

Разработка методик стандартизации субстанции Розматин из травы змееголовника молдавского

Е.В. Звездина, О.П. Шейченко, А.Е. Бурова

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений,
Российская Федерация, 117216, Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Звездина Екатерина Владимировна – старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации, аспирант Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Тел.: +7 (495) 388-45-45. E-mail: catterina@inbox.ru. ORCID: 0000-0001-5708-3407

Шейченко Ольга Петровна – ведущий научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ВИЛАР. Тел.: +7 (495) 388-45-45. E-mail: vilarnii.sheychenko@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7099-4192

Бурова Алла Евгеньевна – старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ВИЛАР. Тел.: +7 (495) 388-45-45. E-mail: alla.burova@inbox.ru. ORCID: 0000-0001-7161-8025

РЕЗЮМЕ

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) – однолетнее травянистое растение, широко культивируемое в Восточной и Центральной Европе как эфиромасличное, медоносное и пряно-ароматическое. ВИЛАР разработана технология получения из травы змееголовника молдавского сухого очищенного экстракта, получившего условное название «Розматин», содержащего флавоноиды и фенилпропаноиды. Субстанция обладает тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы, а также противовоспалительным эффектом.

Цель исследования – разработка и валидационная оценка методик стандартизации субстанции Розматин.

Материал и методы. Субстанция Розматин, полученная из надземной части произрастающего в ВИЛАР змееголовника молдавского сорта «Нежность», заготовленного в фазу цветения. Методы исследования: тонкослойная хроматография (ТСХ), УФ-спектрофотометрия. Используемое оборудование: пластинки Sorbfil ПТСХ-ПА размером 10×15 (Россия), спектрофотометры: UV-1800 (Shimadzu), Cary 100 Scan (Varian).

Результаты. С использованием цианидиновой пробы (пробы Шинода) подтверждено присутствие в субстанции флавоноидов (розово-красное окрашивание). УФ-спектр Розматина представлен 2 максимумами поглощения при 327 ± 2 и 288 ± 2 нм в диапазоне длин волн 250 до 400 нм. Содержание суммы фенольных соединений в субстанции Розматин в пересчете на розмариновую кислоту, определенное методом прямой спектрофотометрии, в 5 сериях балансовых загрузок находилось в пределах от 60,67 до 88,02%,

Заключение. Разработаны методики качественного и количественного определения фенольных соединений в субстанции Розматин. Методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту отвечает всем критериям валидации.

Ключевые слова: змееголовник молдавский, *Dracocephalum moldavica* L., субстанция Розматин, УФ-спектрофотометрия, фенольные соединения, розмариновая, кофейная кислоты.

Для цитирования: Звездина Е.В., Шейченко О.П., Бурова А.Е. Разработка методик стандартизации субстанции Розматин из травы змееголовника молдавского. Фармация, 2020; 69 (6): 25–30. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-05>

DEVELOPMENT OF A PROCEDURE FOR STANDARDIZATION OF THE ROZMATIN SUBSTANCE FROM MOLDAVIAN DRAGONHEAD (*DRACOCEPHALUM MOLDAVICE*) HERB

E.V. Zvezdina, O.P. Sheichenko, A.E. Burova

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants; 7, Grin St., Build. 1, Moscow 117216, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Zvezdina Ekaterina Vladimirovna – Senior Researcher, Department of Phytochemistry and Standardization, postgraduate student, of All-Russia Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR). Tel.: +7 (495) 388-45-45. E-mail: catterina@inbox.ru. ORCID: 0000-0001-5708-3407

Sheychenko Olga Petrovna – Leading Researcher, Department of Phytochemistry and Standardization of VILAR. Tel.: +7 (495) 388-45-45. E-mail: vilarnii.sheychenko@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7099-4192

Burova Alla Evgen'evna – Senior Researcher, Department of Phytochemistry and Standardization of VILAR. Tel.: +7 (495) 388-45-45. E-mail: alla.burova@inbox.ru. ORCID: 0000-0001-7161-8025

SUMMARY

Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica*) is an annual herbaceous plant that is widely cultivated in Eastern and Central Europe as an essential oil-bearing, melliferous, and spicy-and-aromatic plant. The All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants has developed a technology for obtaining a dry purified Moldavian dragonhead herb extract arbitrarily called Rozmatin that contains flavonoids and phenylpropanoids. The substance has a tonic effect on the cardiovascular and nervous systems, as well as an anti-inflammatory effect.

Objective: to develop a procedure for standardizing the Rozmatin substance and to make its validation assessment.

Material and methods. The Rozmatin substance obtained from the aboveground part of the Moldavian dragonhead (the variety «Tenderness») growing in the All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, which was harvested during the flowering phase. The investigators used the following techniques: thin layer chromatography (TLC), UV spectrophotometry, as well as the equipment: 10×15-cm Sorbfil ПТСХ-ПА plates (Russia) and UV-1800 (Shimadzu) and Cary 100 Scan (Varian) spectrophotometers.

Results. The presence of flavonoids in the substance was confirmed by the cyanidin test (Shinoda's test) (a pink and red color). The UV spectrum of Rozmatin showed two absorption maxima at 327±2 and 288±2 nm in the wavelength range of 250 to 400 nm. The total phenolic compound content in the Rozmatin substance in terms of rosmarinic acid, which was determined using direct spectrophotometry, ranged from 60.67 to 88.02% in 5 series of balanced loads.

Conclusion. Procedures have been developed for the qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in the Rozmatin substance. The procedure for the quantitative determination of the total content phenolic compounds calculated with reference to rosmarinic acid meets all validation criteria.

Key words: Moldavian dragonhead, *Dracocephalum moldavica* L., Rozmatin substance, UV spectrophotometry, phenolic compounds, rosmarinic and caffeic acids.

For reference: Zvezdina E.V., Sheichenko O.P., Burova A.E. Development of a procedure for standardization of the Rozmatin substance from Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavice*) herb. Farmatsiya, 2020; 69 (6): 25–30. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-05>

Введение

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) – однолетнее травянистое растение семейства яснотковых (*Lamiaceae* Lindl.), произрастающее в диком виде на территории Египта (Египет, Китай, Центральная Азия, Монголия и Гималаи) и культивируемое в Восточной и Центральной Европе (Россия, Болгария, Румыния, Молдавия, Украина, Белоруссия) как эфиромасличное, медоносное и пряно-ароматическое растение [1]. В ВИЛАРе выведен новый сорт змееголовника молдавского «Нежность» [2].

Экстракт травы змееголовника молдавского содержит комплекс биологически активных веществ, обуславливающий различные лечебные эффекты. Основными компонентами экстракта являются фенольные соединения: флавоноиды флавоного типа, фенилпропаноиды и т.д. Будучи природными гидрофильными антиоксидантами, фенольные соединения могут поглощать свободные радикалы, разбивать радикальные цепные реакции, снижая окислительный стресс у человека, который является ключевым фактором в онтогенезе хронических заболеваний [3–10].

В ВИЛАРе разработана технология получения из травы змееголовника молдавского сухо очищенного экстракта, условно названного Розматин, содержащего флавоноиды и фенил-

пропаноиды. Данная субстанция обладает активизирующим, тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы, а также достоверным противовоспалительным эффектом, подавляя развитие экссудативной фазы воспаления [11–12].

Цель работы – разработка методик подтверждения подлинности и количественного определения фенольных соединений в многокомпонентной субстанции Розматин для включения в проект фармакопейной статьи.

Материал и методы

Объектом исследования служила субстанция Розматин, полученная из травы змееголовника молдавского сорта «Нежность», заготовленного в фазу цветения в ВИЛАРе. Для подтверждения наличия флавоноидов использовали цианидиновую пробу (пробу Шинода). В экспериментах использованы стандартные образцы (СО) розмариновой (Sigma Aldrich, кат. №536954-5G) и кофейной кислот (Sigma Aldrich, кат. 331-39-5). Подтверждение присутствия фенилпропаноидов в субстанции проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве неподвижной фазы использовали пластинки Sorbfil ПТСХ-ПА размером 10×15 (Россия). Хроматографирование осуществляли восходящим способом в системе растворителей этилацетат–уксусная кислота–вода

(40:5:5). УФ-спектрофотометрия осуществляли на спектрофотометрах UV-1800 (Shimadzu), Cary 100 Scan (Varian).

Результаты и обсуждение

Субстанция Розматин представляет собой аморфный порошок коричневого или красновато-коричневого или зеленовато-коричневого цвета со специфическим запахом, гигроскопичный. Субстанция растворима в спирте этиловом, легко растворима 50% спирте этиловом и мало растворима в воде. При проведении цианидиновой реакции (проба Шинода) наблюдалось розово-красное окрашивание.

Для подтверждения наличия фенилпропаноидов (розмариновая и кофейная кислоты) методом ТСХ были подобраны оптимальные условия методики: в колбу вместимостью 50 мл помещали 0,0250 г субстанции Розматин прибавляли 10 мл спирта этилового 50 % и растворяли при перемешивании. На стартовую линию, отстоящую на 1,5 см от края хроматографической пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-Ф-УФ размером 10×15 см, наносили 20 мкл полученного раствора в виде полосы длиной 2 см; на расстоянии 2 см и в точку наносили 5 мкл 0,1% раствора СО розмариновой кислоты в спирте этиловом 50% и на расстоянии 2 см и в точку 5 мкл 0,1% раствора СО кофейной кислоты. Пластику помещали в вертикальную хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 2 ч смесью растворителей и хроматографировали

восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 12 см от стартовой линии, пластинку вынимали из камеры и оставляли на воздухе под вытяжным шкафом при комнатной температуре до удаления запаха растворителей. Затем пластинку обрабатывали 10% раствором алюминия хлорида в спирте этиловом 96%, прогревали в течение 2–3 мин при температуре 105°C и просматривали в УФ-свете при длине волны 366 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора (рис. 1) обнаруживалась зона адсорбции синевато-голубой флюоресценции с Rf около 0,82, аналогичная зоне адсорбции стандартного образца розмариновой кислоты, и зона адсорбции синевато-голубой флюоресценции с Rf 0,88, аналогичная зоне адсорбции стандартного образца кофейной кислоты. На хроматограмме также присутствовали другие зоны адсорбции: светло-желтой флюоресценции (2) с Rf около 0,51, 0,64 и ярко-желтой флюоресценции с бурыми вкраплениями (3) с Rf около 0,25.

При разработке методики количественного определения суммы фенольных соединений был изучен УФ-спектр Розматина. Согласно полученным данным, в диапазоне длин волн от 250 до 400 нм наблюдались два максимума поглощения при 327 ± 2 нм и 289 ± 2 нм. Аналогичный максимум поглощения при 327 ± 2 нм имеет раствор СО розмариновой кислоты (рис. 2). Полученный результат позволяет проводить количественное определение суммы фенольных соединений в субстанции Розматин в пересчете на розмариновую кислоту.

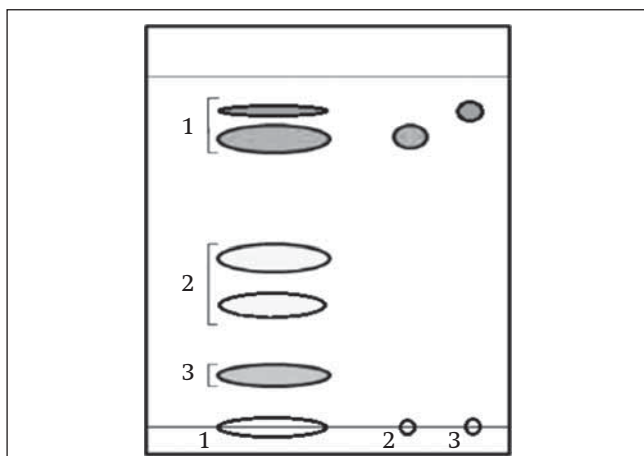


Рис. 1. Схема ТСХ-хроматограммы субстанции Розматин

Примечание: 1 – субстанция Розматин; 2 – СО розмариновой кислоты; 3 – СО кофейной кислоты.

Fig. 1. The TLC scheme for the Rozmatin substance
 Note. 1 – Rozmatin substance; 2 – SS of rosmarinic acid; 3 – SS of caffeic acid.

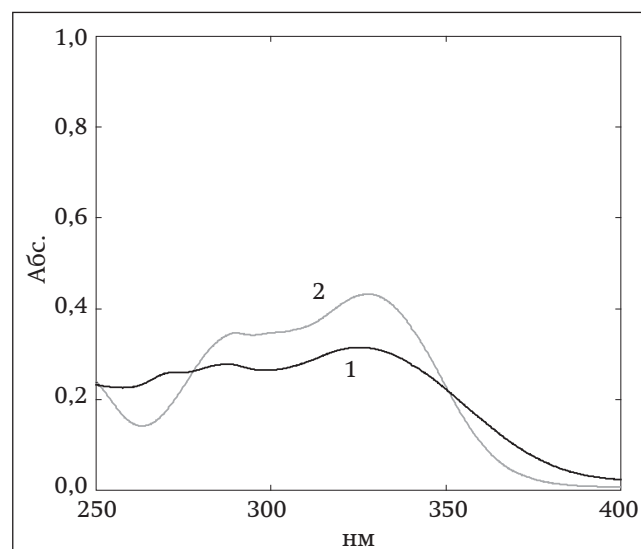


Рис. 2. УФ-спектры субстанции Розматин (1) и СО розмариновой кислоты (2)

Fig. 2. The UV spectra of the Rozmatin substance (1) and SS of rosmarinic acid (2)

В ходе исследования была разработана представленная ниже методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту.

Методика определения. Около 0,0150 г (точная навеска) растертого порошка субстанции Розматин помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта этилового 50%, растворяют при комнатной температуре, доводят до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А и доводят раствор до метки 50% спиртом этиловым (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 327 ± 3 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50%.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО розмариновой кислоты.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту (X%) вычисляют по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot A_0 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где: А – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность СО розмарино-

вой кислоты; а – масса навески субстанции Розматин, г; a_0 – масса навески СО розмариновой кислоты, г; W – потеря в массе при высушивании субстанции Розматин, %.

Приготовление раствора СО розмариновой кислоты. Около 0,01 г (точная навеска) СО розмариновой кислоты (Sigma-Aldrich, кат. номер: 536954-5G), предварительно выдержанной в эксикаторе не менее 48 часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 50 мл спирта этилового 50%, после чего объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл полученного раствора, доводят его объем до метки спиртом этиловым 50% и перемешивают.

Валидацию разработанной методики проводили по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность (сходимость и воспроизводимость).

Специфичность методики характеризовали совпадением максимумов поглощения субстанции Розматин и СО розмариновой кислоты при длине волны 327 ± 2 нм. Определение линейности проводилось на 7 уровнях концентраций СО розмариновой кислоты в диапазоне 2,3–10,5 мгк/мл (рис. 3). По результатам проведенных исследований установлено, что зависимость носит линейный характер, коэффициент корреляции составил 0,999, что близко к единице и соответствует критерию приемлемости (не ниже 0,995).

Контроль правильности методики осуществляли на модельных смесях трех концентраций с содержанием СО розмариновой кислоты 25, 50, 75% к ее исходной концентрации в спиртовом растворе субстанции Розматина (табл. 1). В разработанной методике процент восстановления (выход) находится в пределах 98,3 до 101,5% и имеет среднее значение 100,2 %, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

Для установления сходимости проведено 6 параллельных определений на основании результатов, которых вычислены величина стандартного отклонения ($S=0,377$), относительная вероятная погрешность отдельного измере-

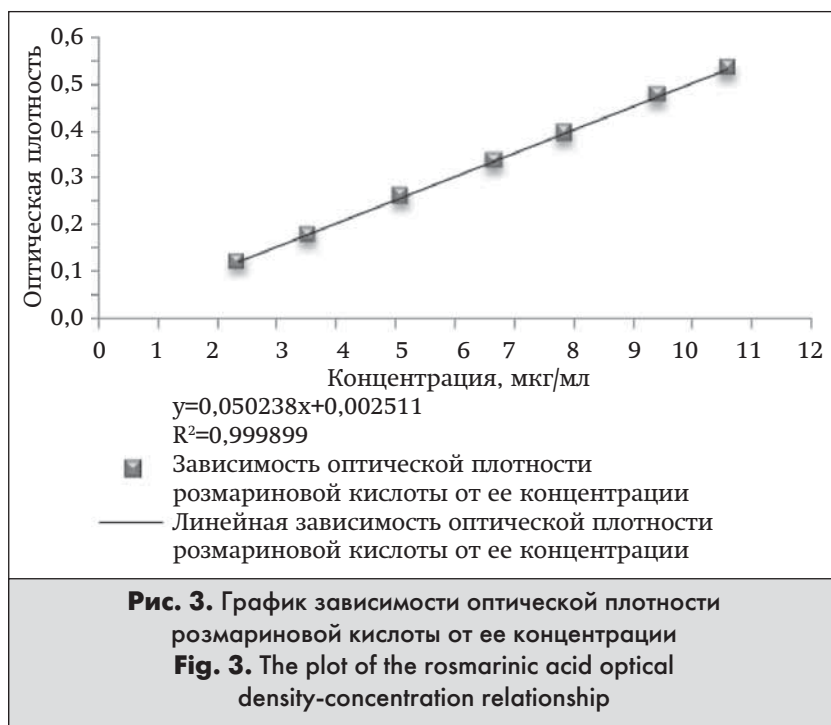


Таблица 1

Результаты испытания контроля правильности (точности) методики

Table 1

Test results of controlling the correctness (accuracy) of the procedure

№ п/п	Найдено, мг	Добавлено СО, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Абсолютная ошибка, мг	Выход, %
1.1	0,1961	0,0480	0,2441	0,2440	0,0001	99,9
2.1	0,1961	0,0960	0,2921	0,2964	-0,0043	101,5
3.1	0,1961	0,1440	0,3401	0,3439	-0,0038	101,1
1.2	0,2064	0,0480	0,2544	0,2578	-0,0034	101,1
2.2	0,2064	0,0960	0,3024	0,3020	0,0004	99,8
3.2	0,2064	0,1440	0,3504	0,3523	-0,0019	100,4
1.3	0,1989	0,0480	0,2469	0,2467	0,0002	99,9
2.3	0,1989	0,0960	0,2949	0,2954	-0,0005	100,2
3.3	0,1989	0,1440	0,3429	0,3374	0,0055	98,3
Среднее значение выхода – 100,2 %						

ния ($\pm 0,528\%$) и коэффициент вариации. Значение коэффициента вариации 0,573% свидетельствует о прецизионности методики по сходимости (критерий приемлемости $\leq 5\%$).

Внутрилабораторную воспроизводимость определяли два аналитика на 6 повторности образца субстанции Розматин, приготовленных независимо друг от друга в течение двух дней. Полученные значения коэффициента вариации не превышали 2%, различия между результатами сотрудников статистически незначимы ($F_{\text{факт.}} < F_{\text{табл.}}$), что позволяет считать внутрилабо-

раторную прецизионность результатов приемлемой.

По разработанной методике определено содержание суммы фенольных соединений в субстанции Розматин в 5 сериях балансированных загрузок лабораторного регламента (табл. 2). На основании полученных данных установлена ориентировочная норма содержания фенольных соединений в субстанции Розматин – $\geq 60,0\%$

Заключение

Для субстанции Розматин предложены методики подтверждения подлинности с помощью качественной реакции и ТСХ со стандартными образцами розмариновой и кофейной кислот. Подобраны оптимальные условия анализа и разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в субстанции Розматин, которая оценена положительно по валидационным параметрам. Полученные результаты показывают, что данная методика может быть включена в проект нормативной документации на субстанцию Розматин.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Таблица 2

Содержание фенольных соединений в субстанции Розматин в балансированных загрузках лабораторного регламента

Table 2

The content of phenolic compounds in the Rozmatin substance in the balance loads of laboratory regulations

Серии загрузок сырья	Содержание фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту, %
1	68,68 \pm 0,36
2	88,02 \pm 0,46
3	60,67 \pm 0,32
4	74,92 \pm 0,39
5	74,66 \pm 0,39

Литература

1. Попова О.И., Никитина А. С. Змееголовник молдавский и иссоп лекарственный: современный взгляд на растения: монография. Волгоград; Издательство ВолГМУ, 2014; 224.
2. Тоцкая С.А., Грязнов М.Ю. Некоторые особенности выращивания нового сорта змееголовника молдавского селекции ФГБНУ ВИЛАР. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018; 9: 43–7.
3. Jiang J., Yuan X., Wang T., Chen H., Zhao H., Yan X., Wang Z., Sun X., Qiusheng Z. Antioxidative and Cardioprotective Effects of Total Flavonoids Extracted from *Dracocephalum moldavica* L. Against Acute Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart. Cardiovascular Toxicology. 2014; 14: 74–82. DOI: 007 / s12012-013-9221-3
4. Zeng Q., Jin H.Z., Qin J.J., Fu J.J., Hu X.J., Lin J.H., Yan L., Chen M., Zhang W.D. Chemical constituents of plants from the genus *Dracocephalum*. Chem. Biodivers. 2010; 7: 1911–29. DOI: 10.1002/cbdv.200900188
5. Martínez-Vázquez M., Estrada-Reyes R., Martínez-Laurrabaquio A., López-Rubalcavac C., Heinze G. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (*Lamiaceae*) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. J. of Ethnopharmacology. 2012; 141: 908–17. DOI:10.1016/j.jep.2012.03.028
6. Yang S., Wang L., Guo X., Lou H., Ren D. A new flavonoid glycoside and other constituents from *Dracocephalum moldavica*. Natural Product Research. 2013; 27 (3): 201–7. DOI: 10.1080/14786419.2012.666746
7. Yang L.N., Xing J.G., He C.H., Wu T. The phenolic compounds from *Dracocephalum moldavica* L. Biochemical Systematics and Ecology. 2014; 54: 19–22. DOI: 10.1016/j.bse.2013.12.009
8. Yang L.N., Xing J.G., He C.H., Yang P.M. Chemical constituents of *Dracocephalum Moldavica* L. and their pharmacological activities. World Clin. Drugs. 2013; 34: 57.
9. Dastmalchi K., Damien Dorman H.J., Muberra K., Hiltunen R. Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. LWT Food Sci Technol. 2007; 40: 239–48. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.09.019
10. Zúñiga M.I.J., Mariles A.J.H., Flores J.L.C., Herrera J.A.M., Sotelo M.G.R., Montes G.I.C., Gómez y Gómez Y. de las M. Antidepressant Like Effects of *Dracocephalum moldavica* L. in Mouse Models of Immobility Tests. Pharmacognosy J. 2019; 11 (5): 976–83. DOI: 10.5530/pj.2019.11.154
11. Zvezdina E.V., Kurmanova E.N., Ferubko E.V. Anti-inflammatory activity of moldavian dragonhead extract under the conditional name «Rosmatin». Sovremennye tendentsii rasvitiya tehnologii zdorovesbereshcheniya: sbornik trudov Sedmoi nauchnoi konferentsii s meshchdunarodnym uchastiem. FGBNU VILAR. M., 2019; 440–4.
12. Panin V.P., Martynchik I.A. Effects of *Dracocephalum moldavica* L. on some indicators of the nervous system of mice on course introduction. Sovremennye tendentsii rasvitiya tehnologii zdorovesbereshcheniya: sbornik trudov Sedmoi nauchnoi konferentsii s meshchdunarodnym uchastiem. FGBNU VILAR. M., 2019; 473–8.

References

1. Popova O.I., Nikitina A. S. Zmeegolovnik moldavskii i issop lekarstvenny: sovremenny vzglyad na rasteniya. Volgograd: Izdatelstvo VolgGMU, 2014; 224.

Поступила 17 июля 2020г.

Received 17 July 2020

Принята к публикации 15 августа 2020 г.

Accepted 15 August 2020