

# СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИСТЬЕВ ВАХТЫ

**Н.Э. Коломиец**, докт. фарм. наук, **Т.А. Елманова**  
Сибирский государственный медицинский университет;  
634004, Томск, ул. Московский тракт, 2

**E-mail:** borkol47@mail.ru

Разработана методика определения подлинности листьев вахты трехлистной по содержанию иридоидов методом ТСХ. Для оценки качества листьев вахты трехлистной предложена методика спектрофотометрического определения суммы иридоидов в пересчете на гарпагида ацетат.

**Ключевые слова:** вахта трехлистная, *Menyanthes trifoliata* L., листья, стандартизация, иридоиды, логанин.

**В**ахта трехлистная – *Menyanthes trifoliata* L., многолетнее травяное растение, широко распространенное на территории России. Листья вахты трехлистной – официальное лекарственное растительное средство для возбуждения аппетита, применяемое также как желчегонное. Качество сырья оценивают по разработанной более 25 лет назад фармакопейной статье «Листья вахты трехлистной».

ной» (ФС 19, ГФ XI), которая уже не соответствует современным требованиям [1–3]. Многие разделы данной ФС требуют совершенствования, особенно в части подтверждения подлинности лекарственного растительного сырья (ЛРС), качественного анализа и количественного определения действующих веществ.

Цель данной работы – разработка методик оценки подлинности и качества листьев вахты трехлистной по содержанию основных биологически активных веществ (БАВ).

#### Экспериментальная часть

Объекты исследования – листья вахты, собранные в 2012–2013 гг. на территории Томской и Новосибирской областей, Красноярского края; образцы БАД различных производителей.

В соответствии с действующей ФС подлинность и качество листьев вахты оценивают по содержанию флавоноидов, что, на наш взгляд, недостаточно обосновано как с точки зрения связи химический состав – фармакологическое действие, так и в плане реализации тезиса о необходимости гармонизации отечественной и европейской нормативной базы [1]. Как известно, основное фармакологическое действие вахты связано с содержанием горечей (иридоидов), обнаружение которых лежит в основе определения подлинности сырья методом хроматографии в тонком слое (ТСХ) за рубежом, а определение индекса горечи является одним из показателей качества [4]. С учетом вышеперечисленного горечи (иридоиды) были выбраны нами для оценки подлинности и качества листьев вахты.

При разработке методики качественного обнаружения иридоидов методом ТСХ были подобраны условия хроматографирования, позволяющие достоверно определить их присутствие. При выборе экстрагента, растворителей и хроматографических пластинок учитывали факторы токсичности, доступности, максимальной извлекаемости основной группы БАВ и четкого разделения веществ на хроматограмме. По данным отечественных и зарубежных авторов, качественное обнаружение иридоидов проводят в этанольном, метанольном извлечениях или хлороформно-этанольной смеси. ТСХ проводят на пластинках со слоем силикагеля. Чаще всего используют системы растворителей: этилацетат – муравьиная кислота – вода (7:4:1); хлороформ – метиловый спирт – вода (32:10:1.6; 25:10:1); этилацетат – метиловый спирт – вода (9:2:1); хлороформ – метиловый спирт (9:3) [5–9]. Для сравнения применяли пластины Kieselgel 60 F<sub>254</sub> на алюминиевой подложке, пластины Sorbfil на полимерной и алюминиевой подложках. Для извлечения иридоидов использовали метиловый спирт и этиловый спирт 96%, а в качестве систем раствори-

телей были протестированы: перечисленные выше системы, а также система вода – этиловый спирт – этилацетат (0,4:2,5:17,1).

Сравнение хроматограмм метанольного и этанольного извлечений на пластинах Kieselgel 60 F<sub>254</sub> и Sorbfil показало, что они идентичны. Поэтому с учетом вышеизложенных критериев отбора выбор был сделан в пользу этилового спирта и отечественных пластинок. Согласно сравнительному анализу систем для хроматографирования, практически все системы растворителей, за исключением системы хлороформ – метиловый спирт (9:3), позволяют провести разделение веществ и достоверно обнаружить иридоиды. Но с учетом доступности и токсичности выбор был сделан в пользу системы вода – этиловый спирт – этилацетат. Подобранные условия позволяли обнаружить на хроматограмме 2 зоны адсорбции, которые после обработки пластины ванилин-серным реактивом и прогрева в сушильном шкафу при температуре 100–105°C имели зоны с характерной сероватой и серовато-фиолетовой флуоресценцией.

*Методика.* Около 0,5 г листьев вахты, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл этилового спирта 96% и нагревают на водяной бане при температуре 60°C в течение 5–10 мин. Затем содержимое колбы охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, упаривают при температуре 60°C и растворяют в 2 мл 96% этилового спирта. На линию старта хроматографической пластины «Sorbfil» размером 100×100 мм, предварительно активированной в сушильном шкафу при температуре 100–105°C в течение 1 ч, наносят микропипеткой в виде полосы 30 мкл испытуемого раствора и 15 мкл раствора стандартного образца (СО) логанина. Пластины с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей: вода – этиловый спирт – этилацетат (0,4:2,5:17,1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластины от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают свежеприготовленным ванилин-серным реактивом, прогревают в сушильном шкафу при температуре 100–105°C в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции сероватого или серовато-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции раствора СО логанина с R<sub>f</sub> около 0,43–0,48; допускается наличие дополнительных зон адсорбции.

*Приготовление ванилин-серного реактива:* 3 г ванилина растворяют в 100 мл 96% спирта, добавляют 0,5 мл серной кислоты. Полученный раствор используют свежеприготовленным и хранят 48 ч.

*Раствор СО логанина.* Около 0,01 г (точная навеска) логанина растворяют в небольшом количестве спирта 96% в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают.

Согласно данным литературы, количественно иридоиды определяют в этанольном или метанольном извлечениях фотоколориметрическим, спектрофотометрическими методами и ВЭЖХ. За основу были взяты валидированные методики спектрофотометрического определения суммы иридоидов в траве пустырника, татарника колючего и змееголовника [5–8]. Методика основана на определении оптической плотности продуктов взаимодействия гидроксамовых кислот с хлоридом железа (III) при длине волны 510–515 нм.

*Методика.* Аналитическую пробу листьев вахты измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 0,5 г (точная навеска) сырья помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 40 мл смеси хлороформ – этиловый спирт 95% (5:1), закрывают пробкой и взбалтывают на вибрационном аппарате в течение 45 мин. Полученное извлечение декантируют с сырья и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания сырья на фильтр. К остатку в колбе прибавляют еще 40 мл смеси и взбалтывают на вибрационном аппарате в течение 30 мин. Извлечение фильтруют в ту же мерную колбу, доводят объем раствора до метки и перемешивают. 20 мл полученного извлечения помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл воды и упаривают под вакуумом при температуре 40–50°C до водного остатка. Водный раствор фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки, перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл щелочного раствора гидроксилamina и оставляют на 20 мин. Через 20 мин добавляют 10 мл 1 М раствора кислоты хло-

ристоводородной и 5 мл 1% раствора хлорида железа (III) в 0,1 М хлористоводородной кислоте, перемешивают (раствор В). Оптическую плотность раствора В измеряют на спектрофотометре при длине волны 510–515 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют смесь из 5 мл раствора А, 5 мл воды, 10 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и 5 мл 1% раствора хлорида железа (III) в 0,1 М хлористоводородной кислоте.

Содержание суммы иридоидов в пересчете на гарпагида ацетат и абсолютно сухое сырье (%) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 10 \cdot 25 \cdot 100}{56,03 \cdot m \cdot 20 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где А – оптическая плотность раствора В; m – масса сырья, г; 100 – объем извлечения из сырья, мл; 20 – аликвота извлечения, мл; 10 – объем раствора А, мл; 5 – аликвота раствора А, мл; 25 – объем раствора В, мл; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 56,03 – удельный показатель поглощения СО гарпагида ацетата.

Содержание суммы иридоидов в листьях вахты колебалось от 1,82 до 2,01% (см. таблицу). Результаты статистической обработки показали, что ошибка единичного определения находится в пределах ± 0,08, ошибка методики составляет 4,1%.

### Выводы

1. Разработана методика определения подлинности листьев вахты трехлистной методом ТСХ по присутствию иридоидов.
2. Для стандартизации листьев вахты предложена методика спектрофотометрического определения суммы иридоидов в пересчете на гарпагида ацетат.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Стратегия развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года URL: <http://www.pharma2020.ru/> (дата обращения 09.07.2015).
2. Государственная фармакопея СССР. XI изд., вып. 2. М.: Медицина, 1989; 400.
3. Отраслевой стандарт. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. 91500.05.001-00. М., 2000.
4. European Pharmacopoeia. 7<sup>th</sup> Ed. Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines, 2011; 1298.
5. Жогова А.А., Самылина И.А., Эллер К.И. Изучение иридоидов в листьях вахты трехлистной. Фармация, 2013; 6: 7–20.
6. Попова О.И., Никитина А.С., Маркова О.М. Изучение иридоидов змееголовника молдавского, культивируемого в условиях Ставропольского края. Химико-фармацевтический журнал, 2008; 42 (6): 39–42.
7. Иванова Л.Р., Бутенко Л.И., Лигай Л.В., Сбежнева В.Г. Определение иридоидов в траве татарника колючего (*Onopordum acanthium* L.). Химия растительного сырья, 2010; 4: 131–133.
8. Шаменкова Н.В. Усовершенствование определения иридоидов в траве пустырника. Фармация, 2005; 5: 15–19.
9. Haznagy-Radnai E. Examination of the volatile and non-volatile components of Hungarian *Stachys* species. Ph.D. Thesis. Szeged, 2007; 72 p.

### СОДЕРЖАНИЕ СУММЫ ИРИДОИДОВ В ЛИСТЬЯХ ВАХТЫ И МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДИКИ

| № | Содержание иридоидов, % | Метрологические характеристики |
|---|-------------------------|--------------------------------|
| 1 | 2,01                    | f=6                            |
| 2 | 1,93                    | S=0,07652                      |
| 3 | 2,01                    | S <sub>x</sub> =0,0312         |
| 4 | 1,99                    | ΔX=0,0803                      |
| 5 | 1,89                    | X̄=1,9416                      |
| 6 | 1,82                    | P, %=95,0                      |
|   |                         | t (P, f)= 2,57                 |
|   |                         | E, %=4,13                      |
|   | 1,94±0,08               | ±ΔX=1,9416±0,08                |

Поступила 4 августа 2015 г.

## STANDARDIZATION OF BUCKBEAN (*MENYANTHES TRIFOLIATA*) LEAVES

N.E. Kolomiets, PhD; T.A. Elmanova

*Siberian State Medical University; 2, Moskovsky Road, Tomsk 634004*

### Summary

By taking into account the contribution of iridoids to the pharmacological effects of the raw material, the authors have developed procedures for the qualitative and quantitative determination of iridoids in the buckbean leaves to update the existing pharmacopeial article for buckbean (*Menyanthes trifoliata*) leaves. Procedures have been proposed for the thin-layer chromatographic determination of iridoids to identify the buckbean leaves stored in different areas of Siberia. The chromatogram obtained for the test solution should show a grayish or grayish-violet adsorption area at the level of CO loganin adsorption solution area with  $R_f$  about 0.43–0.48. To assess the quality of buckbean leaves, the authors have proposed a validated procedure for the spectrophotometric determination of the sum of iridoids calculated with reference to garpagide acetate.

**Key words:** buckbean, *Menyanthes trifoliata* L., leaves, standardization, iridoids, loganin.

### REFERENCES

1. The development strategy of the pharmaceutical industry for the period up to 2020 URL: <http://www.pharma2020.ru/> (in Russian).
2. The State Pharmacopoeia of the USSR. XI ed., Vol. 2. Moscow: Medicine, 1989; 400 (in Russian).
3. The Industry Standard. Standards for the quality of medicines. The main provisions. 91500.05.001-00. Moscow, 2000 (in Russian).
4. European Pharmacopoeia. 7<sup>th</sup> ed., vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines, 2011; 1298.
5. Zhogova A.A., Samylina I.A., Eller K.I. The study of iridoids in the leaves of bean. *Farmatsiya*, 2013; 6: 17–20 (in Russian).
6. Popova O.I., Nikitina A.S., Markova O.M. The study of iridoids in zmeegolovnika Moldovan, cultivated in the conditions of Stavropol Territory. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2008; 42 (6): 39–42 (in Russian).
7. Ivanova L.R., Butenko L.I., Ligay L.V., Sbezhneva V.G. Determination of iridoids in the grass prickly thistle (*Onopordum acanthium* L., Genus *Onopordum*). *Chemistry of plant material*, 2010; 4: 131–133 (in Russian).
8. Shamenkova N.V. Improving the definition of iridoids in the grass *Leonurus*. *Farmatsiya*, 2005; 5: 15–19 (in Russian).
9. Haznagy-Radnai E. Examination of the volatile and non-volatile components of Hungarian *Stachys* species. Ph. D. Thesis. Szeged, 2007; 72.