

UDK 615.322:615.32:615.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ И ФИТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕВЕРНОГО РЕГИОНА ТАДЖИКИСТАНА

Султонов Р.А.¹, Юсуфи С.ДЖ.^{1,2},
Раджабов У.Р.¹, Мингбоев Ш.А.³, Махкамов Х.К.³

¹ГОУ «ТГМУ им. имени Абуали ибни Сино»,

²ГУ «Научно-исследовательский фармацевтический центр» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан»

³НОУ «Институт промышленности и сервиса»

Аннотация

В данной работе нами был определен полифенольный состав и выявлена антиоксидантная активность *Inula macrophylla* в связи с тем. Это её запасы огромны в Таджикистане, это даёт возможность обеспечить сырьём фармацевтическую промышленность. В данное время фитохимия наука о химическом составе растений – является одним из актуальнейших направлений науки в мире, результаты исследований которой находят применение как в теоретической и прикладной химии, так и в медицине, косметологии и сельском хозяйстве. В связи с этим, в задачу нашего исследования входило качественное изучение фитохимического состава девясила с целью его применения в качестве лечебного средства.

Ключевые слова: молекулярная динамика, спиновая метка, лекарственные растения, девясил высокий, перекись водорода, электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), нитроксильный радикал, тонкослойную хроматографию (ТСХ).

Abstract

In this study, we determined the polyphenolic composition and evaluated the antioxidant activity of *Inula macrophylla* due to its significant natural abundance in Tajikistan, which provides a potential source of raw materials for the pharmaceutical industry. At present, phytochemistry — the science that studies the chemical composition of plants — is one of the most relevant and rapidly developing fields of modern science. The results of phytochemical research are widely applied in theoretical and applied chemistry, medicine, cosmetology, and agriculture.

In this regard, the objective of our study was to conduct a qualitative investigation of the phytochemical composition of *Inula macrophylla* (Elecampane) with the aim of assessing its potential use as a medicinal agent.

Keywords: molecular dynamics, spin label, medicinal plants, *Inula helenium* (elecampane), hydrogen peroxide, electron paramagnetic resonance (EPR), nitroxyl radical, thin-layer chromatography (TLC).

Annotatsiya

Ushbu tadqiqotda biz *Inula macrophylla* o'simligining polifenol tarkibini aniqladik va uning antioksidant faolligini baholadik. Mazkur o'simlikning Tojikistonda katta tabiiy zaxiralari mavjud bo'lib, bu farmatsevtika sanoatini xomashyo bilan ta'minlash imkonini beradi. Hozirgi vaqtda o'simliklarning kimyoviy tarkibini o'rganadigan fan — fitokimyo — dunyoda eng dolzarb va tez rivojlanayotgan ilmiy yo'nalishlardan biri hisoblanadi. Fitokimyoviy tadqiqotlar natijalari nazariy va amaliy kimyo, tibbiyot, kosmetologiya hamda qishloq xo'jaligida keng qo'llanilmoqda.

Shu munosabat bilan, bizning tadqiqotimizning maqsadi — *Inula macrophylla* (devyasil) o'simligining fitokimyoviy tarkibini sifat jihatdan o'rganish va uni davolovchi vosita sifatida qo'llash imkoniyatini aniqlashdan iborat edi.

Kalit so'zlar: molekulyar dinamika, spin belgisi, dorivor o'simliklar, devyasil, vodorod peroksidi, elektron paramagnit rezonansi (EPR), nitroksil radikali, yupqa qatlamli xromatografiya (TLC).

Введение. Анализ литературы и собственные рассуждения показало, что в качестве действующих веществ травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* — фенольные соединения, и в частности, флавоноиды. Результаты изучения БАС целевого низкомолекулярного фрагмента метаболома подтверждают их наличие в исследуемом сырье. При разработке жидкого экстракта из травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* проводилась оценка содержания всей суммы фенольных соединений для анализа эффективности головной стадии технологического процесса. При выборе наиболее достоверных качественных реакций для определения подлинности травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* были приготовлены несколько вариантов извлечений из сырья — с помощью воды (водное извлечение) и разных концентраций водно-спиртовых смесей.

Объект и методы. Травы *inula macrophylla* и *inula rhizocephala* Ferulla. Физико-химические, биологические и фармакогностические методы исследования.

Результаты и обсуждения. Качественные реакции *I. Macrophylla* и *I.*

Rhizocephala. С полученными извлечениями проводили качественные реакции для подтверждения данных литературы о содержании целевых групп БАС в исследуемом сырье (флавоноидов, дубильных веществ, сапонинов и алкалоидов). Результаты таких испытаний представлены в таблицах 1 и 2.

С применением обще алкалоидных реактивов проведены качественные реакции на содержание в сырье *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* алкалоидов, которые их результаты приведены в таблице 2. .

Таблица 2. Результаты определения наличия алкалоидов в различных извлечениях из сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

Таблица 1. Результаты определения групп БАС с помощью качественных реакций в различных извлечениях из сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

Вид реакции	Результат реакции	Экстрагент			
		Вода	40%спирт	70%спирт	90%спирт
Флавоноиды					
Цианидиновая проба по Брианту	Разделение на 2 фазы. Водный слой – более интенсивное окрашивание	++	++	+++	+++
		Преобладание гликозидов над агликонами			
С раствором хлорида железа (III)	Черно-зеленое окрашивание	+	+	++	++
С спиртовым раствором щелочи 10%	Желтое окрашивание	++	++	++	++
Дубильные вещества					
С раствором белка	Проявление мути	+++	++	++	+
С железомониевыми квасцами	Черно-зеленое окрашивание	+++	++	++	+
Сапонины					
Пенообразование	Образование обильной и устойчивой пены	++	+++	+++	+++
Химическая группа сапонинов (пробирки с растворами HCl и NaOH)	Образование пены	Стойкая пена в обеих пробирках Тритерпеновые сапонины			

Экстрагент	Название обще алкалоидного реактива / результат					
	Осадочные реактивы				Цветные реактивы	
	Вагнера-Бушард	Шейблер	Драгендорфа	Раствор танина	H ₂ SO ₄ конц	Натрия нитропруссид
	Бурый цвет	Желтоватый осадок	Оранжево-бурый осадок	Белый осадок	Фиолетовое при нагревании	Красновато-коричневый осадок
Вода	++	+	++	-	+	++

Этанол 40%	++	++	++	-	++	++
Этанол 70%	+++	++	++	-	+++	++
Этанол 90%	+++	++	++	-	++	++

Примечание: Количество «+» свидетельствует об интенсивности окрашивания, осадка и величине столбца пены.

Числовые показатели травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

При получении экстракта используется измельченное сырье, фракционный состав которого приведен в таблице 3.

Таблица 3. Фракционный состав частиц измельченной травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

Частицы сырья, оставшиеся на сите с отверстиями размером	Содержание фракции, %
3 мм	0,28±0,002
2 мм	41,65±0,42
1 мм	32,23±0,82
0,5 мм	15,68±0,06
0,1 мм	8,32±0,08
Частиц, прошедших сквозь сито с отверстиями размером 0,1 мм	1,84±0,04

На основании проведенных исследований (таблица 3) показано, что в измельченном сырье *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* имеется 90% частицы размером крупнее 2 мм, но не менее 0,5мм. Фракция измельченного сырья из мелких и пылевидных частиц находится на уровне 10%. Полученные результаты установления некоторых содержания сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* представлены

в виде таблицы (табл.4) Результаты определения некоторых числовых показателей сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* приведены в таблице 4. Как видно из таблицы 4, влажность травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* не превышала 6%, что соответствует уровню значений, не более 14%, для высушенного 83 официального сырья морфологической группы. Содержание золы общей в траве около 10 %, а золы, не растворимой в 10 % растворе HCl до 1%.

Таблица 4. Некоторые числовые показатели травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

Числовой показатель	Содержание, %
Влажность	4,60±0,3
Зола общая	11,34±0,4
Зола, нерастворимая в растворе HCl 10 %,	0,745±0,02

результаты эксперимента относительно наличие в сырье тяжелых металлов и мышьяка, а также остаточных количеств пестицидов, получены данные, представленные в таблице 5.

Таблица 5. Результаты определения тяжелых металлов, мышьяка и остаточных пестицидов в сырье *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

Определяемые показатели	Трава <i>I. Macrophylla</i> и <i>I. Rhizocephala</i>	Нормы содержания, не более...
Тяжелые металлы, мг/кг		
кадмий	0,048±0,006	1,0
ртуть	0,018±0,004	0,1
свинец	0,725±0,002	6,0
мышьяк	0,002±0,001	0,5
Пестициды, мг/кг		
ДДТ и его метаболиты	менее 0,001	0,10
ГХЦГ (α, β, γ изомеры)	менее 0,001	0,10

Анализ травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* на соответствие стандартам безопасности по показателям «Содержание остаточных пестицидов» и «Содержание тяжелых металлов и мышьяка» показало. Это сырье соответствует требованиям, предъявляемым к чистоте ЛРС в ГФ РФ XIII изд. При изучении особенностей раз-

вития *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* зарубежными учеными [1,2,3, 4] было установлено, что девясил липкий накапливает тяжелые металлы и мышьяк в подземных частях, но такие элементы не проникают в надземные органы растения. На основании этого предложено использовать девясил липкий для очищения почв от загрязнений, вызванных антропогенным воздействием.

Разработка методики определения содержания суммы фенольных соединений

Раствор СО хлорогеновой кислоты.
Точную навеску СО хлорогеновой кислоты

(около 0,01 г) помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят 70% спиртом объем раствора до метки и перемешивают. В мерную колбу на 25 мл помещают 1 мл первого рас-

твора и доводят 70% спиртом объем раствора до метки, перемешивают. Раствор используют свежее приготовленным. Испытуемый раствор. 1,0 г сухой измельченной (не более 3 мм) травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizoccephala* помещают в коническую колбу на 250 мл со шлифом. Прибавляют 50 мл 70 % спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч (после закипания).

раствора измеряют на спектрофотометре в максимуме поглощения при 328 ± 2 нм в толщине поглощающего слоя 10 мм. 70% спирт используют в качестве раствора сравнения.

Измеряют оптическую плотность раствора СО хлорогеновой кислоты.

Содержание в процентах (X) фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 0,5 \cdot 50 \cdot 25 \cdot P \cdot (100 - W)}$$

Смесь охлаждают, фильтруют в мерную колбу на 50 мл через бумажный (синяя лента) складчатый фильтр, доводят объем до метки 70 % спиртом. В мерную колбу на 25 мл помещают 0,5 мл испытуемого раствора, доводят до метки 70% спиртом и перемешивают. Оптическую плотность полученного

где A_0 — оптическая плотность раствора СО раствора хлорогеновой кислоты;

A — оптическая плотность испытуемого раствора;

m_0 — масса хлорогеновой кислоты, г,

m — масса ЛРС, г,

W — потеря в массе при высушивании, %

P — содержание основного вещества в растворе СО хлорогеновой кислоты.

УФ-спектр извлечения из сырья девясила в области 280-350 нм совпадает с таковым хлорогеновой кислоты рису. Для аналитических целей выбран максимум поглощения при 328 нм.

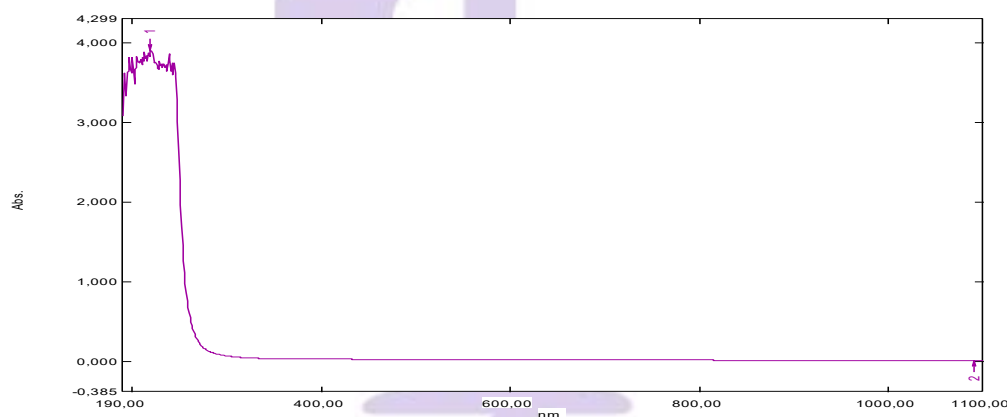


Рис. 1. УФ-спектры извлечения из травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizoccephala* (1), и раствора СО хлорогеновой кислоты (2)

В исследуемых образцах травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizoccephala* содержание фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту от 6,87 до 7,63%. В соответствии ОФС.1.1.0012.15 валидация проведена на предмет специфичности, линей-

ности, правильности и внутри лабораторной прецизионности. Валидационный отчет представлен в приложении 5. Валидация разработанной методики количественного определения фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту показала постоянство результатов анализа

суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту. Поскольку, детализация состава суммы фенольных соединений методом УВЭЖХ-МС выявила наличие значительного количества флавоноидов дающих существенный вклад в проявление противовоспалительной активности, констатируемой в литературных источниках и прогнозируемой *in silico*, была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

При сравнении спектров поглощения комплексов флавоноидов из ЛРС *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* и РСО рутин установлено, что в диапазоне 404- 412 нм

Разработка методики определения содержания суммы флавоноидов в сырье травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

Флавоноиды определяли после реакции комплексообразования с хлоридом алюминия, являющейся селективной для этой группы фенольных соединений и дающей сдвиг спектра в длинноволновую область. Это даёт возможность измерять содержание преимущественно флавоноидов при наличии в извлечении из сырья других сопутствующих групп фенольных веществ.

максимумы поглощения совпадают, это и определило выбор аналитической длины волны 410 нм (рис. 2)

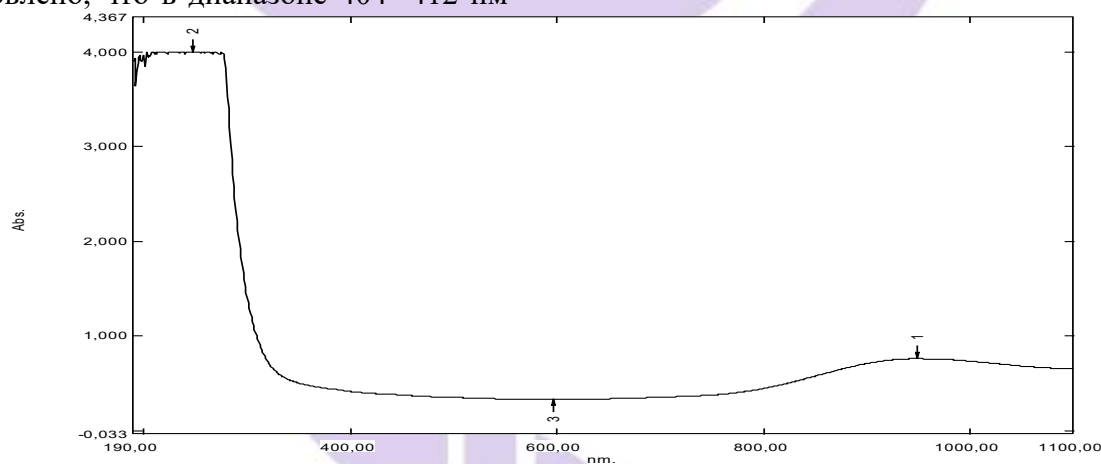


Рис. 2. УФ-спектра растворов комплексов флавоноидов извлечения из травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* (1) и рутин с реактивом $AlCl_3$ (2)

Раствор стандартного образца рутина. Около 0,2 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу 25 мл, доводят 70% спиртом объем раствора до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 1 месяц. В мерную колбу 25 мл помещают 2,0 мл раствора А СО рутина, прибавляют 3 мл раствора алюминия хлорида 3% спиртового, доводят до метки 70% спиртом, перемешивают и выдерживают 40 минут (раствор Б СО рутина). Испытуемый раствор. 1,0 г сухого сырья травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* (размером не более 3 мм), помещают в коническую колбу 250 мл со шлифом, прибавляют

50 мл 70 % спирта, и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч (с момента закипания содержимого). Смесь охлаждают, фильтруют в мерную колбу 50 мл через бумажный фильтр (синяя лента) и доводят объём 70 % спиртом до метки (Испытуемый раствор). 2 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 3 мл раствора алюминия хлорида 3% спиртового, доводят до метки спиртом 70%, перемешивают и выдерживают в течение 40 минут. Оптическую плотность измеряют при длине волны 410 нм в кювете с 88 толщиной поглощаю-

щего слоя 10 мм. Готовят раствор сравнения: 2 мл испытуемого извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной, доводят до метки спиртом 70%, перемешивают и измеряют оптическую плотность.

$$x = \frac{m_0 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot (100 - W)}$$

A_0 — оптическая плотность раствора СО раствора рутина;

A — оптическая плотность раствора испытуемого извлечения;

m_0 — масса СО рутина в г,

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору извлечения.

Содержание суммы флавоноидов в % в пересчете на рутин вычисляют по формуле:

m — масса навески сырья в г,

W — потеря в массе при высушивании сырья,

P — содержание основного вещества в СО рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* от 1,9 до 2,2 %, т.е. среди фенольных соединений доля флавоноидов составляет около 30%. Валидация разработанной методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, в сырье *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* представлена в виде отчета в приложении 6. Методики, предложенные для количественной оценки качества травы *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*, валидированы и позволяют оценить их положительно по всем параметрам. Можно сделать заключение. Это использование разработанных методик для оценки содержания суммы фенольных веществ и флавоноидов даёт результаты, соответствующие требованиям НД на ЛРС и препараты на его основе.

Установление подлинности сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* методами УФ — спектрофотометрии и ТСХ

В УФ-спектре извлечения (70 % спирт из ЛРС *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*) зарегистрировано два максимума поглощения при длинах волн 298 и 329 нм (рис.3.). Это обстоятельство даёт возможность предположить присутствие в сырье 72 фенольных соединений, в частности фенолкарбоновых кислот и флавоноидов. Полученный спектр поглощения может служить дополнительной качественной характеристикой для установления подлинности ЛРС *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*.

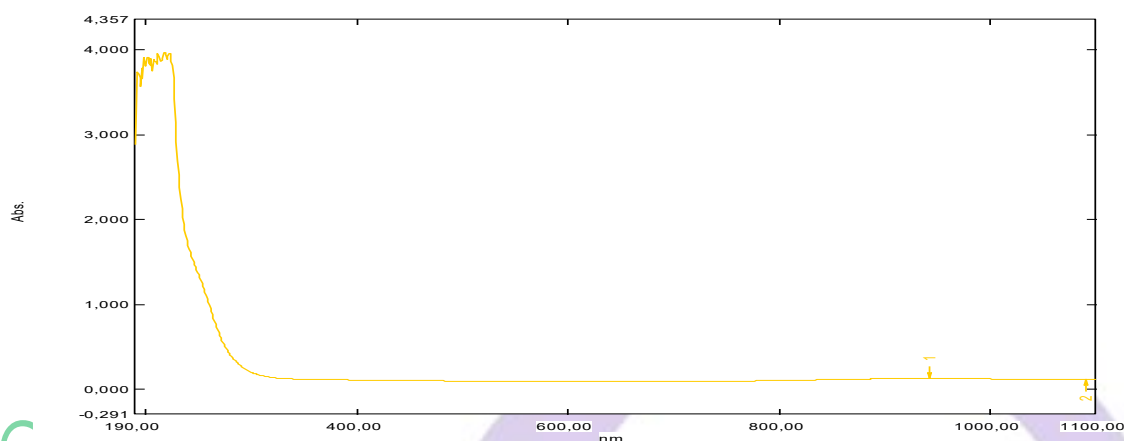


Рис. 3. УФ-спектр извлечения из сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala*

С применением ТСХ проведено изучение состава БАС целевого фрагмента метаболома в сырье *I. viscosa* в системе н-бутанол-ЛУК-вода (4:1:1). Зоны адсорбции веществ детектировали в УФ при 365 нм до и после обработки хроматограмм последовательно растворами дифенилборилоксиэтиламина (1% в метаноле) и ПЭО-400 (5% в метаноле). На хроматограмму наносили испытуемое извлечение из ЛРС, при этом в качестве стандартов использовали таковые растворы СО: кофейной кислоты, рутина, галловой и хлорогеновой кислот в этаноле. Растворы стандартов, на хроматограмме, проявляются в виде зон с R_f около 0,58 для рутина, с R_f около 0,76 галловой кислоты; с R_f около 0,51 хлорогеновой кислоты и с R_f около 0,75 кофейной кислоты. На хроматограмме испытуемого извлечения видны не-

оранжевого цвета соответствуют флавоноидам (R_f около 0,58, 0,68 и 0,77) –. Фиолетовую флуоресценцию на 74 хроматограмме имеет зона адсорбции СО галловой кислоты, но соответствующая ей зона, на хроматограмме испытуемого извлечения окрашена слабо, из-за наложения на зоны других веществ.

Заключение. Это, на основании изучения состава биомассы, экстрактивных веществ, извлекаемых водой и 70% спиртом оба вида сырья сопоставимы, но показатель содержания фенольных соединений около

несколько зон голубого цвета (фенолкарбоновые кислоты), самые интенсивные из которых имеют R_f около 0,51 и 0,75. Это идентично хлорогеновой и кофейной кислотам соответственно. Зоны коричневатого свечения, сливающиеся с зонами голубого цвета, одна из которых соответствует стандарту рутина, другая близка к зоне стандарта галловой кислоты. Зона красного цвета, хлорофилл, видна ближе к фронту подвижной фазы. После опрыскивания хроматограммы растворами реактивов при дневном свете на ней проявляются три интенсивно окрашенные зоны флавоноидов: с R_f около 0,58 (соответствует рутину) и с R_f около 0,69 и с R_f около 0,78 (два не идентифицированных вещества). На хроматограмме при длине волны 365 нм, зоны адсорбции сине-зеленоватого цвета принадлежат фенолкарбоновым кислотам, а зоны

7% в траве, собранной до цветения, подтверждает целесообразность выбора ее в качестве ЛРС. Также, сравнительное изучение двух возможных видов сырья позволило провести оптимизацию таких значимых факторов для технологии как степень дисперсности частиц сырья, концентрация экстрагента, соотношение сырьё-экстрагент и время экстракции. Изучение извлечения из сырья *I. Macrophylla* и *I. Rhizocephala* методом ТСХ позволило установить присутствие фенольных веществ, преобладающее (судя по площади зон и их

интенсивности окрашивания и флуоресценции) содержание среди которых имеют фе-

нолкарбоновые кислоты, в частности хлорогеновая, кофейная и галловая, а также флавоноиды (рутин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 1: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье МЗ СССР. 11-е издание, доп. *Медицина*. 1989; 400 с.
2. Ходжиматов М. Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. Главная научная редакция Таджикской Советской Энциклопедии. 1989; 368 с.
3. Беляков КВ, Попов ДМ. Определение сесквитерпеновых лактонов в корневище и корнях девясила высокого Фармация. 1999; 2: 3-32.
4. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 1: Общие методы анализа МЗ СССР. 11-е издание, доп. *Медицина*. 1987; 336 с.

C
A
R
J
I
S