

УДК 615.32:547.972+543.544

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ ФАРМАКОПЕЙНЫХ ВИДОВ ЗВЕРОБОЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© Л.Н. Зими́на, В.А. Куркин*, В.М. Ры́жов

Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская, 89,
Самара, (Россия), e-mail: vakur@samaramail.ru

Проведено сравнительное фитохимическое исследование с использованием метода ВЭЖХ образцов травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* Grantz). Установлено, что доминирующим флавоноидом травы зверобоя пятнистого является гиперозид, обладающий антидепрессантной активностью. Выявлены отличия химического состава сравниваемых видов. Установлено, что содержание гиперозида в траве зверобоя пятнистого в три раза больше, чем в зверобое продырявленном.

Ключевые слова: зверобой продырявленный, зверобой пятнистый *Hypericum maculatum* Grantz., *Hypericum perforatum* L., антидепрессантная активность, гиперозид, рутин, флавоноиды, стандартизация.

Введение

В настоящее время в качестве источника антидепрессантных лекарственных препаратов служит трава зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.). Однако на фармацевтическом рынке Российской Федерации имеются только импортные дорогостоящие препараты («Деприм» и др.) [1, 2].

В России фармакопейными видами являются зверобой продырявленный и зверобой пятнистый, причем данные виды рассматриваются как равноценные с точки зрения получения антисептических и вяжущих средств. Однако по последним литературным данным обнаружены некоторые отличия в химическом составе фармакопейных видов [3].

Учитывая тот факт, что антидепрессантные свойства обусловлены несколькими группами действующих веществ (антраценпроизводными, некоторыми флавоноидами, флороглюцинами), представляется актуальным изучение особенностей химического состава биологически активных соединений (БАС) травы зверобоя пятнистого в плане оценки перспективы использования данного вида как источника импортозамещающих антидепрессантов.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение флавоноидного состава травы зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Зими́на Любо́вь Николаевна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, тел.: (846) 260-33-59, факс: (846) 333-29-76, e-mail: zymynal@gmail.com

Куркин Влади́мир Алекса́ндрович – заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, доктор фармацевтических наук, профессор, тел.: (846) 260-33-59, факс: (846) 333-29-76, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru; vakur@samaramail.ru

Ры́жов Вита́лий Миха́йлович – ассистент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кандидат фармацевтических наук, тел.: (846) 260-33-59, факс: (846) 333-29-76, e-mail: lavr_rvm@mail.ru

Экспериментальная часть

Исследованию подвергались воздушно-сухие образцы травы зверобоя пятнистого и зверобоя продырявленного, заготовленные в фазу цветения (июль 2008 г.). Заготовку осуществляли в Республике Марий Эл (Медведевский район) и Самарской области. В качестве веществ сравнения использовали достоверно известные рабочие стандартные образцы (РСО) гиперозида, рутина, кверцетина и бисапигенина, полученные нами ранее из сырья зверобоя продырявленного.

* Автор, с которым следует вести переписку.

В ходе сравнительных исследований качественного и количественного флавоноидных составов методом ВЭЖХ использовали водно-спиртовые извлечения, полученные из травы зверобоя пятнистого и зверобоя продырявленного с использованием 70% этилового спирта.

Сравнительный фитохимический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Милюхром-5» в изократическом режиме (колонка КАХ 6-80-4 №6 25.01.99, стационарная фаза – «Серогон C₁₈»). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и воды в различных соотношениях с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты. Скорость потока элюента в анализе составляла 0,1 мкл/мин. Детекцию осуществляли при аналитической длине волны $\lambda_{\max} = 360$ нм. Для обнаружения возможных сопутствующих веществ использовали дополнительные длины волн: 254; 270; 290; 330 нм.

Результаты и обсуждение

Предварительные исследования по подбору оптимальных условий разделения показали, что элюирующая система растворителей в соотношении 25 : 75 ацетонитрила и воды с добавлением 1% уксусной кислоты позволяет разделять и детектировать в сравниваемых объектах три флавоноидных структуры: рутин гиперозид и кверцетин (рис. 1 и 2).

Известно, что для травы зверобоя продырявленного характерно наличие флавоноида бисапигенина [2], однако в условиях системы растворителей ацетонитрила и воды (25 : 75) с добавлением 1% уксусной кислоты бисапигенин не обнаруживается ни в зверобое продырявленном, ни в зверобое пятнистом (рис. 1 и 2).

В этой связи проведены дополнительные исследования по подбору оптимальных условий хроматографирования, позволяющих детектировать наличие бисапигенина в траве зверобоя продырявленного (рис. 3). Однако в случае зверобоя пятнистого бисапигенин не обнаружен (рис. 4). Следовательно, наличие бисапигенина характерно лишь для травы зверобоя продырявленного.

Установлено, что доминирующим флавоноидом извлечений из травы зверобоя пятнистого является гиперозид (пик № 2) (рис. 1), тогда как рутин определен лишь в следовых количествах.

Что касается зверобоя продырявленного, то в извлечениях из сырья данного растения преобладает рутин (пик 1) на фоне достаточно высокого содержания гиперозида (пик № 2) (рис. 2).

Кверцетин (пик № 3) обнаружен в обоих видах (рис. 1 и 2), однако содержание данного компонента невысокое.

Достоверность идентификации пиков на хроматограммах подтверждали использованием в методиках анализа соответствующего внутреннего стандартного вещества. Значения времени удерживания пиков индивидуальных веществ представлены в таблицах 1 и 2, а также на хроматограммах извлечений (рис. 1–4).

В области соответствующего времени удерживания для РСО рутина (пик № 1) в аналогичных условиях хроматографирования в траве зверобоя пятнистого обнаружен незначительный пик данного вещества (рис. 1).

Принимая во внимание то обстоятельство, что флавоноидный состав зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого имеет некоторые различия, представляет интерес количественная оценка уровня содержания флавоноидов в исследуемых видах зверобоя.

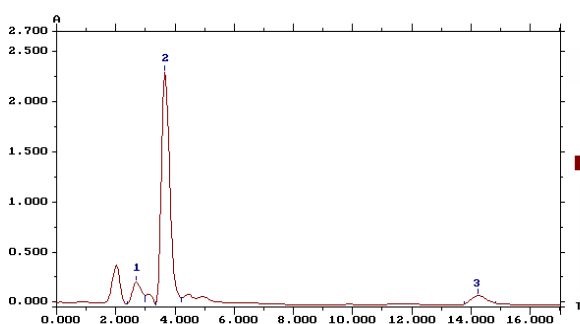


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из травы зверобоя пятнистого (подвижная фаза: ацетонитрил – вода (25 : 75) с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты)

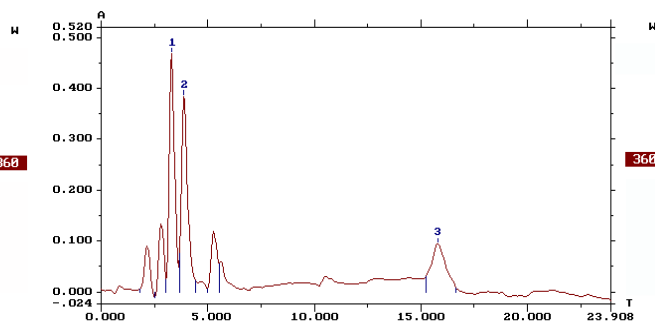


Рис. 2. Хроматограмма извлечения из травы зверобоя продырявленного (подвижная фаза: ацетонитрил – вода 25 : 75 с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты)

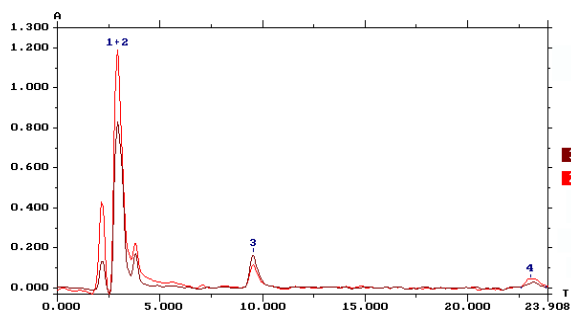


Рис. 3. Хроматограмма извлечения из травы зверобоя продырявленного (подвижная фаза: ацетонитрил – вода (30 : 70) с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты)

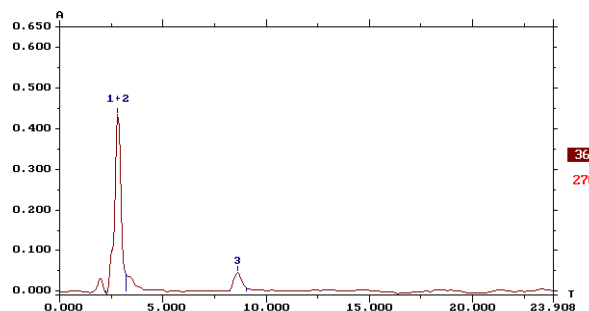


Рис. 4. Хроматограмма извлечения из травы зверобоя пятнистого (подвижная фаза: ацетонитрил – вода (30 : 70) с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты)

Таблица 1. Время удерживания пиков веществ травы зверобоя продырявленного

Вещество	№ пика на хроматограмме	Соотношение ацетона и воды (подвижная фаза)	Время удерживания на хроматограмме извлечения	Время удерживания РСО
Рутин	1	25 : 75	2,922	3,121
Гиперозид	2	30 : 70	2,819	2,716
		25 : 75	3,878	3,994
Кверцетин	3	30 : 70	2,819	3,016
		25 : 75	15,805	14,237
Бисапигенин	4	30 : 70	9,563	9,905
		25 : 75	–	–
		30 : 70	23,150	22,357

Таблица 2. Время удерживания пиков веществ травы зверобоя пятнистого

Вещество	№ пика на хроматограмме	Соотношение ацетона и воды (подвижная фаза)	Время удерживания на хроматограмме извлечения	Время удерживания РСО
Рутин	1	25 : 75	3,12	3,121
Гиперозид	2	30 : 70	2,819	2,716
		25 : 75	3,919	3,994
Кверцетин	3	30 : 70	2,819	3,016
		25 : 75	14,395	14,237
Бисапигенин	–	30 : 70	8,607	9,905
		–	–	–

С целью количественного определения содержания отдельных флавоноидов разработана методика ВЭЖХ-анализа.

Методика количественного определения содержания флавоноидов в траве зверобоя пятнистого и зверобоя продырявленного. Около 1 г (точная навеска) воздушно-сухого образца измельченного сырья с размером частиц, проходящих через сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещали в колбу с притертой крышкой емкостью 100 мл, добавляли 40 мл 70% этилового спирта. Колбу взвешивали на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г и присоединяли к обратному холодильнику. Экстракцию осуществляли при нагревании на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Извлечение охлаждали, доводили на тарирных весах до первоначальной массы 70% этиловым спиртом и фильтровали через бумажный фильтр с красной полосой.

5 мкл полученного извлечения вводили в хроматограф «Миличром-5» и хроматографировали со скоростью потока 0,1 мл/мин. Детекцию анализируемых веществ проводили при аналитической длине волны λ_{\max} 360 нм. Анализ осуществляли в трех повторностях. Параллельно осуществляли анализ растворов РСО рутина, кверцетина, гиперозида, бисапигенина при длине волны 360 нм.

Содержание флавоноидов в процентах (X) в траве зверобоя пятнистого в пересчете на абсолютно сухое сырье и соответствующий стандарт вычисляли по формуле:

$$X = \frac{H \times m_{PCO} \times V_K \times V_{II} \times 100 \times 100}{H_{PCO} \times m \times V_{II} \times V_K \times (100 - W)},$$

где H – значение высоты пика определяемого флавоноида на хроматограмме испытуемого раствора; H_{PCO} – значение высоты пика на хроматограмме раствора соответствующего РСО; V_K – объем разведения пробы, мл; V_{II} – объем пробы раствора, вводимого в колонку, мкл; m – масса сырья, г; m_{PCO} – масса РСО, г.

Установлено, что содержание доминирующего флавоноида – гиперозида в траве зверобоя пятнистого составляет 6,50%, в траве зверобоя продырявленного – 2,50%. Рутин присутствует в следовых количествах в траве зверобоя пятнистого, тогда как в зверобое продырявленном его содержание достигает 1,30%. Содержание кверцетина в обоих видах невысокое и составляет для зверобоя продырявленного – 0,40%, для зверобоя пятнистого – 0,23%. Бисапигенин не выявлен в образце травы зверобоя пятнистого, тогда как в траве зверобоя продырявленного его содержание составляет 1,05%.

Выводы

1. Проведено сравнительное фитохимическое исследование фармакопейных видов зверобоя с использованием метода ВЭЖХ. Установлено наличие и определено содержание трех фармакологически активных флавоноидов (гиперозида, рутина и кверцетина) в траве зверобоя пятнистого и четырех действующих веществ флавоноидной природы (гиперозид, рутин, бисапигенин и кверцетин) в зверобое продырявленном.

2. Гиперозид является доминирующим флавоноидом травы зверобоя пятнистого (6,50%), а бисапигенин характерен лишь для зверобоя продырявленного.

3. Показана перспективность использования метода ВЭЖХ в анализе сырья и препаратов фармакопейных видов зверобоя.

Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств. М., 2008. Т. 1. 1398 с.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. Самара, 2007. 1239 с.
3. Зими́на Л.Н. Сравнительное химико-фармацевтическое исследование сырья и препаратов зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого // Сборник научных трудов «II Российский фитотерапевтический съезд». М., 2010. С. 132–135.

Поступило в редакцию 4 июля 2011 г.

Zimina L.N., Kurkin V.A.*, Ryzhov V.M. THE COMPARATIVE STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION OF HERBS OF PHARMACOPEIAL SPECIES OF *HYPERICUM* L. WITH THE USING OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Samara State Medical University, st. Chapaevskaia, 89, Samara, (Russia), e-mail: vakur@samaramail.ru

The comparative phytochemical study with the using of high performance liquid chromatography of the herbs of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum maculatum* Grantz. was carried out. There were observed the differences in the studied species. It was established that predominant flavonoid of *Hypericum maculatum* Grantz. is hyperoside, which has antidepressive activity. It was shown that content of hyperoside in *Hypericum maculatum* Grantz. herbs is almost three times higher than in *Hypericum perforatum* L. (respectively 6,50% and 2,50%). It was determined, that the presence of bisapigenin is characteristic only for *Hypericum perforatum* L.

Keywords: *Hypericum maculatum* Grantz., *Hypericum perforatum* L., herbs, antidepressive activity, flavonoids, hyperoside, rutin, standardization, HPLC.

References

1. Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv. [State register of medicines]. Moscow, 2008, vol. 1, 1398 p. (in Russ.).
2. Kurkin V.A. *Farmakognozia*. [Pharmacognosy]. Samara, 2007, 1239 p. (in Russ.).
3. Zimina L.N. *II Rossiiskii fitoterapevticheskii s"ezd: sbornik nauchnykh trudov*. [II Congress of Russian phytotherapeutic: collection of scientific papers]. Moscow, 2010, pp. 132–135. (in Russ.).

Received July 4, 2011

* Corresponding author.