

УДК 615.32:547.9+543.544

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЙКИ

© В.А. Куркин*, А.С. Акушская

Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская, 89,
Самара, 443099 (Россия), e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

Разработаны методики качественного анализа и количественного определения сапонинов в настойке женьшеня (*Panax ginseng* С.А.Мейер) методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии при аналитической длине волны 526 нм в пересчете на гинзенозид Rg1.

Ключевые слова: женьшень настоящий, *Panax ginseng* С.А.Мейер, настойка, сапонины, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, стандартизация.

Введение

Воздушно-сухие корни женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С.А.Мейер) используются в Российской Федерации в качестве общетонизирующего, стимулирующего ЦНС средства, обладающего также адаптогенными и иммуностимулирующими свойствами [1–4]. На фармацевтическом рынке РФ доминирующими являются дорогостоящие препараты женьшеня зарубежного производства (Гинсана, Доппельгерц женьшень, Гербион женьшень, Теравит антистресс, Геримакс женьшень) и БАДы (Геримакс энерджи, Витамакс). Отечественные препараты представлены лишь настойкой женьшеня, производителями которой являются фармацевтические фабрики (Тверская, Ивановская, Тульская), ЗАО «ВИФИТЕХ», ООО «НПП Камелия» и др. [1, 5, 6].

Согласно ГФ СССР XI издания [6], контроль качества сырья женьшеня осуществляют по пробирочным реакциям и методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (раздел «Качественные реакции»), при этом условия хроматографирования не позволяют достичь четкого разделения действующих веществ – сапонинов. В качестве количественных показателей в данной фармакопейной статье предлагается определение влажности, золы и экстрактивных веществ, что не может служить надежными, объективными и достоверными показателями качества.

В Европейской фармакопее предусмотрено определение суммы гинзенозидов Rb₁ и Rg₁ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Фармакопеей США предложено определять содержание гинзенозидов Rb₁ и Rg₁ отдельно друг от друга также методом ВЭЖХ [7, 8].

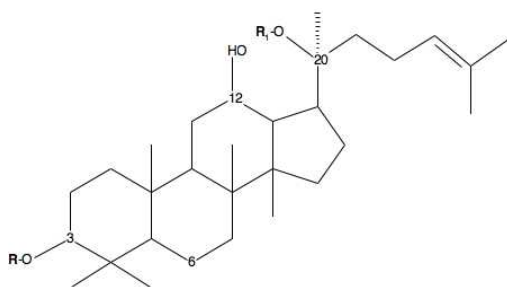
На наш взгляд, применение метода ВЭЖХ в анализе сырья и препаратов женьшеня не оправдано, так как компонентный состав действующих веществ (гинзенозидов) может варьировать до 11, и каждый из них вносит вклад в проявление фармакологического эффекта. Кроме того, данные методики предусматривают наличие двух стандартных образцов, что значительно увеличивает стоимость анализов.

В РФ единая нормативная документация на лекарственный препарат «Женьшеня настойка» отсутствует. Анализ отечественных и зарубежных литературных данных показывает, что в качестве системы растворителей для ТСХ-анализа сырья и настойки используются смеси хлороформ – метанол – вода (61 : 32 : 7), *n*-бутанол – этанол – 25% аммиак (10 : 4 : 4), хлороформ – метанол – вода (13 : 7 : 2),

Куркин Владимир Александрович – заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, доктор фармацевтических наук, профессор, тел.: (846) 260-33-59, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru
Акушская Алина Сергеевна – клинический интерн, тел.: (846) 260-33-59, e-mail: akushskaya.as@gmail.com

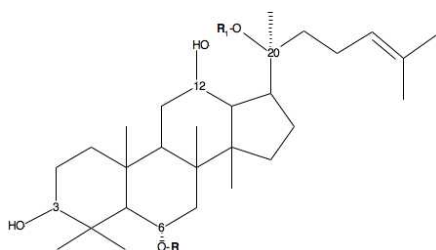
* Автор, с которым следует вести переписку.

n-бутанол – вода – этилацетат (4 : 2 : 1), хлороформ – метанол – вода (70 : 30 : 4). В качестве проявляющего реагента используются 20% спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты, 10% раствор серной кислоты, анисовый альдегид, ванилин-фосфорный реактив [9–13].



Сапонины	R	R ₁
20S-прото-панаксадиол	H	H
Гинзенозид a₁	β -D-Glc-1→2- β -Glc	Xyl-1→4-Ar(pyr)1→6- β -D-Glc
Гинзенозид a₂	β -D-Glc-1→2- β -D-Glc	Xyl-1→4-Ar(fur)1→6- β -Glc
Гинзенозид Rb₁	β -D-Glc-1→2- β -D-Glc	β -D-Glc-1→6- β -Glc
Гинзенозид Rb₂	β -D-Glc-1→2- β -D-Glc	α -L-Ar-1→6- β -Glc
Гинзенозид Rb₃	β -D-Glc-1→2- β -D-Glc	Xyl-1→6- β -Glc
Гинзенозид Rb_c	β -D-Glc-1→2- β -D-Glc	α -L-Ar(fur)-1→6- β -Glc
Гинзенозид Rb_d	β -D-Glc-1→2- β -D-Glc	β -Glc

Производные 20S-протопанаксадиола



Сапонины	R	R ₁
20S-протопанаксатриола	H	H
Гинзенозид Re	α -L-Rha-1→2- β -D-Glc	β -D-Glc
Гинзенозид Rf	β -D-Glc-1→2- β -Glc	H
Гинзенозид Rg₁	β -D-Glc	β -D-Glc
Гинзенозид Rg₂	α -L-Rha-1→2- β -D-Glc	H

Производные 20S-протопанаксатриола

Сапонины (гинзенозиды, панаксозиды) корней женьшеня настоящего

Множество подходов к анализу сырья и настойки нуждаются в критическом пересмотре в плане выбора методов стандартизации настойки женьшеня. В связи с этим целью настоящего исследования является разработка методик качественного и количественного анализа настойки женьшеня, которые могут быть рекомендованы для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XII издания.

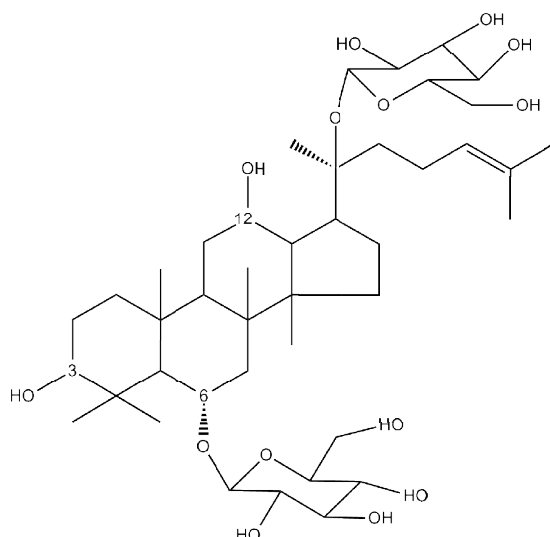
Экспериментальная часть

Объектами исследования служили лекарственные препараты «Женьшеня настойка» (производители ООО «Камелия НПП», ОАО «Тверская фармфабрика» и ОАО «Ивановская фармфабрика») и «Гинсана» (эликсир, Фарматон С.А., Швейцария).

В исследовании использовали методы ТСХ, адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии и спектроскопии в УФ- и видимой области спектра. В методе ТСХ разделение проводили на пластинках «Silufol UV 254» и «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Спектры регистрировали с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190–700 нм.

На предварительном этапе было проведено исследование по выделению веществ сапониновой природы из настойки корней женьшеня настоящего методом препаративной колоночной хроматографии на силикагеле L 40/100 и рехроматографии целевых фракций на полиамиде («Woelm»). Получено вещество, которое по физико-химическим константам, данным УФ-, ЯМР- и масс-спектрам охарактеризовано как гинзенозид Rg₁ (6,20-бис-(β -D-глюкопиранозил)-(3 β ,6 α ,12 β ,20S)-3,6,12,20-тетрагидроксидаммар-24-ен).

С целью определения оптимальной хроматографической системы для разделения сапонинов женьшеня методом ТСХ были апробированы несколько систем растворителей: хлороформ – метанол – вода в соотношениях 70 : 30 : 4 (в соответствии с Немецкой Фармакопеей), 61 : 32 : 7 (в соответствии с ГФ СССР XI издания), 13 : 7 : 2 (в соответствии с Фармакопеей США), 26 : 14 : 3 (универсальная гликозидная система растворителей) и хлороформ – этанол – вода в соотношении 26 : 16 : 3. Детекцию веществ осуществляли в видимой области спектра и в УФ-свете (254 и 366 нм). После опрыскивания хроматограммы 20% спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК) и нагревания ее на плитке 3 мин при 100–105 °С на хроматограмме извлечения из корней женьшеня и настойки обнаруживаются пятна красно-фиолетового цвета с диапазоном R_f от 0,1 до 0,45 (гликозиды панаксозидов) и пятно бурого цвета с R_f 0,8 (агликон) (рис. 1).



Химическая структура выделенного вещества – гинзенозида Rg₁

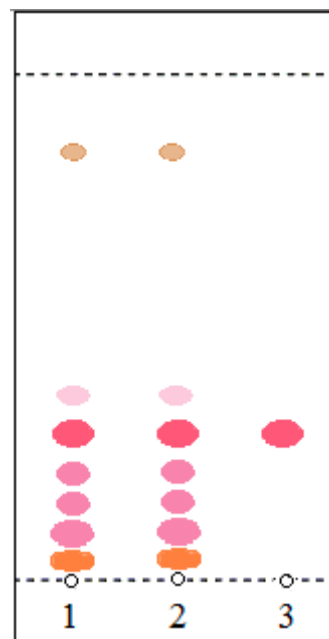


Рис. 1. ТСХ-анализ: система хлороформ – метанол – вода (26 : 14 : 3), пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Обозначения: 1 – извлечение из корней женьшеня на 70% этиловом спирте; 2 – настойка женьшеня; 3 – рабочий стандартный образец (PCO) гинзенозида Rg₁

В результате проведенных исследований в качестве оптимальных для хроматографического разделения сапонинов при анализе настойки нами рекомендованы пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и система растворителей «хлороформ – метанол – вода» (26 : 14 : 3). В соответствии с этим разработана методика качественного анализа сапонинов в настойке женьшеня.

Методика качественного анализа сапонинов в настойке женьшеня. На линию старта пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» наносили микропипеткой 0,02 мл извлечения и 0,05 мл раствора А рабочего стандартного образца (PCO) гинзенозида Rg₁ в виде пятен диаметром 5 мм. Пластинку с нанесенной пробой помещают в вертикальную камеру, которую предварительно насыщают не менее 24 ч смесью растворителей: хлороформ – метанол – вода (26 : 14 : 3), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей проходит около 9 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин. Хроматограмму опрыскивают раствором фосфорновольфрамовой кислоты и нагревают на плитке 3 мин при 100–105 °С. На хроматограмме обнаруживается не менее 6 пурпурно-красных пятен с R_f от 0,1 до 0,45; при этом доминирующим является пятно на уровне пятна PCO гинзенозида Rg₁ с величиной R_f около 0,3. Допускается наличие других пятен.

Примечание 1: подготовка пластинок. Пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89) разрезают поперек линий накатки соответственно на две части размером 10×5 см и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 110 °С в течение 1 ч.

Примечание 2: приготовление раствора А PCO гинзенозида Rg₁ – см. примечание 1 в «Методике количественного определения сапонинов в настойке женьшеня».

С целью разработки методики количественного определения суммы сапонинов нами проведено изучение электронных спектров. Исследование показало, что кривая поглощения настойки (рис. 2) имеет лишь один максимум (при длине волны 268±2 нм). Спиртовой раствор гинзенозида Rg₁ не имеет максимумов поглощения ни в УФ-, ни в видимой области спектра, поэтому для его идентификации предложено проводить реакцию с 70% раствором серной кислоты (максимумы поглощения при длинах волн 280±2, 400±2 и 526±2 нм). Аналогичную реакцию необходимо проводить с настойкой женьшеня (максимумы поглощения при длинах волн 320±2, 390±2 и 526±2 нм), при этом содержащуюся сумму сапонинов предварительно очищать на полиамиде от сопутствующих веществ, также дающих положительную реакцию с серной кислотой (рис. 3).

Таким образом, длинноволновый максимум 526 нм можно принять за аналитическую длину волны, а стандартным образцом может служить сапонин – гинзенозида Rg_1 . В случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) – 25.

Электронный спектр поглощения настойки до (рис. 2) и после (рис. 3) очистки ее на полиамиде может являться качественной характеристикой препарата. Кроме того, данные показателя поглощения комплекса очищенной суммы сапонинов настойки с серной кислотой при 526 нм возможно использовать для количественного определения суммы действующих веществ.

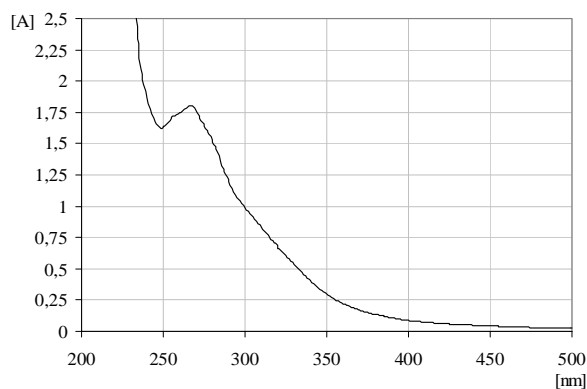


Рис. 2. Электронный спектр раствора настойки из корней женьшеня

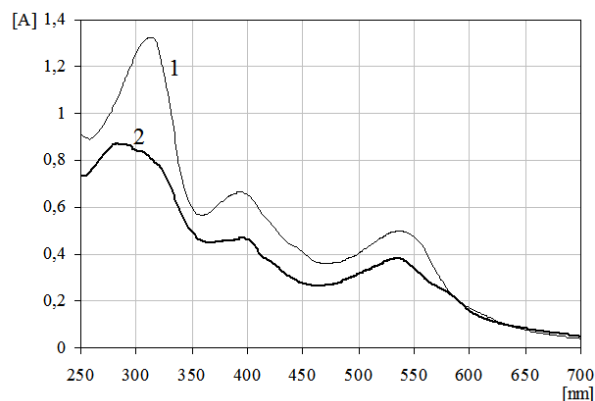


Рис. 3. Электронные спектры окрашенного продукта взаимодействия водно-спиртового извлечения из корня женьшеня, очищенного на полиамиде, с 70% серной кислотой (1) и продукта реакции гинзенозида Rb_1 с 70% серной кислотой (2)

Методика количественного определения суммы сапонинов в настойке женьшеня. Испытуемый раствор А готовят следующим образом: 1 мл настойки упаривают на водяной бане досуха в фарфоровой чашке. После охлаждения сухой остаток растворяют в 2–3 мл воды, количественно переносят на слой полиамида высотой 1–1,5 см, сформированный на стеклянном фильтре, и элюируют 10–15 мл воды. Водный элюат отбрасывают. Затем элюируют 95% спиртом в мерную колбу вместимостью 10 мл до метки и перемешивают (раствор А).

1 мл испытуемого раствора А вносят в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл раствора 70% серной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 526 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 95% этиловый спирт.

Примечание 1: приготовление раствора РСО гинзенозида Rg_1 . Около 0,03 г (точная навеска) гинзенозида Rg_1 помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 5 мл 70% серной кислоты и нагревают в течение 10 мин на кипящей водяной бане (раствор Б). После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 526 нм. Раствором сравнения служит 95% этиловый спирт.

Примечание 2: приготовление раствора 70% серной кислоты. К 45 мл воды осторожно, при перемешивании, добавляют 60 мл серной кислоты концентрированной (ГФ XII, с. 368).

Содержание суммы сапонинов (X) в пересчете на гинзенозид Rg_1 в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 10 \times 6 \times 1 \times 100}{D_0 \times 1 \times 1 \times 25 \times 6},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность РСО гинзенозида Rg_1 ; m_0 – масса РСО гинзенозида Rg_1 .

При отсутствии стандартного образца гинзенозида R_{g_1} целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 25:

$$X = \frac{D \times 10 \times 6}{1 \times 1 \times 25},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 25 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) продукта взаимодействия гинзенозида R_{g_1} с раствором серной кислоты при 526 нм.

По разработанной нами методике определено содержание суммы действующих веществ в некоторых препаратах (табл. 2).

Таблица 2. Количественное определение суммы сапонинов в препаратах женьшеня

Название лекарственного препарата	Производитель	Содержание суммы сапонинов в пересчете на гинзенозид R_{g_1} , %
Настойка женьшеня	ООО «Камелия НПП», РФ	0,50 ± 0,08
Настойка женьшеня	ОАО «Гверская фармфабрика», РФ	0,61 ± 0,06
Настойка женьшеня	ОАО «Ивановская фармфабрика», РФ	0,57 ± 0,05
Гинсана (эликсир)	Фарматон С.А., Швейцария	0,42 ± 0,08

Выводы

1. Из корней женьшеня настоящего выделено индивидуальное вещество группы сапонинов, идентифицированное на основании данных УФ- и ЯМР-спектров как гинзенозид R_{g_1} .

2. Для качественного анализа настойки женьшеня предложен метод тонкослойной хроматографии в системе «хлороформ – метанол – вода» (26 : 14 : 3) и спектроскопии нативной настойки в УФ области (максимум поглощения при 268±2) и очищенной на полиамиде суммы сапонинов после проведения цветной реакции с 70% серной кислотой (максимумы поглощения при 280±2, 400±2 и 526±2 нм).

3. Разработана методика количественного определения сапонинов в настойке женьшеня методом прямой спектрофотометрии в пересчете на гинзенозид R_{g_1} при аналитической длине волны 526 нм. Содержание суммы сапонинов в образцах препаратов данного растения составляет 0,42–0,61%.

Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. 2011. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов.). 2-е изд., перераб. и доп. Самара, 2007. 1239 с.
3. Куркин В.А. Основы фитотерапии: учеб. пособие для студентов фармацевтических вузов. Самара, 2009. 963 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. М., 2008. 1206 с.
5. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: справочник. М., 2011. 1728 с.
6. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. М., 1990. 400 с.
7. European Pharmacopoeia. 6-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008. Pp. 738–739.
8. Фармакопея США: USP 29. Национальный формуляр: NF 24: в 2 т. [пер. с англ.]. М., 2009. Т. 2. С. 2226.
9. ФС 42-10675-00. Настойка женьшеня / Фармакопейный государственный комитет. Введ. 19.01.2000. М., 2000. 5 с.
10. Глебоко Л.И., Красовская Н.П., Покушалова Т.В., Ильченко Г.Я., Будина Т.А. Стандартизация качества женьшеня корней и настойки по содержанию суммы гинзенозидов // Химико-фармацевтический журнал. 2004. №4. С. 20–23.
11. Japanese Pharmacopoeia. JP XIV. 2001. Pp. 927–930.
12. German Homeopathic Pharmacopoeia. Stuttgart, 1993. Pp. 303–306.
13. Wagner H., Blads S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin; Heidelberg; New York, 1996. 348 p.

Поступило в редакцию 7 февраля 2012 г.

Kurkin V.A.*, Akushskaya A.S. DEVELOPMENT OF METHODS OF QUALITY CONTROL OF GINSENG TINCTURA

Samara State Medical University, ul. Chapayevskaia, 89, Samara, 443099 (Russia), e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

There were developed the techniques of qualitative and quantitative analysis of ginseng tinctures (*Panax ginseng* C.A. Meyer).

Thin-layer chromatography (in the solvent system chloroform – methanol – water, 26 : 14 : 3; detection in the visible range after reaction with phosphowolframic acid) and UV/Visible spectroscopy of native tincture (maximum of absorption at 268±2 nm) and total saponins, purified on polyamide and reacted with 70% sulphuric acid (maximum of absorption at 280±2 nm, 400±2 nm and 526±2 nm).

The method of quantitative determination of total saponins in tinctura of ginseng by means of direct spectrophotometry (analytical wave-length at 526 nm) was developed. The contents of the total saponins are varied with 0,42% to 0,61% (calculated on ginsenoside R_{g1}).

Keywords: ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer, tincture, saponins, thin-layer chromatography, spectrophotometry, standardization.

References

1. Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv [State register of medicines]. 2011. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>. (in Russ.).
2. Kurkin V.A. *Farmakognosiia: Uchebnik dlia studentov farmatsevticheskikh vuzov (fakul'tetov)*. [Pharmacognosy: A textbook for students of pharmaceutical schools (faculties)]. Samara, 2007, 1239 p. (in Russ.).
3. Kurkin V.A. *Osnovy fitoterapii: Uchebnoe posobie dlia studentov farmatsevticheskikh vuzov*. [Fundamentals of Herbal Medicine: Textbook for students of pharmaceutical universities]. Samara, 2009, 963 p. (in Russ.).
4. Mashkovskii M.D. *Lekarstvennye sredstva: v 2 t.* [Medications: in 2 vol]. Moscow, 2008, 1206 p. (in Russ.).
5. *Spravochnik Vidal'. Lekarstvennye preparaty v Rossii: Spravochnik*. [On the main page. Medications in Russia: A Handbook]. Moscow, 2011, 1728 p. (in Russ.).
6. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. Vyp. 2: Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. 11-e izd.* [State Pharmacopoeia of the USSR, Vol. 2. Common methods of analysis. Herbal drugs. 11th ed.]. Moscow, 1990, 400 p. (in Russ.).
7. European Pharmacopoeia. 6-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008, pp. 738–739.
8. *Farmakopeia SShA: USP 29. Natsional'nyi formuliar: NF 24: v 2 t.* [United States Pharmacopoeia: USP 29. National Formulary: NF 24: in 2 vol.]. Moscow, 2009, vol. 2, p. 2226. (in Russ.).
9. *FS 42-10675-00. Nastoika zhen'shenia / Farmakopeinyi gosudarstvennyi komitet*. [FA 42-10675-00. Ginseng tincture / State Pharmacopoeia Committee.]. Moscow, 2000, 5 p. (in Russ.).
10. Glebko L.I., Krasovskaia N.P., Pokushalova T.V., Il'chenko G.Ia., Budina T.A. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2004, no. 4, pp. 20–23. (in Russ.).
11. Japanese Pharmacopoeia. JP XIV. 2001, pp. 927–930.
12. German Homoeopathic Pharmacopoeia, Stuttgart, 1993, pp. 303–306.
13. Wagner H., Blads S. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin; Heidelberg; New York, 1996, 348 p.

Received February 7, 2012

* Corresponding author.