

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

УДК 615.072

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ГИНКГО БИЛОБА И СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ

Жумагазеева А.Ж.,

магистр 2 года обучения

Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул.проф. Попова, д. 14, лит. А.

Легостева А.Б.

доцент, кандидат фармацевтических наук

Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул.проф. Попова, д. 14, лит.А.

DEVELOPMENT OF DRY EXTRACT TECHNOLOGY WITH BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF GINKGO BILOBA AND SOPHORA JAPONICA

Zhumagazieva A.Zh.,

Master of 2 years of study

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University"

of the Ministry of Health of the Russian Federation,

197376, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova, 14, lit. A.

Legosteva A.B.

Associate Professor, Candidate of Pharmaceutical Sciences

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University"

of the Ministry of Health of the Russian Federation,

197376, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova, 14, lit.A.

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2022.4.98.1657

АННОТАЦИЯ

При разработке технологии сухого экстракта гинкго билоба и софоры японской для извлечения биологически активных веществ использована трехкратная ремацерация с делением экстрагента на части интенсифицированная ультразвуком. Действующие вещества этих растений (флавоноиды) снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний, уменьшают проницаемость и повышают прочность капилляров. Проведена стандартизация сухого экстракта на основе листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской.

ABSTRACT

When developing the technology of dry extract of ginkgo biloba and Sophora Japonica for the extraction of biologically active substances, three-fold remaceration with the division of the extractant into parts intensified by ultrasound was used. The active substances of these plants (flavonoids) reduce the risk of cardiovascular diseases, reduce permeability and increase the strength of capillaries. Standardization of dry extract based on ginkgo biloba leaves and Japanese sophora buds has been carried out.

Ключевые слова: листья гинкго билоба, бутоны софоры японской, сухой экстракт, ультразвуковая экстракция, технологическая схема.

Keywords: ginkgo biloba leaves, Japanese sophora buds, dry extract, ultrasonic extraction, technological scheme.

Введение Одним из основных приоритетных направлений в научном обеспечении фармацевтической индустрии мира считается поиск и создание лекарственных средств растительного происхождения, разработка высокоэффективных технологий и внедрение их в промышленное производство. Фитопрепараты составляют 25 % от общего количества

зарегистрированных лекарственных препаратов в Российской Федерации [1].

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной смертности населения в большинстве развитых стран мира, в том числе, и в Российской Федерации. По данным Всемирной организации здравоохранения [2] в мире ежегодно от болезней системы кровообращения умирает около 17

миллионов человек. Для создания препаратов, используемых при ССЗ, в качестве растительного сырья представляют большой интерес такие растения как гинкго билоба (*Ginkgo biloba L.*) и софора японская (*Sophora japonica L.*).

В состав этих растений входят вещества, благотворно влияющие на состояние сосудов и капилляров. В частности, флавоноиды: кверцетин и рутин, относящиеся к группе витамина Р, нормализуют структуру, проницаемость и эластичность сосудов, предупреждают склеротическое поражение кровеносной системы. Уникальные соединения гинголиды (А, В, С, J) и билобалид, содержащиеся только в листьях гинкго билоба увеличивают кровоснабжение органов, снимают головную боль, улучшают память. Следует отметить, что рутин, входящий в группу биофлавоноидов софоры японской в наибольшем количестве присутствует именно в бутонах этого растения.

В настоящее время получение галеновых препаратов из лекарственного растительного сырья является современной и актуальной задачей в области фармацевтической технологии. Особую нишу в них занимают сухие экстракты, существенные преимущества, которых по сравнению с настойками и жидкими экстрактами (компактность, удобство в транспортировке, стабильность при хранении и т.д.) делают необходимым углубление научных исследований в области их разработки и стандартизации. С целью увеличения и улучшения ассортимента на рынке фармацевтических препаратов и биологически активных добавок к пище, направленных на лечение ССЗ, в задачи исследования входит разработка технологии и стандартизация сухого экстракта гинкго билоба и софоры японской (ГБСЯ).

Материалы и методы исследования

При разработке технологии сухого экстракта в качестве лекарственного растительного сырья использованы воздушно-сухие листья гинкго билобы и бутоны софоры японской, собранные в 2020 году в Крыму и Китае соответственно. В дальнейших экспериментальных исследованиях объектом изучения служит полученный сухой экстракт ГБСЯ. Вышеупомянутый экстракт стандартизован согласно требованиям и методикам описанным в ГФ XIV издания [3] и Фармакопеи ЕАЭС [4] по следующим показателям: описание, подлинность, потеря в массе при высушивании, количественное определение действующих веществ, тяжелые металлы.

Для получения водно-спиртового извлечения проводят экстракцию 70% спиртом этиловым (хорошо извлекающий флавоноиды) листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской методом трехступенчатой ремацерации с интенсификацией ультразвуком. Применение ультразвука позволяет сократить время технологического процесса, уменьшить количество извлекаемых балластных веществ и обеспечить высокий выход БАВ.

Качественный анализ листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской с помощью качественных реакций

Около 3 г растительного сырья, предварительно измельченного до размера 2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70 % спирта этилового. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают и кипятят в течении 30 мин. После охлаждения колбу с содержимым фильтруют через бумажный фильтр и проводят ряд качественных реакций с визуальным наблюдением изменения внешнего вида.

Качественный анализ водно-спиртового извлечения методом спектрофотометрии

Водно-спиртовое извлечение листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской разбавляют 70 % спиртом этиловым и снимают его спектр. Максимум поглощения позволяет обнаружить флавоноиды, содержащиеся в водно-спиртовом извлечении.

Качественный анализ водно-спиртового извлечения методом тонкослойной хроматографии

При проведении ТСХ восходящим методом неподвижной фазой служат пластинки марки «Silufol UV-254». В сравнительном аспекте, рассмотрены две системы растворителей: бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) и хлороформ-ацетон-метанол (36:1:1).

ТСХ выполняют в хроматографических герметически закрывающихся стеклянных камерах, насыщение которых парами соответствующей подвижной фазы проводят, предварительно выдерживая при температуре от 20°C до 25°C в течении 1 часа. Детектирование зон адсорбции осуществляют в УФ-свете, а также опрыскиванием алюминия (III) хлорида раствором спиртовым 2%. Флавоноиды в УФ-свете обладают собственной флуоресценцией (от желтой, желто-зеленой до коричневой). Рабочим стандартным образцом служит рутин и кверцетин. Нанесение исследуемых растворов на хроматографические пластинки осуществляют при помощи микрошприцев минимальными порциями для получения пятен диаметром 2-5 мм. Объем пробы – 300 мкл сухого экстракта и пробы 0,05% спиртового раствора рутина – 750 мкл, время хроматографирования – 35 мин. После поднятия подвижной фазы пластинку вынимают, фиксируют линию финиша, сушат и детектируют пятна.

Количественное определение флавоноидов в листьях гинкго билоба и бутонах софоры японской методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием в качестве комплексобразующего реагента хлорида алюминия

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 30 мл спирта 70 % и взвешивают с точностью до $\pm 0,01$ г. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной

бане в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 70 % до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный (раствор А). 1,0 мл раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, объем раствора доводят 96 % спиртом до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре UVmini-1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 406 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

В качестве стандартного образца применяется стандартного образца (СО) рутин. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в % X вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A * a_0 * 1 * 30 * 25 * P * 100}{A_0 * 50 * 25 * a * 1 * 100 * (100 - w)} * 100$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора Б; А₀ – оптическая плотность СО рутин; а – масса сырья в г; а₀ – масса СО рутин в г; Р – содержание основного вещества в СО рутин, %; w – потеря в массе при высушивании сырья в % [3].

Результаты исследования и их обсуждение
При производстве сухого экстракта основной технологической стадией является экстракция лекарственного растительного сырья. Помимо экстракции растительного сырья технология сухого экстракта включает также стадии выпаривания (то есть концентрирование полученной водно-спиртовой вытяжки), очистки (включающую в себя отстаивание и последующую фильтрацию от выпавших балластных веществ) и сушки (при температуре не превышающей 55°C). Технологическая блок-схема представлена на рисунке 1.

Сухой экстракт ГБСЯ представляет собой кристаллический порошок коричневого цвета и как показывают дальнейшие исследования (согласно методике ЕАЭС) обладает высокой гигроскопичностью. Влажность полученного экстракта составляет 3,27±0,2%.

Подлинность сухого экстракта изучена при помощи качественных реакций, представленных в таблице 1, из которых выбраны 2 наиболее характерных для обнаружения флавоноидов при стандартизации готовой фитосубстанции.

Таблица 1

Качественные реакции по обнаружению флавоноидов

№ П/П	Качественная реакция	Эффект реакции	Вид
1	Цианидиновая проба (проба Шинода)	Красно-оранжевое окрашивание	Рутозид, кверцетин
2	Цианидиновая реакция по Брианту	Образование двух слоев, верхний прозрачный, нижний ярко-бардовый (красный)	Флавоноиды в виде гликозидов и в виде агликонов.
3	Реакция со щелочью (натрия гидроксид)	Желтое окрашивание	Флавонолы и флавоны
4	Реакция с железом (III) хлоридом	Темно-зеленый цвет	Присутствие о-диоксигруппировки в структуре флавоноидов
5	Реакция с алюминия хлоридом	Коричнево-желтое окрашивание с зеленой флюоресценцией	Флавоны, флавонолы
6	Реакция Вильсона	Коричнево-желтая окраска	Халконы, ауроны

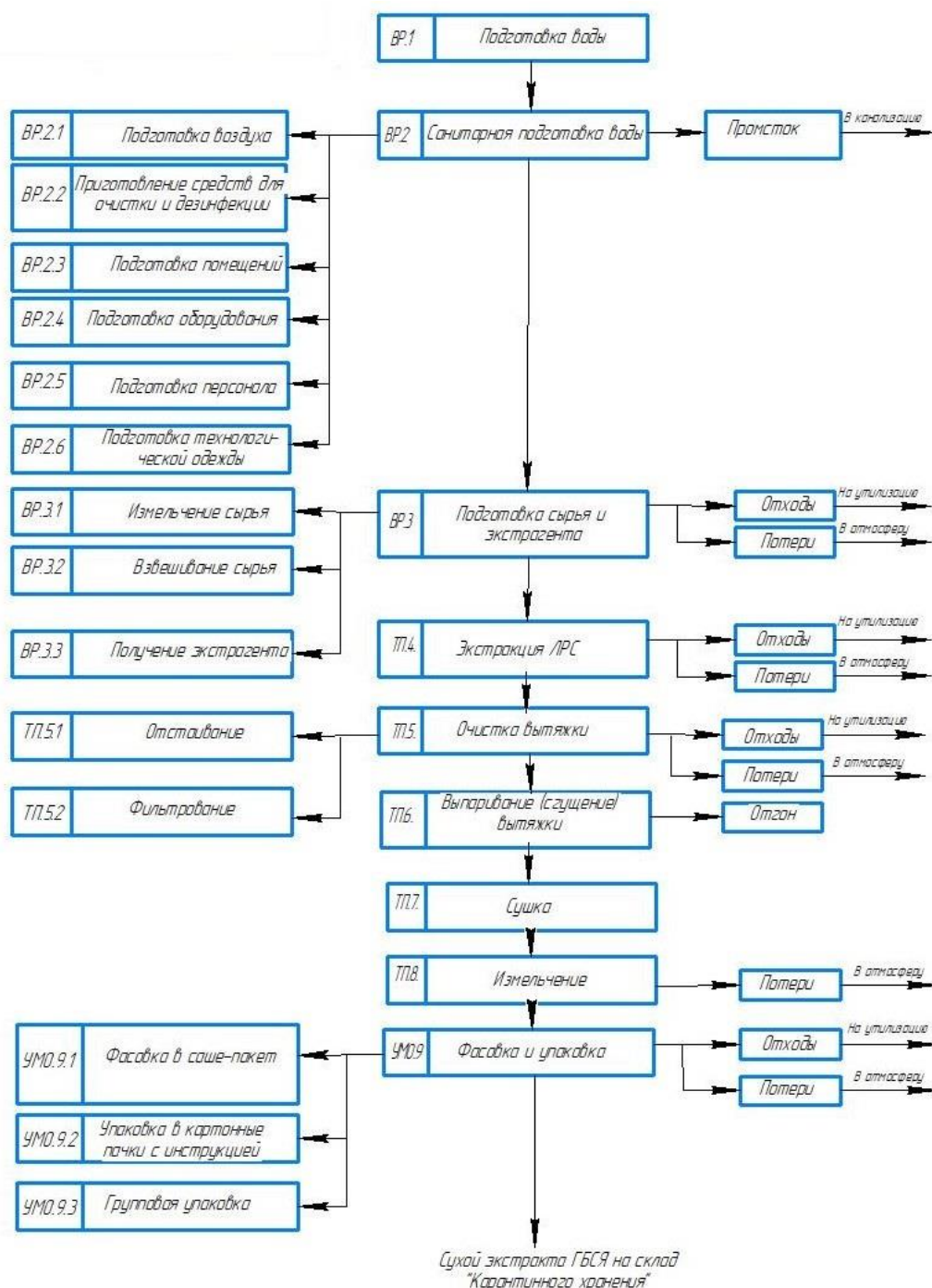


Рис 1. Технологическая схема сухого экстракта ГБСЯ

В ходе качественного анализа водно-спиртового извлечения листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской получен спектр поглощения, который представлен на рисунке 2.

Максимум поглощения при длине волны 258.5 нм иллюстрирует наличие в сухом экстракте флавоноидов.

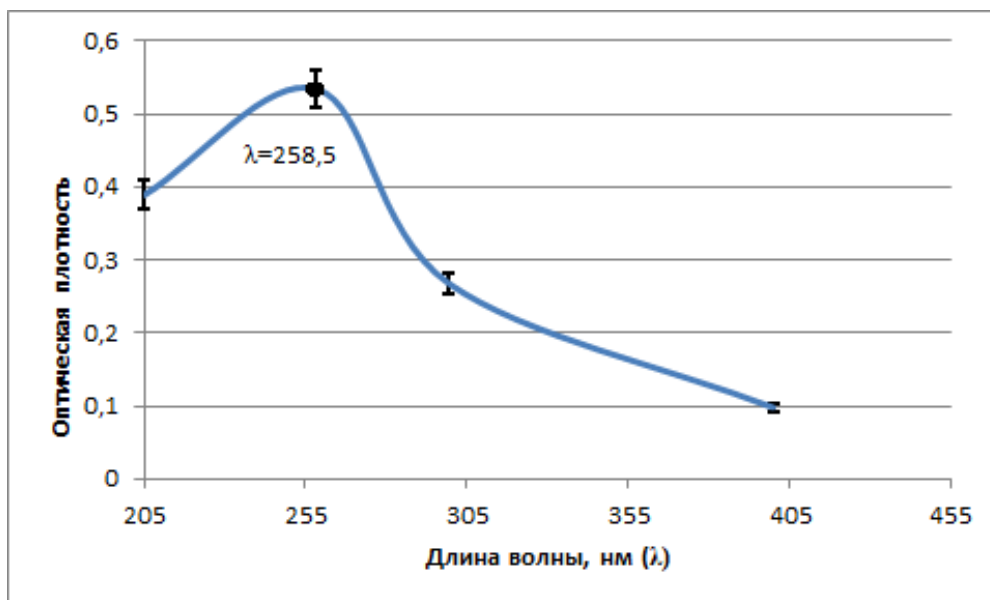


Рис.2. Спектр поглощения сухого экстракта

Результаты ТСХ представлены на рисунке 3. При ультрафиолетовом свете на хроматограмме испытуемого образца обнаружено семь пятен: одно грязно-желтое, два бледно-желтых, одно желтое, два светло-желтых, одно неоново-желто-зеленое, с определенными значениями Rf. В результате

проведенных исследований в составе сухого экстракта ГБСЯ идентифицирован рутин ($R_f = 0.41 \pm 0.01$) [5], кверцетин ($R_f = 0.93 \pm 0.01$), а также гиперозид значение $R_f = 0.54 \pm 0.01$, которого соответствует данным литературы [6].

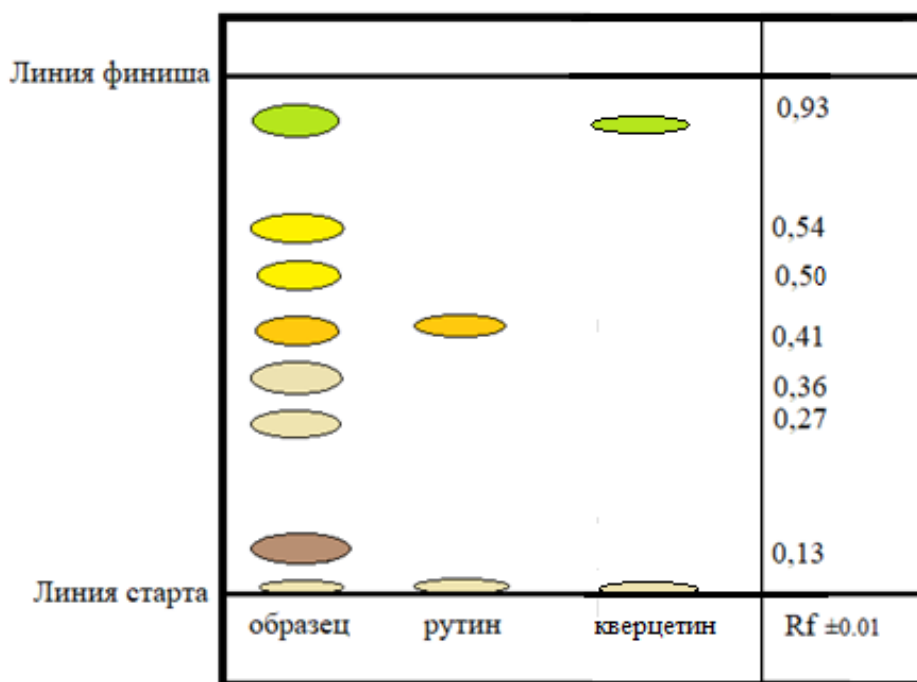


Рис.3. Хроматограмма качественного анализа флавоноидов сухого экстракта

В результате проведенных экспериментов установлено количественное содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) для сухого экстракта. Данные количественного анализа представлены в таблице 2.

Данные стандартизации по основным показателям сухого экстракта ГБСЯ определены на образцах, полученных по разработанной нами и представленной выше технологической схеме и приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты стандартизации сухого экстракта листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской

№п/п	Показатель	Методы анализа	Нормы	Экспериментальные значения
1	Описание	Органолептический	-	Кристаллический порошок рыжевато-коричневого цвета, со специфическим запахом
2	Подлинность	1. Качественные реакции: А) Цианидиновая проба (проба Шинода) Б) Реакция с железом (III) хлоридом.	-	А) Красно-оранжевое окрашивание (флавоны, флавонолы) Б) черносиний цвет (флавоноиды)
		2. Тонкослойная хроматография в системе растворителей: А) БУВ (4:1:5) на пластинках «Silufol»	-	Должно проявляться не менее 7 пятен в диапазоне Rf от 0.12 до 0.94 Rf = 0.41±0.01-рутин [4], Rf = 0.54±0.01-гиперозид [5], Rf=0.93±0.01 кверцетин[5]
		Спектрофотометрия	-	В спектре поглощения максимум наблюдается при длине волны λ_{max} =258.5 нм
3	Содержание флавоноидов	Спектрофотометрия (в пересчете на рутин) при длине волны λ_{max} = 406 нм	-	Не менее 9.74±0.10%
4	Потеря в массе при высушивании	ГФ XIV издания, 1 том, ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	3.27±0.03%
5	Тяжелые металлы	ГФ XIV издания 1 том, ОФС.1.2.2.2.0012.15 «Тяжелые металлы»	Не более 0.01 %	Не более 0.01 %

Выводы Подводя итоги проделанной работы, предложены параметры стандартизации сухого экстракта листьев гинкго билоба и бутонов софоры японской: описание, подлинность, потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы, содержание суммы флавоноидов.

Для обнаружения флавоноидов использованы качественные реакции, методы ТСХ и спектрофотометрии. В готовом продукте зафиксированы не менее 7 флавоноидов. Предложена методика спектрофотометрического определения суммарного содержания действующих веществ в сухом экстракте ГБСЯ, которое составляет 9.74%±0.1%.

Список литературы

1. Тельнова Е.А. Организация лекарственного обеспечения в российской федерации // Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья имени Н. А. Семашко. 2021. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/organizatsiya-lekarstvennogo-obespecheniya-v-rossiyskoy-federatsii-1>

2. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. - Режим доступа: [:// www.who.int/ru/](http://www.who.int/ru/) . -1 20.04.2022.

3. Государственная Фармакопея РФ - 14 изд. в 4 томах. - М.: МЗ РФ, 2018. - Федеральная электронная медицинская библиотека <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>

4. Фармакопея Евразийского экономического союза 1 том, 1 часть // Москва, Евразийская экономическая комиссия, 2020. – С. 586

5. Тринеева, О. В., и М. А. Рудая. «Исследование профиля флавоноидов плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии». Сорбционные и хроматографические процессы, т. 20, вып. 1, февраль 2020 г., сс. 79-86,

6. Федосеева, Л. М. Состав флавоноидов щавеля кислого травы, заготовленной на территории Алтайского края / Л. М. Федосеева, Г. Р. Кутателадзе. // Молодой ученый. — 2019. — № 34 (272). — С. 33-36. — URL: <https://moluch.ru/archive/272/62076/> (дата обращения: 14.04.2022).