая	-	β -каротин
5	0.98	0.02		темно-зеленая	розовая	хлорофилл а

Как видно из рис. 3, величина R_f β -каротина зависит от полярности элюента в узком диапазоне полярности (от 0,1 до 0,4 ед.). При достижении полярности 0,5 и более ед., величина относительной подвижности β -каротина стремится к единице (перестает зависеть от полярности). Вид зависимости для хлорофиллов а и b имеет отличный характер. Рис. 3 показывает, что величина R_f зеленых пигментов переменна в различных диапазонах полярности, однако, вид кривых сходен между собой, по-видимому, в виду общности структур изучаемых хлорофиллов (рис. 1). Оптимальные величины R_f достигнуты для пигментов листьев крапивы в системах № 3 и 4. Тем не менее выбор оптимальной хроматографической системы для многокомпонентных смесей (таких как извлечение из лекарственного растительного сырья) должен основываться на параметрах, характеризующих эффективность хроматографического процесса и степень разделения веществ на пластинке.

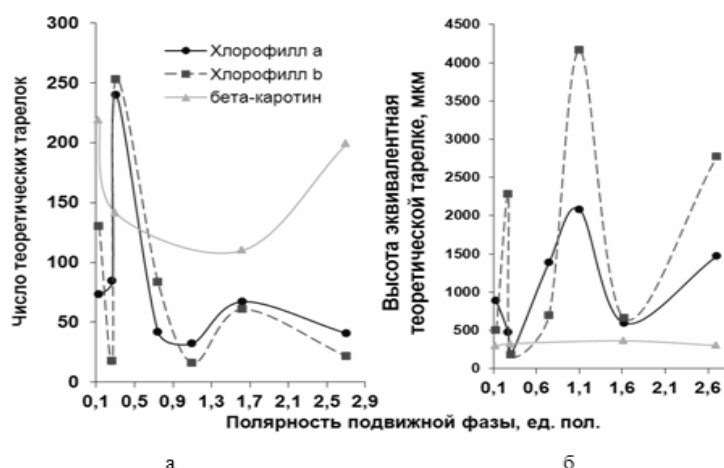


Рис. 4. Зависимость величин N (а) и H (б) от полярности элюента (на примере хлорофиллов а, b и β -каротина)

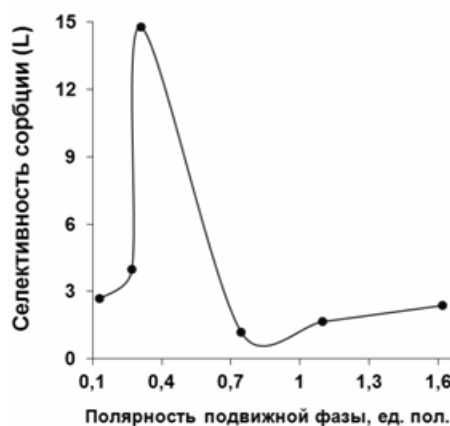


Рис. 5. Влияние полярности системы на разделение хлорофиллов а и b

Для оценки эффективности хроматографического процесса на хроматограммах каждой элюирующей системы были рассчитаны такие хроматографические параметры, как высота, эквивалентная теоретической тарелке (Н) и число теоретических тарелок (N) [12]. Вид зависимостей Н и N от полярности элюента для изучаемых пигментов листьев крапивы двудомной представлен на рис. 4.

Заключение

Таким образом, изучены различные элюирующие системы и проведено теоретическое обоснование выбора оптимальных условий хроматографирования, позволяющих провести разделение и определение пигментов листьев крапивы двудомной (хлорофиллов и каротиноидов) методом ТСХ. Идентификацию пигментов листьев крапивы двудомной можно проводить в системах № 1-4. Однако, лучшей подвижной фазой по совокупности изученных параметров является система № 2, которая может быть рекомендована для включения в современную нормативную документацию на лекарственное растительное сырье крапивы двудомной.

Список литературы:

1. Лупинская С.М., Орехова С.В., Васильева О.Г. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе // Химия раст. сырья. 2010. №3. С. 143-145.
2. ГФ XI. Выпуск 2. М.: Медицина, 1990 г. С. 274-275.
3. Белякова А.В., Вайнштейн В.А., Маркова К.В. и др. Применение синтетических эфиров высших жирных кислот для экстрагирования листьев крапивы // Хим.-фарм. Журн. Том 39. №11. 2005. С. 35-39.
4. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений: Учеб. пособие. Воронеж: ВГУ, 1996. - 188 с.
5. Струсовская О.Г. Определение пигментного состава *Cochlearia officinalis*, произрастающей на островах соловецкого архипелага // Материалы V международной конференции «Фармация и общественное здоровье». Екатеринбург, 2012. С. 184-187.

-
6. Коломиец Н.Э., Калинкина Г.И., Сапронова Н.Н. Стандартизация листьев крапивы двудомной // Фармация. 2011. №6. С. 22-24.
 7. Копытько Я.Ф., Лапинская Е.С., Сокольская Т.А. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор) // Хим.-фарм. Журн. Том 45. №10. 2011. С. 32-40.
 8. Лапинская Е.С., Копытько Я.Ф. Изучение состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной и крапивы жгучей // Хим.-фарм. Журн. Том 42. №12. 2008. С. 26-29.
 9. Петухова Н.М., Теслов Л.С., Бобкова Ю.В. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части яснотки белой и яснотки пурпурной // Сборник научных трудов «Фармация из века в век». Часть III Анализ и стандартизация лекарственных средств. СПб.:Изд-во СПХФА, 2008. С. 115-118.
 10. Кирхнер. Тонкослойная хроматография // М.: Мир, 1981. С. 402-407.
 11. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии // М.: Мир, 1980. Т. 2. С. 610.
 12. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии // М.: Мир, 1999. - 405 с.
 13. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии // Воронеж: Изд-во «Водолей», 2004. - 528 с.
-

Тринеева Ольга Валерьевна – к.фарм.н., ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сливкин Алексей Иванович –д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Воропаева Светлана Владимировна – студент фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Trineeva Olga V. – the candidate pharm. sciences, the assistant to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh, e-mail: lelik83@list.ru

Slivkin Alexey I. – doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh

Voropaeva Svetlana V. – student of pharmaceutical faculty of VGU, Voronezh