

ВОПРОСЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО

Определены показатели качества листьев первоцвета весеннего. Разработан метод качественного анализа флавоноидов с использованием тонкослойной хроматографии. Проведено количественное определение флавоноидов спектрофотометрическим методом. Подобраны оптимальные условия разделения и экстракции флавоноидов, разработана методика количественного определения флавоноидов в листьях первоцвета весеннего. Установлены другие числовые показатели, характеризующие качество сырья.

Ключевые слова: первоцвет весенний, стандартизация, показатели качества листьев, флавоноиды.

Первоцвет весенний (лекарственный) (*Primula officinalis*) является перспективным лекарственным и пищевым растением семейства первоцветных (*Primulaceae*). Первоцвет лекарственный произрастает в европейской части России, на территории Украины, Белоруссии, в Крыму, на Кавказе, в Казахстане, в Средней Азии, на Урале, в Западной Сибири.

Растение обладает спазмолитическим, седативным, слабительным, потогонным, противокашлевым, жаропонижающим действиями. Корневища с корнями первоцвета весеннего применяют в виде отвара как отхаркивающее средство (в составе комплексной терапии) при воспалении легких, бронхите и других заболеваниях верхних дыхательных путей. Настой листьев и салат из листьев первоцвета используют как общеукрепляющее средство при гиповитаминозах.

Листья и корневища с корнями первоцвета весеннего официнальны в Румынии. Входит в БТФ в качестве седативного, спазмолитического и гипнотического средства. Применяют в гомеопатии. Содержание в листьях витамина С и каротина во много раз превосходит содержание в других зеленых растениях и настолько велико, что в Англии и Голландии первоцвет выращивается на огородах как витаминное растение для салатов. Порошок листьев добавляют также к первым блюдам [5].

Изученная нами антиоксидантная и клиническая эффективность экстракта первоцвета весеннего показала его широкий лечебно-профилактический потенциал и возможность использования в комплексном лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы [3].

Согласно данным литературы в подземной части растений содержатся тритерпеноиды: примверозид, примуловая кислота, примверин, примулаверин и др., витамин С. Листья расте-

ния содержат витамин С, флавоноиды: кемпферола дирамнозид, в гидролизате: мирицетин, кверцетин, кемпферол. Антоцианы в гидролизате: дельфинидин, цианидин. Цветки содержат эфирное масло, в его составе: 5-метоксиметилсалицилат, 4-метоксиметилсалицилат, примверин, примулаверин, витамин С. Семена: углеводы – амилоид [4].

Основные действующие вещества листьев первоцвета весеннего – фенольные соединения, а именно сумма флавоноидов, обуславливающая антиоксидантное действие, – изучены недостаточно.

Существующий отраслевой стандарт ГОСТ 3166-76 «Листья первоцвета весеннего» не удовлетворяет современным требованиям, предъявляемым к нормативной документации на растительное сырье. Данный ГОСТ предусматривает стандартизацию сырья по таким показателям, как влага, зола, содержание примесей, аскорбиновой кислоты. В нем отсутствуют разделы «Микроскопия», «Качественные реакции»; разделы «Внешние признаки», «Числовые показатели», «Количественное определение» требуют дополнения.

Цель данной работы – определение показателей качества листьев первоцвета весеннего и разработка нормативной документации – фармакопейной статьи на листья первоцвета весеннего.

Для решения этой задачи мы проводили разработку методик качественного и количественного определения основной группы биологически активных веществ – флавоноидов, а также устанавливали товароведческие показатели, характеризующие доброкачественность сырья.

Объектом исследования служила трава первоцвета весеннего, заготовленная в Центральной России, на территории Поволжья и

Урала, в 2005-2008 гг. в период начала цветения растений.

Для качественного анализа флавоноидов в листьях первоцвета весеннего использовали метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ), имеющий высокую чувствительность и селективность. Впервые разработана методика обнаружения флавоноидов методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) (10x15). В качестве достоверного образца использовали 0,1% раствор стандартного образца ГСО рутина и коричной кислоты; в качестве подвижной фазы – систему растворителей: спирт бутиловый – кислота ледяная уксусная – дистиллированная вода (4:1:1). При рассмотрении хроматограммы в УФ-свете обнаруживаются три основные зоны (одна из которых с темной флуоресценцией на уровне зоны ГСО рутина с Rf 0,65, вторая с темной флуоресценцией с Rf 0,48 (не идентифицирована), третья – с темно-фиолетовой флуоресценцией на уровне зоны коричной кислоты с Rf 0,89).

В основу количественного определения суммы флавоноидов положен спектрофотометрический метод. В основе метода анализа нами выбрана реакция флавоноидов с хлоридом алюминия в среде 70% спирта этилового [1]. Хлорид алюминия является доступным реактивом, хорошо растворимым в воде и спирте.

Определение оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов травы первоцвета проводили на одном образце сырья. Проведенные нами исследования по изучению влияния степени измельченности сырья на экстракцию флавоноидов показали, что максимальное извлечение флавоноидов из листьев первоцвета достигается при степени измельчения сырья 1 мм.

Для экстрагирования суммы флавоноидов из растительного сырья в литературе описано применение спиртов и водно-спиртовых растворов. Нами проведено изучение оптимальной концентрации спирта этилового для извлечения суммы флавоноидов.

Как следует из полученных данных, максимальное извлечение суммы флавоноидов достигается 70% спиртом этиловым.

Для извлечения суммы флавоноидов нами использована экстракция с нагреванием на кипящей водяной бане до наступления равновесия, которое в данном случае наступает через 30 минут.

В составе суммы флавоноидов листьев первоцвета содержатся флавоноидные соединения в форме моно-, биозидов и дигликозидов с преобладанием биозидов и дигликозидов, поэтому в качестве стандартного образца нами применен рутин-стандарт.

Нами исследованы спектры поглощения спиртовых извлечений из листьев первоцвета с алюминия хлоридом. Эти спектры совпадали со спектром поглощения рутина с алюминия хлоридом, а максимум поглощения находился при длине волны 408 нм. Измерения рекомендуется проводить в области максимума поглощения. Эта область спектров достаточно удалена от спектров поглощения сопутствующих фенольных и других органических веществ, содержащихся в экстрактах из сырья.

В качестве раствора сравнения мы использовали исходный раствор извлечения без алюминия хлорида, т.е. применяли дифференциальный вариант спектрофотометрии, что позво-

Таблица 1. Выбор оптимальной степени измельченности для экстракции суммы флавоноидов из листьев первоцвета

Степень измельчения сырья, мм	Содержание суммы флавоноидов (на абсолютно сухое сырье), %
1	5,49
2	4,7
3	3,56

Таблица 2. Выбор оптимальной концентрации спирта этилового для экстракции суммы флавоноидов из листьев первоцвета

Концентрация спирта этилового	Содержание суммы флавоноидов (на абсолютно сухое сырье), %
40% спирт этиловый	3,99
70% спирт этиловый	4,14
96% спирт этиловый	2,55

Таблица 3. Выбор времени экстрагирования суммы флавоноидов из листьев первоцвета

Время экстракции	Содержание суммы флавоноидов (на абсолютно сухое сырье), %
20 мин	5,03
30 мин	5,49
45 мин	5,31
60 мин	5,44
1 ч 30 мин	5,05

Таблица 4. Метрологическая характеристика метода количественного определения суммы флавоноидов (в пересчете на рутин)

N п/п	X	n	x ср.	S·I	S	P,%	t (P,f)	•x	E отн.
1	3,12 3,08 3,18 3,15 3,10	5	3,13	0,0016	0,04	95	2,78	0,1112	3,55%



Рисунок 1. Дифференциальные спектры поглощения в 70% спирте этилового экстракта листьев первоцвета с алюминия хлоридом, рутина с алюминия хлоридом

ляет исключить влияние на результаты анализа сопутствующих веществ, имеющих оптическую плотность в области максимума поглощения извлечений из сырья. При проведении анализа пробы подкисляли уксусной кислотой для перевода флавоноидов и сопутствующих им веществ в недиссоциированную форму с целью улучшения воспроизводимости результатов. В качестве стандартного образца применяли ГСО рутин. Расчет содержания суммы флавоноидов производили в пересчете на рутин. Устойчивое окрашивание извлечений из растительного материала с хлоридом алюминия наступает через

30 мин. и сохраняется в течение 1,5 часов, что достаточно для проведения анализа.

Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 3,55%.

Проведение опытов с добавками известного количества ГСО рутина в извлечении из сырья первоцвета показало отсутствие систематической ошибки метода.

Предложенной методикой проанализировано 5 партий сырья. Результаты анализов показали, что содержание суммы флавоноидов находится в пределах от 3,08 до 5,55%. В связи с этим рекомендуем установить норму содержания суммы флавоноидов в листьях первоцвета не менее 3%.

При разработке нормативной документации на листья первоцвета весеннего были установлены числовые показатели, характеризующие качество сырья: суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 3%; влажность не более 14%; золы общей не более 10%; золы, не растворимой в 10% хлористоводородной кислоте, не более 3%; пожелтевших, побуревших и почерневших листьев не более 2%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%.

В результате проведенных исследований разработаны методики качественного и количественного определения основной группы биологически активных веществ – флавоноидов, определены числовые показатели качества сырья, которые включены в ФС «Листья первоцвета весеннего».

Список использованной литературы:

1. Беликов В.В., Шрайбер М.С. Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. – 1970. – № 1. – С. 68-72.
2. Государственный отраслевой стандарт 3166-76 «Листья первоцвета весеннего».
3. Латыпова Г.М., Романова З.Р., Соколов Г.В. и др. Средство растительного происхождения, обладающее антиоксидантной активностью. Патент РФ на изобретение № 2342942. – 10.01.2009.
4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Раеoniaceae-Thymelaeaceae / ответственный редактор П.Д. Соколов; Российская Академия наук. Ботанический институт им. В.Л. Комарова. – СПб.: Наука, 1986. – С. 58.
5. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: Учеб. пособие / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой, 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, Издательство СПХФА, 2002. – 407 с.