



П.Ю. Шкроботько¹, Д.М. Попов², Н.С. Фурса³

КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ ВАЛЕРИАНЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЯ

¹Запорожский государственный медицинский университет

²НИИ фармации Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова

³Ярославская государственная медицинская академия

Ключові слова: валеріана лікарська, кореневища з коренями, складні ефіри біологічно активних речовин.

Ключевые слова: валериана лекарственная, корневища с корнями, сложные эфиры биологически активных веществ

Key words: Valeriana officinalis, rhizomes with roots, complex ethers of bioactive compounds.

Проведено дослідження по якісному та кількісному визначенню складних ефірів біологічно активних речовин у 29 зразках валеріани лікарської, в результаті якого відзначено, що вони різнилися за вмістом аналізованих речовин, що, можливо, пов'язано з тим, що Valeriana officinalis L.s.l. - складний видовий цикл.

Проведено исследование по качественному и количественному определению сложных эфиров биологически активных веществ в 29 образцах валерианы лекарственной, в результате которого отмечено, что они отличались по содержанию анализируемых веществ, что, возможно, связано с тем, что Valeriana officinalis L.s.l. - сложный видовой цикл.

Research on high-quality and quantitative determination of complex ethers of bioactive compounds is conducted in 29 standards of Valeriana officinalis, which it is marked as a result of, that they differed after maintenance of analyzable compounds, that, it is possibly related to that Valeriana officinalis L.s.l. difficult specific cycle.

По современным представлениям седативный эффект валепотриатов, бициклических монотерпеновых иридоидных эфиров, считающихся основными действующими веществами официального сырья валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.s.l.), усиливается под влиянием сесквитерпеноидных производных, среди которых наиболее активными компонентами являются производные валеренала (*табл. 1*) [1,3,4].

Таблица 1

Основные вещества валерианы, обладающие успокаивающим действием

I. Валепотриат (валтрат) и его производные	II. Валеренал (валеренон) и его Валеренал R ₁ =CHO; R ₂ =H
1. Валтрат R ₁ =OCOCH ₃ ; R ₂ =OCO-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1. Валереновая кислота R ₁ =COOH; R ₂ =H
2. Изовалтрат R ₁ =OCO-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ ; R ₂ =OCOCH ₃	2. Гидроксивалереновая кислота R ₁ =COOH; R ₂ =OH
3. Ацетвалтрат R ₁ =OCOCH ₃ ; R ₂ =OCO-C(CH ₃) ₂	3. Ацетоксивалереновая кислота R ₁ =COOH; R ₂ =OCOCH ₃
COOCH ₃	

За рубежом сесквитерпеноиды рекомендуют определять ТСХ и ГЖХ, а валепотриаты - ВЭЖХ. По Европейской фармакопее следует определять наличие валереновой и ацетоксивалереновой кислот, а по немецкой фармакопее - валереновой и гидроксивалереновой кислот [3].

Сесквитерпеновые производные - маркерные вещества для видов валерианы лекарственной. Отсутствие стандартного образца валереновой кислоты не позволяло объективно проводить их количественное определение. Способ его получения разработан в НИИ фармации Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова.

Валереновая кислота - β-ненасыщенная бициклическая кислота с температурой плавления 140-142°C и углом

вращения [α]_D²⁰ - 120°. В её ИК-спектре имеются полосы поглощения при 2850 см⁻¹, 1675 см⁻¹, 1630 см⁻¹, что соответствует наличию групп COOH, C=O и двойной связи соответственно. Структура валереновой кислоты подтверждена спектрами ЯМР ¹H (одномерным и COSY) и ¹³C (режим подавления ксв ¹H, ¹³C и АРТ). ПМР спектр ¹³C содержал следующие сигналы: 11.9, 13.4 (C₃-CH₃, C₈-CH₃, C₁₂-CH₃); 24.4, 25.2, 28.6, 32.9, 34.4 (C₁, C₅, C₆, C₇, C₈); 37.3 (C₂); 47.3 (C₉); 125.3, 131.0, 133.0 (C₃, C₄, C₁₂); 146.1 (C₁₁); 173.6 (C₁₄).

В масс-спектре наблюдался пик молекулярного иона с массовым числом 234. Основные направления фрагментации структуры связаны с элиминированием из молекулярного иона карбоксильной группы и ступенчатым разрывом связей в бициклическом ядре. В спектре отмечены следующие пики дочерних ионов: [M-CH₃]⁺(219), [M-CH₃-H₂O]⁺(201), [M-COOH]⁺(189), [M-COOH-C₂H₄]⁺(161), [M-COOH-C₃H₅]⁺(148), [M-COOH-C₃H₆]⁺(147), [M-COOH-C₄H₈]⁺(133), [M-COOH-C₅H₇]⁺(122), [M-COOH-C₂H₄-C₄H₆]⁺(107), [M-COOH-C₄H₈-C₃H₆]⁺(91), [M-COOH-C₂H₄-C₄H₆-C₂H₄]⁺(79), C₄H₇⁺(55), C₃H₅⁺(41).

Исследования, связанные с выделением валереновой кислоты, контролировали ТСХ и ВЭЖХ с использованием силуфола и силикагеля.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ - качественное обнаружение и количественное определение сложных эфиров биологически активных веществ в подземных органах валерианы лекарственной из различных мест произрастания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов для сравнительного исследования служили корневища с корнями валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.s.l.), собранные на территории девяти областей Украины и восьми областей Российской Федерации (*табл. 2*).

При проведении исследований использовали реактивы

и растворители, которые соответствовали требованиям АНД, в качестве стандарта – валереновую кислоту.

Обнаружение сложных эфиров биологически активных веществ мы осуществляли следующим образом. В колбочку вместимостью 100 мл помещали 10,0 г измельченного сырья валерианы, добавляли 50 мл 70% спирта этилового, встряхивали на вибрационном аппарате в течение часа и фильтровали через бумажный фильтр. 5 мл полученного извлечения упаривали на водяной бане, нагретой до 70-80°C, удаляя растворитель с помощью груши. К остатку прибавляли 5 мл щелочного раствора гидроксиламина гидрохлорида и оставляли на 20 минут, затем приливали 10 мл 1М раствора кислоты хлористоводородной и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1М растворе кислоты хлористоводородной и наблюдали появление краснотного окрашивания [2].

Кроме качественной реакции, мы проводили хроматографирование полученного фильтрата. С этой целью на линию старта пластинки «Силуфол» микропипеткой наносили 0,010 мл фильтрата. Пластинку помещали в камеру, предварительно насыщенную на протяжении 30 минут смесью растворителей ацетон-гексан (1:2) и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителя проходил 10-13 см, пластинку вынимали из камеры и сушили на воздухе в течение 5 минут.

Для проявления мы использовали раствор ванилина в кислоте серной (0,16г ванилина + 16 мл воды + 30 мл H₂SO₄ концентрированной) при нагревании пластинки в сушильном шкафу при температуре 80°C на протяжении 5 минут. При этом на хроматограмме появлялось пятно от малинового до красно-фиолетового цвета со значением R_f в пределах 0,45 -0,53, совпадающее с достоверным образцом кислоты валереновой.

После качественного обнаружения провели количественное определение сложных эфиров биологически активных веществ в ряде образцов валерианы лекарственной заготовленных в местах естественного произрастания и выращенных на отдельных участках (табл. 2).

Аналитическую пробу сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 2 мм, около 5,0 г (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл. Прибавляли 60 мл смеси хлороформ - 96% спирт этиловый (5:1), 1 мл кислоты хлористоводородной разведенной, взбалтывали на протяжении 45 минут на вибрационном аппарате и фильтровали через бумажный фильтр, смоченный 5 мл хлороформно-спиртовой смеси, в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр. Экстракцию повторяли ещё раз с 40 мл смеси хлороформ - 96% спирт этиловый (5:1) в течение 15 минут. Извлечение фильтровали через тот же фильтр и в ту же мерную колбу. Коническую колбу и фильтр промывали 5 мл хлороформно-спиртовой смеси (5:1). Объём извлечения в колбе доводили этой же смесью до метки и перемешивали.

25 мл полученного раствора отмеривали в выпарительную чашку, прибавляли 10 мл воды очищенной и хлоро-

форм отгоняли на кипящей водяной бане. Водное извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 25 мл через бумажный фильтр. Выпарительную чашку промывали 10 мл воды очищенной, фильтруя через тот же фильтр в ту же мерную колбу; фильтр промывали 3 мл воды очищенной и доводили объём раствора в колбе водой очищенной до метки и тщательно перемешивали.

В две мерные колбы вместимостью 25 мл отмеривали по 5 мл полученного раствора. В одну из них приливали 5 мл щелочного раствора гидроксиламина гидрохлорида в метаноле, оставляли на 20 минут и затем добавляли 10 мл 1М раствора кислоты хлористоводородной и 5 мл 2% раствора железа окисного хлорида в метаноле (испытываемый раствор). С помощью спектрофотометра Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer измеряли оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 512+5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (рис. 1).

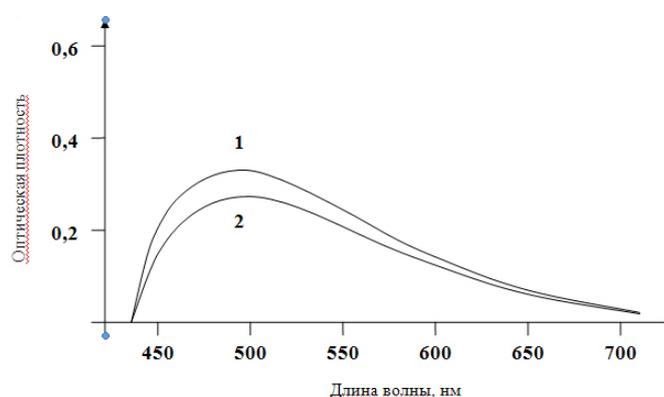


Рис. УФ-спектры поглощения продуктов реакции взаимодействия валереновой кислоты (1) и извлечения корневищ с корнями валерианы (2) с гидроксиламином и железа окисного хлоридом

В качестве раствора сравнения использовали содержание второй колбы, дополненное 5 мл метанола, 10 мл 1М раствора кислоты хлористоводородной и 5 мл 2% раствора железа окисного хлорида в метаноле [1, 2].

Совпадение максимумов дифференциальных спектров поглощения продуктов реакции взаимодействия содержимого первой колбы и валереновой кислоты с гидроксиламином и железа окисного хлоридом позволили использовать валереновую кислоту в качестве стандарта.

Содержание сложных эфиров биологически активных веществ в пересчете на валереновую кислоту и абсолютно сухое сырьё вычисляли по формуле:

$$X, \% = \frac{D \times 100 \times 25 \times 25 \times 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times a \times 25 \times 5 \times (100 - W)} = \frac{D \times 50000}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times a \times (100 - W)}$$

где

D- оптическая плотность испытуемого раствора,

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения продуктов реакции кислоты валереновой с гидроксиламином и железа окисного хлоридом, равный 10,5;

a - навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %

Результаты определений приведены в таблице 2.



Таблица 2

Содержание сложных эфиров биологически активных веществ в подземных органах валерианы лекарственной из различных мест произрастания

Место и время сбора	D	X,%
Дикорастущая <i>Valeriana officinalis</i> L.s.l.		
г. Запорожье, Канцеровская балка, 09.05.02		
г. Запорожье, Канцеровская балка, 08.07.04		
г. Запорожье, Канцеровская балка, 12.04.08		
г. Запорожье, правый берег р. Днепр, 22.04. 07	0,308	3,37
г. Запорожье, о. Хортица, 19.05.07	0,295	3,28
г. Запорожье, опытный участок ЗГМУ, 18.04.08	0,258	2,90
Закарпатская обл., Мукачевский р-н, с. Чикодиево, 06.08.07	0,702	7,69
Закарпатская обл., Раховский р-н, Карпатский заповедник, Черногорское лесничество, 15.07.04	0,544	6,12
Донецкая обл., г. Николаевка, 16.07.04	0,257	2,86
Ивановская обл., Тейковский р-н, д. Мясниково, 29.09.07	0,111	1,29
Кировоградская обл., г. Новомиргород, 14.07.07	0,198	2,21
Кировоградская обл., г. Знаменка, 20.07.03	0,257	2,87
Киевская обл., Белоцерковский р-н, с. Фурсы, 26.07.03	0,183	2,12
Киевская обл., с. Вишняки, 25.07.04	0,353	3,87
Киевская обл., с. Устиновка, 19.08.01	0,263	2,99
Костромская обл., г. Нерехта, 10.08.02	0,283	3,12
Одесская обл., г. Котовск, 14.08.04	0,575	6,35
Полтавская обл., с.Березоточа, 24.08.07	0,386	4,33
Тверская обл., Оленинский р-н, д. Молодой Туд, 29.09.07	0,260	2,90
Челябинская обл., г. Озерск, 25.07.03	0,465	4,80
Черкасская обл., с. Монастырище, 15.06.07	0,288	3,20
Читинская обл., Кыринский р-н, с. Нижний Стан, 23.07.02	0,474	5,11
	0,443	4,99
	0,357	3,62
	0,417	4,36
Культивируемая <i>Valeriana officinalis</i> L.s.l.		
Запорожская обл., Васильевский р-н, с. Камянка, 17.08.04	0,335	3,68
Запорожская обл., г. Приазовск, 13.06.07	0,223	2,44
Вологодская обл., Вологодский р-н, д. Харачево, 28.07.06	0,509	5,27
Рязанская обл., Ботанический сад РязГМУ, 14.07.07	0,353	3,23
г. Харьков, ГНЦЛС, 22.07.07	0,343	3,52
г. Ярославль, пос. Скобыкино, 18.10.07	0,209	2,50

Из табличных данных следует, что по содержанию сложных эфиров биологически активных веществ отдельные об-

Сведения об авторах:

Шкроботько П.Ю., ассистент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ЗГМУ;

Попов Д.М., доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии НИИ фармаци Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова;

Фурса Н.С., доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии ЯГМА

Адрес для переписки:

Шкроботько Павел Юрьевич, 69035, г. Запорожье, ул. Маяковского, 26, Кафедра фармакогнозии с курсом ботаники.

разцы как дикорастущей, так и культивируемой валерианы значительно различались. Возможно, это в известной мере обусловлено тем, что валериана лекарственная - сложный видовой цикл. В южных областях европейской части СНГ преимущественно растёт валериана холмовая (*Valeriana collina* Wallr.), например, в Канцеровской балке в окрестностях города Запорожья; в северных областях преобладает валериана возвышенная (*V. exaltata* Mikanfil.), популяции которой наиболее богаты по содержанию анализируемых веществ, в частности популяция на правом берегу реки Днепр в городе Запорожье; в восточных областях чаще других встречается валериана очереднолистная (*V. alternifolia* Ledeb.), именно её образец из Читинской области нами использован для анализа.

ВЫВОДЫ

Спектрометрическим методом определено количественное содержание сложных эфиров биологически активных веществ в пересчете на валереновую кислоту в подземных органах 29 образцов валерианы лекарственной из различных мест произрастания.

Обнаружено, что использованные для анализа образцы значительно различались по содержанию анализируемых веществ, что, возможно, обусловлено тем, что *Valeriana officinalis* L.s.l. – полиморфный комплекс.

Отмечено, что наиболее богата сложными эфирами биологически активных веществ популяция валерианы лекарственной из окрестностей города Запорожья.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ивлева Ж.Е.* Исследование по разработке методик анализа основных действующих веществ сырья и препаратов валерианы лекарственной: Автореф. дис. канд. фармац. наук. – Рязань, 2001. – 23 с.

2. *Коренман И.М.* Методы определения органических соединений. Изд-е 2-е, перераб. и дополн. – М.: Химия, 1975. – 360 с.

3. *Середа А.В., Середа Л.А., Бовтенко В.А. и др.* Анализ методов стандартизации корневищ с корнями валерианы и препаратов на их основе по содержанию действующих веществ // Фармаком. - 2007. -№2-с.41-54.

4. *Фурса Н.С., Григорьева Е.А., Корниевская В.Г. и др.* Валерианотерапия нервно-психических болезней: Монография. - Запорожье: Изд-во ЗАО «ИВЦ с/х», 2000. - 348 с.