



УДК 615.074

Разработка методики хроматографического определения полимониозидов

Мальцева А.А.¹, Брежнева Т.А.¹, Сорокина А.А.², Сливкин А.И.¹,
Карлов П.М.¹, Чистякова А.С.¹, Казьмина О.М.¹

¹ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Поступила в редакцию 3.03.2014 г.

Аннотация

Выбраны и обоснованы оптимальные условия определения полимониозидов методом хроматографии в тонком слое сорбента. Установлено, что корневища с корнями и трава синюхи имеют различный состав тритерпеновых сапонинов. Показано, что в растительном сырье синюхи присутствуют, предположительно, две группы сапонинов, различающиеся по способности к гемолизу эритроцитов крови.

Ключевые слова: сапонины, синюха голубая, тонкослойная хроматография, гемолиз эритроцитов.

Been justified determine the optimal conditions polemoniozids by chromatography in a thin layer of sorbent. It is shown that the rhizomes with roots and grass cyanosis have a different composition of triterpene saponins. It is shown that the plant material present cyanosis presumably saponins two groups differing in their ability to hemolysis of red blood cells.

Keywords: Saponins, Polemonium coeruleum, thin layer chromatography, hemolysis of red blood cells

Введение

Синюха голубая – *Polemonium coeruleum* L., растение семейства синюховые – Polemoniaceae, достаточно широко распространенное в средней полосе России. Корневища с корнями синюхи – *Rhizomata cum radicibus Polemonii*, включены в Государственной Фармакопее (ГФ) XI в качестве отхаркивающего средства, применяемого в форме отвара.

Синюха голубая в 1932г. была предложена для медицинского применения профессором М.Н. Варлаковым (Томский медицинский институт) как заменитель импортной сенеги и активно изучалась в 50-х – 60-х годах XX века. В СССР растение культивировалось в Белоруссии, западной части Украины, Прибалтике, Западной Сибири, центральной части Нечерноземья России. В настоящее время корневища с корнями синюхи имеют ограниченное применение и практически перестали реализовываться через аптечную сеть [1,10].

В связи с тем, что данные по химическому составу биологически активных веществ (БАВ) синюхи голубой относятся к 50-60 годам XX в. углубленное изучение основной группы БАВ растения – тритерпеновых сапонинов, является актуальным.

Целью настоящей работы являлось разработка методики и исследование сапонинов синюхи голубой методом тонкослойной хроматографии.

Эксперимент

Объектами исследования являлись высушенные корневища с корнями синюхи и трава синюхи голубой, заготовленные в Воронежской области согласно основным правилам сбора различных морфологических групп сырья и стандартизованные согласно требованиям ГФХI [2].

При изучении основных параметров хроматографирования, позволяющих провести анализ сапонинов синюхи голубой методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), в качестве стандартного образца, ввиду отсутствия стандартных образцов полемонизидов, а также схожести структуры, использовали спиртовой раствор рабочий стандартный образец (PCO) β – эсцина [3] в концентрации 0,05%.

На первом этапе эксперимента были подобраны оптимальные условия хроматографирования полемонизидов (на примере PCO β – эсцина).

В качестве детектирующего реагента для определения сапонинов методом ТСХ в научной литературе предпочтение отдается 25%-ному спиртовому раствору кислоты фосфорно-вольфрамовой, дающей более отчетливое окрашивание пятен, сохраняющееся долгое время, а также обладающему высокой чувствительностью и специфичностью [2]. Выбор проявителя осуществляли с учетом таких требований как специфичность, чувствительность, доступность, высокое качество получаемой картины, а также контрастность хроматографических зон и фона (табл.1.).

Так как сапонины синюхи обладают высоким гемолитическим индексом [4], то для их анализа можно использовать реакцию, обладающую наибольшей специфичностью и чувствительностью при обнаружении данной группы веществ на хроматограммах - реакцию гемолиза эритроцитов крови [5]. При этом пластину обрабатывают раствором дефибринолизированной крови с желатиной. Гемолитическая активность тритерпеноидов зависит от структуры агликона, при этом углеводная часть может как усиливать, так и ослаблять эффект, т.е. гемолитическая активность будет зависеть также от количества и места присоединения к агликону углеводных молекул.

Как видно из табл. 1., для обнаружения сапонинов при проведении анализа методом ТСХ наиболее специфичной и чувствительной (предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7}$) являлась реакция гемолиза эритроцитов [5]. При этом зоны сапонинов проявлялись на хроматограммах в виде пятен белого цвета (зоны гемолиза) на красном фоне. Однако, ввиду технологических преимуществ (большая доступность, простота исполнения, время, затрачиваемое на проведение эксперимента) в качестве оптимального детектирующего реагента для определения сапонинов синюхи был выбран 25%-ный спиртовой раствор кислоты фосфорно-вольфрамовой (ФВК), с последующим нагреванием при 105°C в сушильном шкафу в течение 5 минут (предел обнаружения $1 \cdot 10^{-6}$). Реакция гемолиза эритроцитов использовалась для идентификации сапонинов, расчета R_f зон сапонинов, с целью подтверждения полученных в эксперименте данных.

Была проведена работа по подбору оптимальной хроматографической системы для определения сапонинов синюхи голубой методом ТСХ [2], изучены хроматографические системы, обычно рекомендуемые литературными источниками для разделения суммы сапонинов.

Таблица 1. Характеристика детектирующих реагентов для определения сапонинов синюхи голубой в тонком слое сорбента

№ п/п	ТСХ – анализ сапонинов		
	Детектирующий реагент	Эффект	Предел обнаружения, г
1	Без проявителя	Зон сапонинов не наблюдается	-
2	УФ свет	Не обладает способностью к флуоресценции	-
3	Серная кислота (конц.)	Зоны сапонинов приобретают красное окрашивание, наблюдается обугливание пластинки	$1 \cdot 10^{-4}$
4	5% спиртовой раствор ФМК	Синее окрашивание пятен на зеленоватом фоне	$1 \cdot 10^{-5}$
5	5 % спиртовой раствор ФМК + УФ свет	Не обладает способностью к флуоресценции	-
6	25% спиртовой раствор ФВК	Розово – фиолетовое окрашивание зон сапонинов	$1 \cdot 10^{-6}$
7	25% спиртовой раствор ФВК + УФ свет	Не обладает способностью к флуоресценции	-
8	Гемолиз эритроцитов	Наличие белых зон гемолиза на красном фоне	$1 \cdot 10^{-6}$

Для каждой элюирующей системы были рассчитаны критерии эффективности хроматографического процесса (табл.2.).

Таким образом, по совокупности представленных параметров и качеству хроматографической картины для определения сапонинов методом ТСХ выбрана система под номером 1.

В результате проведенной работы определены оптимальные условия хроматографирования сапонинов методом ТСХ на модели РСО β – эсцина.

В ходе предварительных исследований для проведения ТСХ-анализа сапонинов синюхи голубой подобраны следующие условия: хроматографические пластинки марки «Sorbfil» размером 10×10 см с алюминиевой подложкой марки ПТСХ–АФ–А; элюирующая система бутанол–этанол–аммиак (7:2:5), время насыщения камеры парами элюента 20 мин; детектирующий реагент – 25% раствор фосфорно – вольфрамовой кислоты, для созревания окраски пластины выдерживали в сушильном шкафу при температуре 105°C.

Разработанная методика была применена к анализу данной группы веществ в корневищах с корнями и траве синюхи голубой (рис. 1,2). На хроматографические пластины наносили по 1, 2, 3, 4, 5 мкл спиртовых извлечений, полученных при нагревании сырья в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником [6]. В качестве раствора свидетеля наносили 5 мкл стандартного раствора β -эсцина в концентрации 1 мг/мл. Оптимальным объемом наносимой пробы является объем 4 мкл спиртового извлечения, дальнейшее увеличение объема приводит к «эффекту нагрузки».

В корневищах с корнями синюхи содержится пять сапонинов – полемониозиды А,В,С,Д,Е [7-9]. По данным ГФ XI [2,3] при хроматографировании корневищ с корнями синюхи в системе *n*-бутанол – метанол–вода (5:3:1) должно

наблюдаться пять зон с R_f от 0,4 до 0,6, дающих розово-фиолетовую окраску после обработки 25%-ным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. В связи с расхождением полученных результатов с данными литературы, мы сочли целесообразным провести дополнительное исследование сапонинов синюхи в системе *n*-бутанол–метанол–вода (5:3:1).

Таблица 2. Основные параметры хроматографирования РСО β -эсцина

№	Элюирующая система	R_f	H, см	N	P'
1	Бутанол–этанол–аммиак (7:2:5)	0.50±0.01	0.0012	7056	6.15
2	Бутанол– кислота уксусная–вода (4:1:5)	0.45±0.02	0.0099	784	7.26
3	Бутанол–метанол–вода (5:3:1)	0.61±0.02	0.0265	324	5.54
4	Бутанол–этанол–вода (5:3:1)	0.47±0.02	0.103	75.8	5.32
5	Хлороворм–метанол–вода (26:14:3)	0.69±0.02	0.078	90.7	4.83
6	Хлороформ–этилацетат– кислота уксусная (4:10:5)	0.65±0.02	0.0189	368	4.69
7	Хлороформ–метанол (9,5:1,5)	разделения на зоны не наблюдается	-	-	4.12
8	Ацетон– кислота уксусная–петролейный эфир (45:10:45)	разделения на зоны не наблюдается	-	-	-
9	Этилацетат–метанол–вода– кислота уксусная (15:1:2:0,5)	0.4±0.02	0.054	144	5.08
11	Этилацетат – четырёххлористый углерод (8:2)	разделения на зоны не наблюдается	-	-	3.52

Анализируя полученные данные, следует отметить, что в системе, рекомендуемой ГФ XI, разделения сапонинов корневищ с корнями и травы синюхи не наблюдалось. При использовании элюирующей системы *n*-бутанол–этанол–аммиак (7:2:5) при анализе сапонинов корневищ с корнями синюхи, наблюдалось наличие шести четких зон, три из которых после обработки 25%-ным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты имели классическую розово-фиолетовую окраску и три зоны отвечали коричневатой окраске. При анализе травы синюхи наблюдалось наличие пяти четких зон, одна из которых имела розово-фиолетовую окраску. Четкое разделение суммы веществ на зоны в выбранной системе и классический вид хроматограммы подтверждают кислый характер сапонинов синюхи [8].

На хроматограммах, детектированных с помощью реакции гемолиза эритроцитов, четко фиксировались по три зоны гемолиза для корневищ с корнями синюхи и для травы синюхи. Полученные зоны сапонинов по величинам R_f соответствовали зонам сапонинов, окрашенным в коричневатый цвет при обработке хроматографических пластин 25%-ным раствором кислоты фосфорно-вольфрамовой. Коричневая окраска пятен, очевидно, объясняется присутствием в

структуре соединений большого количества сильно разветвленных углеводных цепей [7].

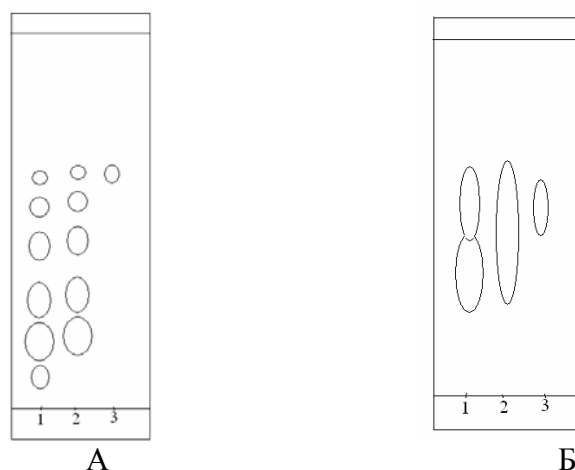


Рис. 1. Хроматограмма сапонинов растительного сырья синюхи голубой
1 – спиртовое извлечение из корневищ с корнями синюхи, 2 – спиртовое извлечение из травы синюхи, 3 – стандартный раствор β -эсцина. Объем наносимых проб 4 мкл; детектирующий реагент – 25%-ный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты. А: элюирующая система бутанол – этанол – аммиак (7:2:5) Б: элюирующая система *n*-бутанол–метанол–вода (5:3:1) – система ГФ XI

Таблица 3. Критерии эффективности хроматографического процесса определения сапонинов корневищ с корнями и травы синюхи голубой

Хроматографическая система	Rf, ± 0.02	N, число теоретических тарелок	H, высота, эквивалентная одной теоретической тарелке	K, коэффициент распределения	L селективность сорбции
<i>n</i> -бутанол – этанол – аммиак (7:2:5)	Корневища с корнями синюхи				
	0.5	6724	0.00123	1	1.32
	0.46	5041	0.0016	1.32	1.18
	0.41	655	0.0125	1.564	1.73
	0.27	484	0.017	2.7	1.65
	0.18	144	0.057	4.46	1.5
	0.13	121	0.068	6.69	
	Трава синюхи				
	0.48	4761	0.0015	1.127	1.08
	0.44	4356	0.0017	1.222	1.13
	0.42	1708	0.0043	1.381	2.06
	0.26	361	0.02	2.846	1.60
	0.18	108.16	0.0675	4.555	

Наличие на пластине зон, имеющих розово-фиолетовое окрашивание и R_f от 0,13 до 0,27, также свидетельствовало о присутствии тритерпеноидов. Столь низкие величины R_f , малохарактерные для тритерпеновых гликозидов в данной элюирующей системе, объясняются, вероятно, тем, что с увеличением степени гидроксирования подвижность соединений уменьшается во всех системах растворителей [5]. Однако, данные соединения, несмотря на тритерпеновую природу, не обладают способностью к гемолизу эритроцитов. Шлессер и Вулфф объясняли подобное поведение тритерпеноидов тем, что проявлению гемолитической активности препятствует наличие сильнополярных группировок в кольцах D и E агликонов (ацилозиды и бидесмозиды) [11].

Для элюирующей системы *n*-бутанол–этанол–аммиак (7:2:5) были рассчитаны критерии эффективности хроматографического процесса, а также значение селективности сорбции и коэффициента распределения (табл. 3).

Заключение

Разработана методика качественного хроматографического обнаружения тритерпеновых сапонинов в сырье синюхи голубой. Установлено, что корневища с корнями и трава синюхи имеют различный состав сапонинов. Показано, что в растительном сырье синюхи присутствуют, предположительно, две группы сапонинов, различающиеся по способности к гемолизу эритроцитов крови.

Список литературы

1. Мальцева А.А., Брежнева Т.А., Мироненко Н.В., Селеменев В.Ф. и др. Получение и стандартизация сапонинсодержащего препарата синюхи голубой // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т.6. Вып. 6. С. 1450-1454.
2. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир, 1999. 405 с.
3. Изменение №1 к ГФ XI, вып.2, ст.74. «Корневища с корнями синюхи» от 08.07.1998г.
4. Бузунова М.М. Гемолитический индекс синюхи лазурной и синюхи Ван-Брюнте // Тезисы XI научной конференции. Томск. 1952. С. 29-30.
5. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: в 2 т. М.: Мир, 1980. Т. 2. 610 с.
6. Явич П.А., Гоциридзе А.В., Чурадзе Л.И. Исследования процессов форэкстракции и экстракции сапонинсодержащего сырья // Фармация. 2001. № 3. С. 13-16.
7. Бухаров В.Г., Шайхутдинов В.А., Карнеева Л.Н. Исследование гликозидов *Polemonium coeruleum* // Химия природных соединений. 1969. № 6. С. 498-504.
8. Мальцева А.А. Исследование комплекса биологически активных веществ растения *Polemonium coeruleum* L.: дис. ... канд. фарм. наук. М. 2011. 186 с.
9. Мальцева А.А., Мироненко Н.В., Боева С.А., Селеменев В.Ф. и др. Хроматографическое исследование сапонинного состава растительного сырья и фитопрепаратов синюхи голубой // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7, Вып.1-2. С.695-698.
10. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1989. Вып. 2: Лекарственное растительное сырьё. 400 с.
11. Деканосидзе Г.Б. Исследования тритерпеновых гликозидов. Тбилиси: Мецниереба. 1982. 152 с.

Мальцева Алевтина Алексеевна – к.фарм.н., ассистент кафедры управления и экономики фармации и фармакогнозии, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.: (473) 2530428

Чистякова Анна Сергеевна - ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Сорокина Алла Анатольевна - д.ф.н., профессор, кафедры фармакогнозии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Сливкин Алексей Иванович — д.ф.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ, Воронежский государственный университет, Воронеж

Брежнева Татьяна Александровна – к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Карлов Павел Михайлович - доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Казьмина Ольга Михайловна – интерн кафедры фармации последипломного образования ВГУ, Воронежский государственный университет, Воронеж

Maltseva Alevtina A. – PhD, Assistant of chair of Management and Economics of Pharmacy and Pharmacognosy, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: alinevoroneg@mail.ru

Chystiakova Anna S. - Assistant of chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: anna081189@yandex.ru

Sorokina Alla A. - PhD, the professor of chair of Pharmacognosy I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, e-mail: sorokinaalla@mail.ru

Slivkin Alexey I. — PhD, the professor, head of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty, Voronezh State University, Voronezh, slivkin@pharm.vsu.ru

Brezhneva Tatiana A. - PhD, Associate professor of chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty, Voronezh State University, Voronezh

Karlov Pavel M. - PhD, Associate professor of chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty, Voronezh State University, Voronezh

Kaz'mina Olga M. - Intern Department of Pharmacy Postgraduate Education, Voronezh State University, Voronezh