

УДК 615.322:582.734.4:581.45.07..

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНОГО СОСТАВА СУХОГО ЭКСТРАКТА “НЕФРОФИТ”

А.А. Маркарян*, А.А. Абрамов

(кафедра радиохимии; e-mail. aaa@radiochem.msu.ru)

Проведено изучение фенольного состава сухого экстракта “Нефрофит” методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлен качественный и количественный состав индивидуальных соединений, относящихся к основным группам биологически активных веществ фенольного происхождения. На основании полученных экспериментальных данных разработаны унифицированные методики качественного ТСХ- и ВЭЖХ-анализа сухого экстракта “Нефрофит”.

Актуальность исследования заболеваний почек и поиск возможных путей повышения эффективности фармакотерапии нефропатий определяется широкой распространенностью и наблюдающейся тенденцией к росту нефрологической патологии в общей структуре заболеваемости [1, 2].

Синтетические препараты, используемые в базисной фармакотерапии заболеваний почек, обладая, как правило, одним видом активности, могут оказывать неблагоприятное влияние на их функции [3–5]. Несмотря на то что решение проблем нефрологической патологии имеет большое медицинское и социальное значение, выбор препаратов, оказывающих комплексное нефропротекторное действие, в настоящее время весьма ограничен, а следовательно, существует необходимость создания и внедрения в медицинскую практику новых комплексных растительных средств и биологически активных пищевых добавок [6, 7].

Исходным сырьем для получения сухого экстракта “Нефрофит” служили сухие экстракты из лекарственных растений. В экстракте горца птичьего содержатся флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, фенолкарбоновые и органические кислоты, а также соединения кремниевой кислоты. В экстракте ортосифона тычиночного содержатся флавоноиды, жирные и органические кислоты, мезоинозит, дубильные вещества, а также тритерпеновые сапонины. В экстракте толокнянки содержатся фенологликозиды, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и дубильные вещества [7–9]. Представляется необходимым детальное изучение фенольной фракции экстракта, как основной группы биологически активных веществ, влияющей на проявление “Нефрофитом” специфической фармакологической активности. Для этой цели целесообразно использовать приведенные выше данные о

химическом составе экстрактов, а также результаты фармакологического скрининга.

Изучение состава фенольных соединений сухого экстракта (СЭ) “Нефрофит” современными физико-химическими методами явилось целью настоящей работы.

Экспериментальная часть

Сухой экстракт “Нефрофит” получали экстракцией 40%-м этиловым спиртом с последующим удалением экстрагента и сушкой в вакуум-сушильном шкафу. Данный способ получения экстракта обладает рядом преимуществ перед отваром (главное преимущество состоит прежде всего в том, что сводит к минимуму потери ценнейших биологически активных веществ). В отваре не определяют содержание действующих веществ, что затрудняет его дозировку и контроль качества. Кроме того, лекарственные препараты как при хранении, так и при употреблении удобнее использовать в твердой форме, чем в жидкой [7].

На первом этапе мы проводили изучение фенольного состава препарата “Нефрофит” методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

В качестве неподвижной фазы использовали пластины “KIESELGEL 60 F254” фирмы “Merk” размером 20×20 см. Хроматографирование проводили в системе растворителей: этилацетат–метилэтилкетон–муравьиная кислота–вода в соотношении 50:30:10:10. Смесь растворителей помещали в стеклянную камеру для хроматографии, которую насыщали в течение 2 ч. В качестве объекта изучения использовали 70%-е спиртовое извлечение из сухого экстракта “Нефрофит”.

Методика получения извлечений

В колбу объемом 200 мл помещали 0,5010 г сухого экстракта “Нефрофит”, прибавляли 70 мл 70%-го

этилового спирта, присоединяли ее к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания спирто-водной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу и объем доводили растворителем до метки. На водяной бане упаривали 20 мл извлечения и растворяли остаток в 3 мл смеси этилацетат:метанол в соотношении (95:5).

В качестве растворов сравнения использовали 0,05%-е растворы рабочих стандартных образцов рутина, кверцетина, галловой кислоты, хлорогеновой кислоты, апигенина, гиперозида, гисперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида в смеси растворителей: этилацетат:метанол в соотношении (95:5). Для приготовления рабочих стандартных образцов 0,05 (точные массы) РСО рутина, кверцетина, галловой и хлорогеновой кислот, апигенина, гиперозида, гисперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, арбутина помещали в мерные колбы объемом 100 мл, прибавляли по

50 мл вышеуказанной смеси растворителей, перемешивали до растворения РСО и доводили до метки тем же растворителем.

Методика проведения анализа

На линию старта хроматографической пластины наносили по 30 мкл исследуемого раствора и по 20 мкл рабочих стандартных образцов рутина, кверцетина, галловой и хлорогеновой кислот, апигенина, гиперозида, гисперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, арбутина, затем высушивали пластину на воздухе до полного улетучивания растворителей. Пластины с нанесенными пробами помещали в камеру и хроматографировали восходящим способом. Длина пробега растворителей составляла 18 см. Пластины высушивали при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного улетучивания растворителей и опрыскивали 5%-м раствором фосфорномолибденовой кислоты в 95%-м этаноле, затем нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105°C в течение

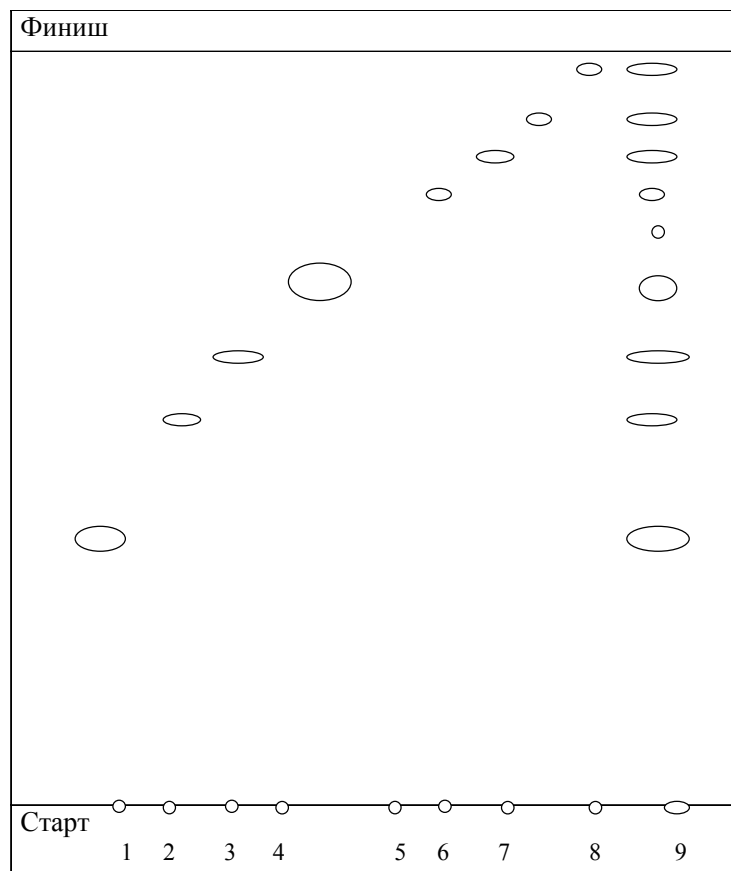


Схема тонкослойной хроматограммы фенольных соединений 70%-го спиртового извлечения из сухого экстракта "Нефрофит": 1 – РСО рутина, 2 – РСО хлорогеновой кислоты, 3 – РСО гиперозида, 4 – РСО арбутина, 5 – РСО галловой кислоты, 6 – РСО лютеолина, 7 – РСО кверцетина, 8 – РСО апигенина, 9 – 70%-е спиртовое извлечение из сухого экстракта "Нефрофит"

Т а б л и ц а 1

Результаты исследования фенольных соединений “Нефрофита” и сухих экстрактов, входящих в его состав, методом ТСХ

Проба	R _f пятен	R _f рутина	R _f кверцетина	R _f хлорогеновой кислоты	R _f гиперозида	R _f арбутина	R _f галловой кислоты	R _f лютеолина	R _f апигенина	Идентифицировано	Неидентифицировано
Извлечение 70%-м этанолом	0,29	0,29								Рутин хлорогеновая кислота гиперозид арбутин галловая кислота лютеолин кверцетин апигенин	1 зона с R _f 0,64
	0,36			0,36							
	0,42				0,42						
	0,55					0,55					
	0,64										
	0,72						0,72				
	0,76							0,76			
	0,82		0,82								
	0,86								0,86		
Извлечение из сухого экстракта почечного чая 70%-м этанолом	0,53									галловая кислота лютеолин	2 зоны с R _f 0,53; 0,62
	0,62										
	0,71										
	0,76										
Извлечение из сухого экстракта толокнянки 70%-м этанолом	0,11									лютеолин галловая кислота арбутин гиперозид рутин	4 зоны с R _f 0,11; 0,23; 0,40; 0,63
	0,23										
	0,29										
	0,42										
	0,40										
	0,55										
	0,63										
	0,71										
	0,76										
Извлечение из сухого экстракта спорыша 70%-м этанолом	0,11									рутин гиперозид арбутин галловая кислота лютеолин кверцетин	3 зоны с R _f 0,11; 0,23; 0,63
	0,23										
	0,29										
	0,42										
	0,40										
	0,55										
	0,63										
	0,71										
	0,76										

5 мин. После проявления детектором на хроматограмме в исследуемом растворе было обнаружено 9 окрашенных в синий цвет зон: $R_f \approx 0,29$ (рутин), $R_f \approx 0,36$ (хлорогеновая кислота), $R_f \approx 0,42$ (гиперозид), $R_f \approx 0,55$ (арбутин), $R_f \approx 0,72$ (галловая кислота), $R_f \approx 0,76$ (лютеолин), $R_f \approx 0,82$ (кверцетин), $R_f \approx 0,86$ (апигенин) (табл. 1, рисунок).

Параллельно в тех же условиях проведено исследование на наличие вышеназванной группы веществ в сухих экстрактах ортосифона, толокнянки и спорыша. Результаты приведены в табл. 1.

Проведенные исследования 70%-го водно-спиртового извлечения “нефрофита” методом ТСХ показали, что в составе исследуемого образца находятся соединения фенольной природы, идентичные рутину, кверцетину, апигенину, лютеолину, гиперозиду, галловой и хлорогеновой кислотам, подтверждено также наличие арбутина; одна зона хроматограммы с $R_f \approx 0,64$ не идентифицирована. Фенольные соединения по составу идентичны таковым в индивидуальных сухих экстрактах, что подтверждает подлинность экстракта по компонентному составу.

Т а б л и ц а 2

Результаты исследования фенольных соединений сухого экстракта “Нефрофит” методом ВЭЖХ

Наименование РСО	Время удерживания РСО, мин	Компоненты исследуемого образца	Идентифицировано
Апигенин	32,98	+	апигенин
Арбутин	4,784	+	арбутин
Гиперозид	19,02	+	гиперозид
Геспередин	16,61	+	геспередин
Галловая кислота	5,224	+	галловая кислота
Кверцетин	58,25	+	кверцетин
Кофейная кислота	5,905	+	кофейная кислота
Лютеолин	6,803	+	лютеолин
Лютеолин-7-гликозид	13,15	+	лютеолин-7-гликозид
Рутин	24,83	+	рутин
Хлорогеновая кислота	11,26	+	хлорогеновая кислота
РСО	–	11 веществ	не идентифицировано

На втором этапе изучения фенольного состава сухого экстракта использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе (“*Gilston*”, Франция) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы “*Мультихром*” для “*Windows*”.

В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка Platinum EPS C–18 100 Å (4,6×250 мм); в качестве подвижной фазы использовали смесь метанол–вода–концентрированная фосфорная кислота в соотношении 40:60:0,5; анализ проводили при комнатной температуре; скорость подачи элюента составляла 0,6 мл/мин. Продолжительность анализа – 63,85 мин. Детектирование проводили с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм.

В колбу объемом 200 мл помещали 0,5010 г “нефрофита”, прибавляли по 70 мл 70%-го этилового спирта, затем присоединяли ее к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания спирто-водной смеси. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, и объем доводили растворителем до метки (исследуемый раствор).

Параллельно готовили серию 0,05%-х растворов флавоноидных веществ в метаноле (рутин, кверцетин, лютеолин, лютеолин-7-гликозид, галловая, кофейная и хлорогеновая кислоты, апигенин, геспередин, гиперозид, арбутин).

В хроматограф вводили по 1 мкл исследуемого раствора и растворов стандартных образцов и проводили хроматографию по приведенной выше методике.

Результаты исследований представлены в табл. 2. Полученные в результате анализа данные позволяют сделать вывод о присутствии в изучаемом объекте следующих фенольных соединений: рутина, хлорогеновой, галловой и кофейной кислот, гиперозида, арбутина, лютеолина, кверцетина, апигенина, лютеолина-7-гликозида и геспередина (11 веществ, выделенных в описанных выше условиях, не идентифицировано).

Методом внутренней стандартизации определено, что в исследуемом веществе среди флавоноидов содержится больше всего лютеолина (15,12%), среди фенолкарбоновых кислот содержится больше всего

галловой (12,90%) и кофейной (10,00%) кислот; 16,40% среди выделенных веществ занимает арбутин.

С помощью ВЭЖХ удалось не только подтвердить качественный фенольный состав, идентифицированный методом ТСХ, но и значительно его расширить. Удалось также получить представление о том, какие фенольные соединения доминируют в изучаемом сухом экстракте, что представляется крайне необходимым, так как из данных о количественном содержании полифенолов можно сделать вывод о вкладе той или иной группы в проявление экстрактом специфического фармакологического действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Игнатова М.С., Вельтищев Ю.Е. Детская нефрология. Л., 1989.
2. Тареева И.Е. Нефрология. М., 2000.
3. Барабой В.А. // Валеология. СПб., 1993. С. 107.
4. Колесова В.Г., Батурина С.А., Дробышев С.И. и др. // Эфферентная терапия. 1996. №1. С. 67.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., Т. 1. 1984.
6. Запрометнов М.Н. Фенольные соединения. М., 1993.
7. Лонишаква К.С., Убашеев И.О., Шантанова Л.Н. и др. // Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов. Томск, 1997. Т. 9. С. 66.
8. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск, 1991.
9. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. М., 1990.

Поступила в редакцию 08.04.03

CHROMATOGRAPHIC STUDY OF THE PHENOLIC COMPOSITION OF DRY EXTRACT "NEPHROPHYT"

A.A. Markarian, A.A. Abramov

(Division of Radiochemistry; e-mail. aaa@radiochem.msu.ru)

Phenolic composition of the dry extract has been studied by methods of thin layer and high performance liquid chromatography. Qualitative and quantitative composition of individual units, of the main groups of biologically active substances of phenolic origin has been defined. Based on the obtained experimental data unified strategies of qualitative analysis of the dry extract has been designed.