



УДК 543.544.943.3.068.8

Идентификация органических кислот методом ТСХ в извлечениях из растительных объектов

Тринеева О.В., Сафонова И.И., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 11.09.2013 г.

Аннотация

На примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной показана возможность определения и разделения свободных органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Ключевые слова: органические кислоты, лекарственное растительное сырье, водные извлечения, тонкослойная хроматография.

On the example of fruits of a Hippophaes rhamnoides and nettle leaves the two-blast furnace showed possibility of definition and division of free organic acids in medicinal vegetable raw materials and water extraction by a chromatography method in a thin layer of a sorbent.

Keywords: organic acids, medicinal vegetable raw materials, water extraction, thin layer chromatography

Введение

Органические кислоты (яблочная, лимонная, винная, щавелевая, янтарная, виноградная, уксусная, муравьиная, изовалериановая, аскорбиновая) — группа биологически активных веществ (БАВ) с широким спектром фармакологического действия. Они обладают витаминными свойствами, оказывают желчегонное действие, нормализуют деятельность пищеварительной системы. Органические кислоты регулируют выделение желчи и панкреатического сока, улучшают аппетит; обладают бактерицидными свойствами и снижают гнилостные процессы в организме [1]. Комплекс органических кислот входит в состав косметических пилингов в качестве кератолитического компонента. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) применяется для получения водных извлечений (настоев и отваров) — лекарственной формы с комплексом водорастворимых БАВ, в том числе органических кислот.

Реакция среды водных извлечений существенна при использовании их у пациентов с заболеваниями органов пищеварения (гастритах, язвах), которым противопоказаны средства с повышенной кислотностью. Поэтому необходимо знать содержание органических кислот в сырье и в водных извлечениях [1,2].

Анализ литературы за последние 10 лет, показал, что большая часть публикаций по количественному определению суммы органических кислот в ЛРС

посвящена методу алкалометрии [1-4]. Государственная фармакопея XI издания (ГФ XI) рекомендует проводить определение содержания органических кислот в ЛРС методом кислотно-основного титрования в присутствии 2 индикаторов. Для водных извлечений нормативная документация (НД) не предусматривает стандартизацию по веществам, составляющим гидрофильную фракцию [2]. Исследование качественного состава органических кислот в официальных видах ЛРС не предусмотрено [3]. Однако, необходимо учитывать данный показатель при разработке новых проектов и изменении уже существующих фармакопейных статей (ФС) на ЛРС.

Физико-химические методы до настоящего времени редко используются для анализа данных БАВ в различных объектах. Метод кулонометрического и потенциометрического титрования описан авторами для определения суммы кислот в плодах шиповника, калины и рябины обыкновенной [2,4]. Среди хроматографических методов наибольшее значение в контроле качества данных БАВ занимает тонкослойная хроматография (ТСХ) [5-12].

Целью настоящей работы являлась разработка методики идентификации органических кислот в ЛРС методом ТСХ на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной.

Эксперимент

Объектом исследования являлось измельченное высушенное ЛРС крапивы двудомной отечественного производителя, соответствующее требованиям НД, а также свежие и высушенные плоды облепихи крушиновидной, собранные в Воронежской области в период полного созревания, согласно правилам заготовки данного вида ЛРС. Сушку плодов производили при температуре 60⁰ до остаточной влажности не более 20%.

Для изучения влияния способа приготовления извлечения на качественный состав органических кислот, были исследованы вытяжки из ЛРС, полученные разными способами.

Получение извлечения из листьев крапивы двудомной: Около 1,0 г (точная навеска) измельченных листьев крапивы двудомной с размером частиц 1,0 - 0,5 мм помещают в колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл воды и выдерживают в течение 2 ч на кипящей водяной бане, затем охлаждают, фильтруют через несколько слоев марли, отжимая ЛРС.

Получение настоя листьев крапивы двудомной по методике ГФ XI: навеску измельченных листьев крапивы двудомной с размером частиц 1,0 - 0,5 мм заливают водой комнатной температуры, взятой с учетом коэффициента водопоглощения сырья, настаивают в инфундирном аппарате на кипящей водяной бане при частом помешивании в течение 15 минут, затем охлаждают при комнатной температуре не менее 45 минут, процеживают, отжимая сырье, и прибавляют воду до требуемого объема извлечения. По правилам ГФ XI настой из листьев крапивы двудомной готовится в соотношении 1:10 [3].

Получение извлечения из свежих и высушенных плодов облепихи крушиновидной: Около 5,0 г (точная навеска) плодов облепихи (в пересчете на абсолютно сухое сырье) разминают и помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл воды и выдерживают в течение 2 ч на кипящей водяной бане, затем охлаждают, фильтруют через несколько слоев марли, отжимая ЛРС.

Получение отвара из свежих плодов облепихи крушиновидной по методике ГФ XI: навеску плодов заливают водой комнатной температуры, настаивают в

инфундирном аппарате на кипящей водяной бане при частом помешивании в течение 30 минут, затем охлаждают при комнатной температуре 10 минут, процеживают, отжимая сырье, и прибавляют воду до требуемого объема извлечения. По правилам ГФ XI отвар из плодов облепихи крушиновидной готовится в соотношении 1:10 [3].

Обсуждение результатов

На первом этапе работы была подобрана оптимальная хроматографическая система, позволяющая идентифицировать и разделить органические кислоты. В качестве стандартных образцов использовали 0,2% водные растворы щавелевой, винной, аскорбиновой, лимонной, яблочной и янтарной кислот. В эксперименте изучены элюирующие системы с различными значениями полярности, чаще всего предлагаемые в литературе для разделения и идентификации органических кислот [7-12] (табл. 1). Полярность хроматографических систем рассчитывали по известной формуле [13], исходя из значений полярности отдельных компонентов [14]. В работе использовались растворители и реактивы марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург). В качестве проявителя был выбран 0,2% спиртовой раствор бромкрезолового зеленого. Органические кислоты проявлялись на хроматограммах в виде желтых пятен на синем фоне.

Таблица 1. Элюирующие системы

| № п/п | Состав элюента | Полярность |
|-------|--|------------|
| 1 | Н-бутанол-муравьиная кислота-вода (5:0,5:2) | 5.47 |
| 2 | Н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) | 6.68 |
| 3 | Этилацетат-муравьиная кислота-вода (3:1:1) | 5.78 |
| 4 | Этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (100:11:11:25) | 5.44 |

Лучшее разделение и качество хроматографических зон достигнуто в системе №4, поэтому она выбрана для идентификации органических кислот в извлечениях из ЛРС. Вид полученных хроматограмм представлен на рис. 1. Для выбранной хроматографической системы были рассчитаны величины относительных скоростей перемещения в тонком слое и коэффициенты распределения (K) для стандартных образцов органических кислот (табл. 2) по формуле 1 [13].

$$K = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad (1)$$

На следующем этапе работы полученные извлечения из исследуемого ЛРС наносили на стартовую линию хроматографической пластины марки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А в количествах 5 и 10 мкл. Оптимальный объем пробы составил 10 мкл. Вид полученных хроматограмм представлен на рис. 2. Идентификация зон на хроматограммах представлена в табл. 3. Селективность сорбции (L), характеризующую степень разделения зон на хроматограммах, рассчитывали по формуле 2 [13]. Результаты свидетельствуют об удовлетворительном разделении хроматографических зон органических кислот на хроматограмме и правомерности использования данной методики [13].



Рис. 1. Вид хроматограммы стандартных образцов органических кислот в системе №4: 1 – щавелевая кислота; 2 – лимонная кислота; 3 – янтарная кислота; 4 – аскорбиновая кислота; 5 – винная кислота; 6 – яблочная кислота. Объем пробы 5 мкл

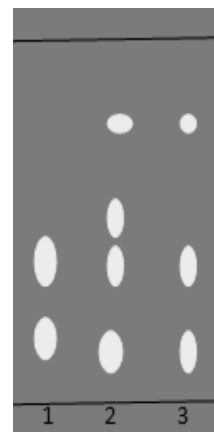


Рис. 2. Вид хроматограммы органических кислот извлечений из ЛРС в системе №4: 1 – извлечение из листьев крапивы двудомной; 2 – извлечение из плодов облепихи крушиновидной высушенных; 3 – извлечение из плодов облепихи крушиновидной свежих. Объем пробы 10 мкл

Таблица 2. Хроматографические параметры органических кислот

| № п/п | Органическая кислота | R_f | K |
|-------|----------------------|-----------|------|
| 1 | Щавелевая кислота | 0,14±0,01 | 6.14 |
| 2 | Винная кислота | 0,36±0,01 | 1.78 |
| 3 | Лимонная кислота | 0,39±0,01 | 1.56 |
| 4 | Аскорбиновая кислота | 0,62±0,01 | 0.61 |
| 5 | Яблочная кислота | 0,80±0,02 | 0.25 |
| 6 | Янтарная кислота | 0,93±0,01 | 0.08 |

$$L = \frac{K_1}{K_2} \quad (2)$$

Таблица 3. Идентификация зон на хроматограммах извлечений из ЛРС

| № п/п | ЛРС | R_f | Органическая кислота |
|-------|---------------------------|-----------|----------------------|
| 1 | Листья крапивы двудомной | 0.13±0.02 | Щавелевая кислота |
| | | 0.35±0.02 | Винная кислота |
| 2 | Плоды облепихи высушенные | 0.13±0.02 | Щавелевая кислота |
| | | 0.35±0.02 | Винная кислота |
| | | 0.40±0.01 | Лимонная кислота |
| | | 0.78±0.02 | Яблочная кислота |
| 3 | Плоды облепихи свежие | 0.13±0.02 | Щавелевая кислота |
| | | 0.35±0.02 | Винная кислота |
| | | 0.78±0.02 | Яблочная кислота |

Установлено, что состав органических кислот в извлечениях не зависит от способа его получения. Увеличение времени экстракции ЛРС не влияет на выход кислот в извлечение (рис. 2), что свидетельствует об устойчивости данных БАВ к длительному нагреванию при температуре кипения водяной бани. Однако, состав органических кислот в извлечениях из высушенных и свежих плодов облепихи крушиновидной несколько отличен. Так в извлечении из плодов облепихи высушенных идентифицирована зона лимонной кислоты, отсутствующая на хроматограмме извлечения из свежих плодов (табл. 3). Свежие плоды содержат органические кислоты как в свободном, так и в связанном виде (простые и сложные эфиры по карбоксильным и гидроксильным группам). При высушивании при температуре 60° в клеточном соке ЛРС протекают процессы гидролиза (ферментативного и неферментативного), что может сопровождаться изменением состава свободных кислот в сырье.

Заключение

Таким образом, обоснован выбор оптимальной системы для идентификации и разделения органических кислот в извлечениях из ЛРС на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной. Проведена идентификация и сравнительная оценка содержания органических кислот в извлечениях, полученных различными способами.

Установлена целесообразность стандартизации плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной по составу органических кислот методом ТСХ. Данный подход может быть применен и к ЛРС других видов. Исследовано влияние процессов высушивания плодов облепихи крушиновидной на состав органических кислот в ЛРС.

Список литературы:

1. Сергунова Е.В., Марахова А.И., Аврач А.С. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях // Фармация. №4. 2013. С. 8-11.
2. Марахова А.И., Супакова О.А., Федоровский Н.Н. и др. Разработка методики потенциометрического определения суммы органических кислот в плодах шиповника // Фармация. №1. 2013. С. 24-27.
3. Государственная Фармакопея XI изд. // М.: Медицина, 1990. Вып. 2. С. 294-297.
4. Абдуллина С.Г., Агапова Н.М., Хазиев Р.Ш., Сидуллина С.А. Определение органических кислот в плодах рябины обыкновенной // Фармация. №2. 2011. С. 17-19.
5. Попова Т.С., Потанина О.Г. Определение аскорбиновой кислоты в почках черной смородины методом ВЭЖХ // Фармация. №2. 2013. С. 11-13.
6. Борисова Д.А., Попов Д.М. Определение аскорбиновой кислоты в первоцвете лекарственным методом ВЭЖХ // Фармация. №3. 2013. С. 22-24.
7. Василенко Е.А., Мезенова Т.Д., Попова О.И., Дмитриев А.Б. Трава бурды плющевидной: определение аскорбиновой кислоты // Фармация. №1. 2013. С. 16-19.
8. Зинченко И.Г., Кисличенко В.С. Определение качественного состава и количественного содержания органических кислот в корнях, траве, листьях и соцветиях тифона // Материалы Всероссийской с международным участием научно-

практической конференции «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики». Курск (апрель, 2011). С. 256-257.

9. Танская Ю.В., Попова О.И. Изучение биологически активных веществ травы чабера садового, культивируемого в условиях Ставропольского края // Труды научно-практической конф. Фармация из века в век. Ч. III. СПб. 2008. С. 151-155.

10. Жуков И.М., Победоносцева М.Н., Салыкина Е.О. Химический состав травы зюзника европейского // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики». Курск (октябрь, 2011). С. 317-319.

11. Бубенчикова В.Н., Малютин А.Ю. Изучение органических кислот травы прозанника крапчатого по фазам вегетации // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики». Курск (октябрь, 2011). С. 302-304.

12. Сушук Н.А., Кисличенко В.С. Изучение органических кислот в почках и ветках смородины черной // Материалы Всероссийской с международным участием научно-практической конференции «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики». Курск (апрель, 2011). С. 254-255.

13. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии // М.: Мир, 1999. 405 с.

14. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии // Воронеж: «Водолей», 2004. 528 с.

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

Сафонова Ирина Игоревна - аспирант кафедры управления экономики фармации и фармакогнозии ВГУ, Воронеж

Сафонова Елена Федоровна - к.х.н. доцент, заведующая кафедрой фармации последипломного образования ВГУ, Воронеж

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

Trineeva Olga V. - the candidate pharm. sciences, the senior lecturer to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh, e-mail: trineevaov@mail.ru

Safonova Irina I. - graduate of pharmaceutical faculty, graduate student of chair of management of economy of pharmacy and pharmacognosiy VGU, Voronezh

Safonova Elena F. - the candidate chem. sciences, the senior lecturer, manager of chair of pharmacy of post-degree formation of VGU, Voronezh

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