

УДК 615.322+66.061.3

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ В ЛИСТЬЯХ ШАЛФЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО

© 2017 г. А. С. Халиуллина*,¹, Р. Ш. Хазиев*, А. А. Саламатин**

*Казанский государственный медицинский университет, фармацевтический факультет
420012 Россия, Казань, ул. Бутлерова, 49

**Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт математики и механики им. Н.И. Лобачевского
420008 Россия, Казань, ул. Кремлевская, 18

¹E-mail: anela_90@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2016 г.

После доработки 23.01.2017 г.

Разработана методика количественного определения дитерпеновых кислот в листьях шалфея лекарственного методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 285 нм. Целевую группу соединений селективно извлекали петролейным эфиром 40/70. Показано, что полнота извлечения определяется главным образом количеством порций чистого растворителя: при оптимальном соотношении массы навески к объему растворителя 1 г/200 мл достаточно двукратной экстракции. Продолжительность каждой экстракции 20 мин. Методика применена для анализа образцов листьев шалфея различных производителей. Найдено, что содержание дитерпеновых кислот в образцах изменяется в пределах от 2.1 до 3.6 мас. % (в пересчете на карнозоловую кислоту). Погрешность единичного определения суммы дитерпеновых кислот в листьях шалфея составляет $\pm 2.38\%$ ($P = 0.95$).

Ключевые слова: шалфей лекарственный, дитерпеновые кислоты, карнозоловая кислота, спектрофотометрия, стандартизация, петролейный эфир.

DOI: 10.7868/S0044450217070088

Шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*) известен в медицине, прежде всего, своими противовоспалительными и антимикробными свойствами, определяющими эффективность препаратов на его основе при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и горла [1–3]. Листья *S. officinalis* входят в состав сборов “Грудной сбор № 3”, “Сальваром” (сбор для ингаляций № 1), “Элакосепт” и др., а их экстракты являются составной частью комплексных препаратов (“Шалфей” пастилки, “Пародонтоцид”, “Стоматофит” и др.) [4].

S. officinalis — источник большого числа химических соединений, обладающих уникальным, разнообразным строением и широким спектром биологической активности. Одну из ключевых ролей в формировании противовоспалительного, антиокислительного и антимикробного действия листьев шалфея лекарственного играют вещества терпеновой и фенольной природы, такие как дитерпены, танины, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды и др. [5, 6]. Наиболее известными и широко изученными представителями этих групп соединений являются карнозоловая кислота и ее производные, а также олигомеры кофейной кислоты (розмариновая кислота и др.). В то же время лекарственное сырье является источником эфир-

ного масла, представленного в основном моно- и сесквитерпеноидами [7].

В отечественной нормативной документации анализируемое сырье традиционно стандартизируется именно по количественному содержанию эфирного масла, которое определяют в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи “Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах” методом перегонки с водой [8]. Предложено стандартизировать шалфей лекарственный и по содержанию суммы дитерпеновых кислот [9] по методике, основанной на экстракции биологически активных веществ (БАВ) шалфея лекарственного ацетоном с последующим выделением и очисткой дитерпеновой фракции и установлением содержания спектрофотометрическим методом при длине волны 285 нм. Для расчетов использовали удельный показатель поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%}$, установленный для стандартного образца карнозоловой кислоты, растворенного в этиловом спирте [9].

При стандартизации листьев шалфея по содержанию БАВ, отвечающих за основные фармакологические свойства сырья (в частности, дитерпеновых кислот), существует вероятность по-

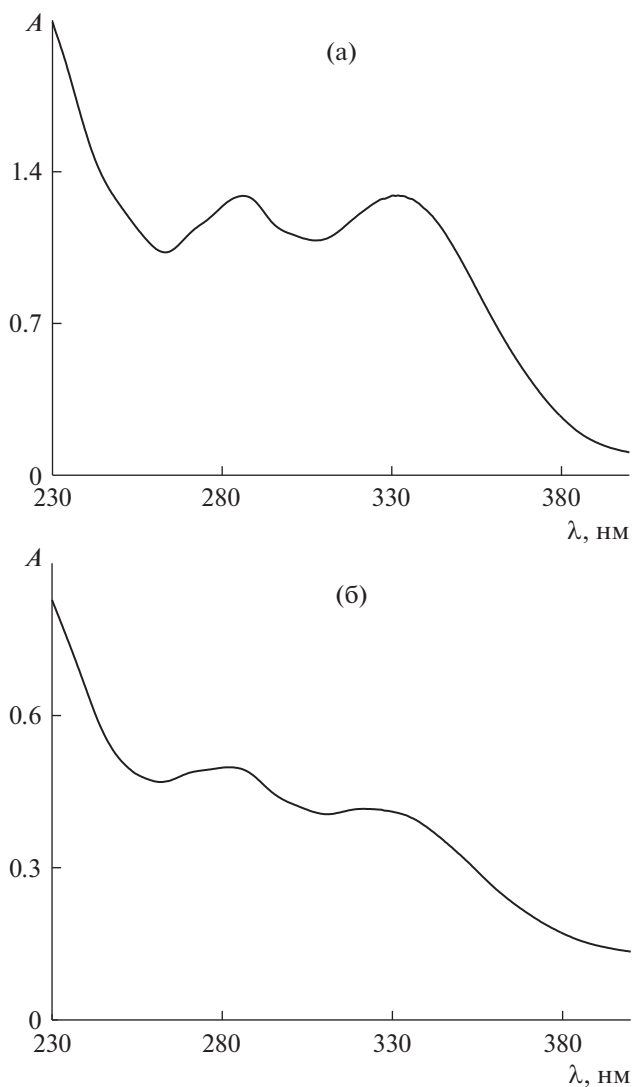


Рис. 1. Спектры поглощения ацетонового (а) и спиртового (б) экстрактов из листьев шалфея лекарственного, полученных по методике [9].

лучения недостоверных результатов. Это связано, с одной стороны, с многостадийной очисткой, приводящей к потере и разрушению определяемых веществ и занижению результатов анализа, и, с другой стороны, с возможным присутствием в растворе полифенольных БАВ, поглощающих свет при той же длине волны, что и определяемые вещества.

Цель настоящей работы – создание усовершенствованной методики количественного определения дитерпеновых кислот в листьях шалфея лекарственного.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Основным объектом исследования являлись листья шалфея лекарственного, фасованные в фильтр-пакеты (ЗАО “Ст-Медифарм”, серии 030210, 050410). Согласно инструкции произво-

дителя сырье представляет собой частицы измельченных листьев, проходящих через сито с размером отверстий 2 мм. Также анализировали листья шалфея, выращенные и заготовленные в Ботаническом саду КГМУ в 2012 и 2013 гг., и фасованные измельченные листья шалфея, выпускаемые различными производителями: ОАО “Красногорсклексредства” (серия 141108), ООО “Фитобот” (11209), ЗАО “Здоровье” (060708), ООО “Фитофарм” (061109).

Для определения содержания дитерпеновых кислот использовали спектрофотометр LAMDA 25 (Perkin Elmer, США) с кюветой толщиной 10 мм.

При изучении кинетики экстракции содержание действующих веществ определяли в момент закипания растворителя (0 мин) и через 5, 10, 20, 30, 60, 90 и 120 мин после этого. Для расчетов использовали удельный показатель поглощения карнозоловой кислоты $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 40.92$, определенный в работе [9]. Рассматривали следующие отношения (L) массы навески (г) к объему растворителя (мл): 1 : 50, 1 : 100, 1 : 150 и 1 : 200.

Полученные данные обрабатывали статистически с применением критерия Стьюдента при доверительной вероятности $P = 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Достоверность методики [9] проверяли на основе УФ-спектров неочищенного (первичного) ацетонового экстракта (рис. 1а) и полученного после его очистки спиртового раствора (рис. 1б). В обоих случаях наблюдаются характерные максимумы поглощения при одних и тех же длинах волн, 283–285 нм, и ~330 нм. Интенсивность первого максимума поглощения в спиртовом растворе определяется вкладом присутствующих в экстракте шалфея лекарственных гидроксикоричных кислот и определяемых дитерпеновых кислот. Второй максимум характерен только для гидроксикоричных кислот [10]. После очистки раствора он по-прежнему выражен (рис. 1б), следовательно, часть гидроксикоричных кислот остается в растворе и влияет на интенсивность первого максимума поглощения. Таким образом, содержание дитерпеновых кислот, определенное по методике [9], является недостоверным. Необходимость проведения процедуры очистки первичного экстракта также влияет на корректность интерпретации результатов экспериментов.

Выбор селективного растворителя. Одним из подходов к разработке методики, дающей достоверные результаты, может быть замена экстрагента на селективный, извлекающий преимущественно целевую группу соединений. Дитерпены шалфея лекарственного являются липофильными соединениями и, по мнению ряда авторов, хорошо растворяются в неполярных растворителях типа петролейного эфира [11]. На рис. 2 представлен УФ-спектр экстракта петролейным эфиром 40/70 из листьев шалфея. Спектр имеет четкий мак-

симум при 285 ± 3 нм и соответствует УФ-спектру карнозоловой кислоты [12].

При сравнении спектров поглощения, представленных на рис. 1 и 2, видно, что в последнем отсутствует максимум поглощения при 330 нм. В первую очередь, это связано с низкой растворяющей способностью петролейного эфира в отношении гидрофильных соединений, к которым относятся и гидроксикоричные кислоты. Этот факт подтверждается также невозможностью растворения в петролейном эфире стандартного образца кофейной кислоты. Таким образом, учитывая избирательность петролейного эфира 40/70 в отношении целевой группы соединений, он рекомендован для экстракции из сырья шалфея лекарственного.

Для количественного определения концентрации целевых соединений в экстрактах необходимы значения удельного показателя поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ и аналитической длины волны, которые в общем случае зависят от растворителя. Эти параметры определяли на основе следующего эксперимента: после экстракции петролейным эфиром и получения УФ-спектра раствора его упаривали под вакуумом досуха, сухой остаток растворяли в этиловом спирте и записывали УФ-спектр нового раствора. Полученные спектры одинаковы в интервале длин волн 270–300 нм; это позволяет предположить, что значения удельного показателя поглощения для разных растворителей равны. Положение максимума при 285 нм также не изменилось при смене растворителя. Таким образом, содержание дитерпеновых кислот определяли спектрофотометрически при длине волны 285 нм и удельном показателе поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 40.92$, полученном в работе [9].

На характеристики УФ-спектров экстрактов могут влиять другие извлекаемые вещества. Концентрация других соединений, поглощающих излучение при 285 нм, должна быть достаточно велика, чтобы их влияние было существенным. При указанной длине волны поглощают свет соединения, имеющие в своей структуре бензольное кольцо; среди растительных БАВ это – различные фенольные соединения. В шалфее, помимо производных карнозоловой кислоты, это – гидроксикоричные кислоты (розмариновая, сальвианоловая и др. производные кофейной кислоты) и флавоноиды [13]. Последние две группы веществ вследствие своей относительной гидрофильности не могут экстрагироваться липофильными растворителями типа петролейного эфира и, следовательно, влиять на спектр экстракта в области аналитической длины волны. Кроме того, отсутствуют сведения о том, что среди липофильных соединений шалфея, способных растворяться в петролейном эфире (моно- и сесквитерпены эфирного масла, компоненты растительного воска, триг-

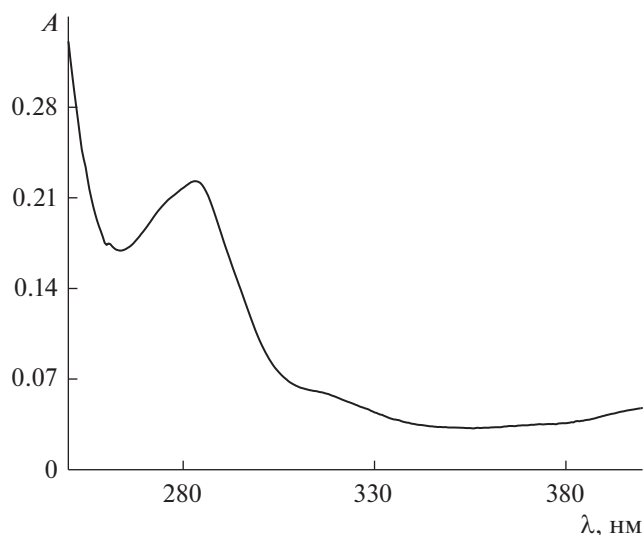


Рис. 2. Спектр поглощения экстракта из листьев *S. officinalis*, в петролейном эфире 40/70.

лициды, каротиноиды и др.), имеются вещества, поглощающие свет в указанном диапазоне.

Изучение кинетики экстракции дитерпеновых кислот из сырья петролейным эфиром 40/70. Проведенное ранее исследование [14] подтвердило общеизвестный факт, что скорость экстракции существенно зависит как от среднего размера частиц образца, так и от диапазона их характерных размеров. Для уменьшения времени диффузионного переноса веществ в частицах сырья и обеспечения дисперсионной однородности навески сырья дополнительно измельчали на электрической мельнице до характерного размера (диаметра) менее 200 мкм. Результаты изучения кинетики экстракции приведены на рис. 3. Здесь по оси ординат отложено содержание x суммы дитерпеновых кислот в листьях шалфея в пересчете на карнозоловую кислоту и абсолютно сухое сырье, рассчитанное по формуле (1) при $V = 100$ (мл); по оси абсцисс отложено время экстракции. Значительный (более 85% от максимального значения для заданных условий) переход целевых веществ в раствор наблюдается уже к моменту закипания растворителя, что совпадает с результатами работ [14, 15]. Далее в течение 10–20 мин выход экстракта растет, достигает максимального значения и сохраняет его до конца эксперимента ($t \leq 120$ мин). Таким образом, значительная часть дитерпеновых кислот (~2.1% от массы навески) выделяется в кипящий растворитель практически мгновенно, существенного увеличения выхода целевых веществ за приемлемое время добиться не удалось.

Полученные результаты можно объяснить как сорбцией целевых соединений, приводящей с течением времени к выравниванию химических потенциалов экстрагируемых веществ в сырье и в растворе, так и насыщением раствора этими соединениями. Однако данные рис. 4а свидетель-

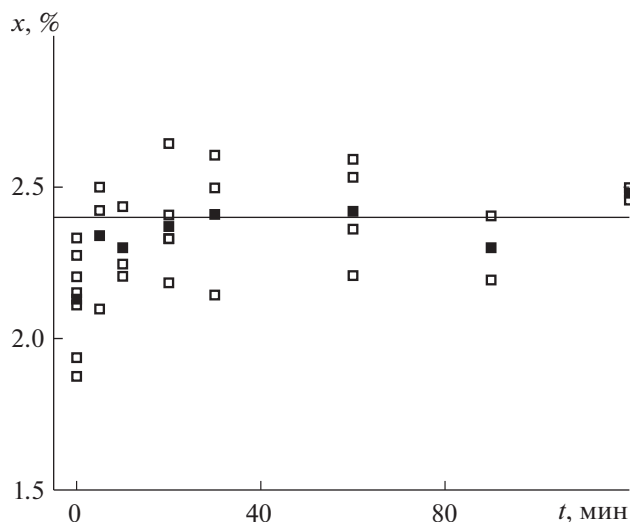


Рис. 3. Зависимость извлечения дитерпеновых кислот от времени экстракции при значении $L = 1 : 100$. (\square) – экспериментальные данные, (\blacksquare) – средние значения для заданного времени, сплошной линией отмечено значение $x = 2.4\%$ – среднее по всем экспериментам ($20 \leq t \leq 120$ мин).

ствуют о том, что насыщение раствора в исследованном диапазоне значений L не достигается. Таким образом, главным механизмом является сорбция, влияние которой отмечено также в работах [14, 15].

Влияние сорбции заключается в том, что постепенно устанавливается равновесие между раствором и измельченным сырьем с точки зрения концентрации экстрагируемых веществ. Последние, с одной стороны, связаны с развитой внутренней поверхностью сырья, а с другой – стремятся перейти в растворитель. Интенсивность этого перехода определяется химическим сродством растворителя и целевой группы соединений, а также концентрацией раствора. На начальном этапе эксперимента сила взаимодействия веществ с сырьем значительно меньше растворяющей способности раствора с низкой концентрацией. Это приводит к выделению веществ в раствор, его концентрация увеличивается, а растворяющая способность растворителя падает. В то же время разность химических потенциалов целевых соединений в растворе и сырье стремится к нулю. Момент выравнивания химических потенциалов соответствует наступлению равновесия, и процессы растворения прекращаются. Для более полного извлечения веществ необходимо использовать новую порцию чистого растворителя.

Многokратная экстракция. Одну и ту же навеску сырья экстрагировали три раза при фиксированном соотношении L в течение 20 мин. Результаты представлены на рис. 4. Четвертый столбец на рис. 4б соответствует сумме значений x , полученных в результате трехкратной экстракции (сум-

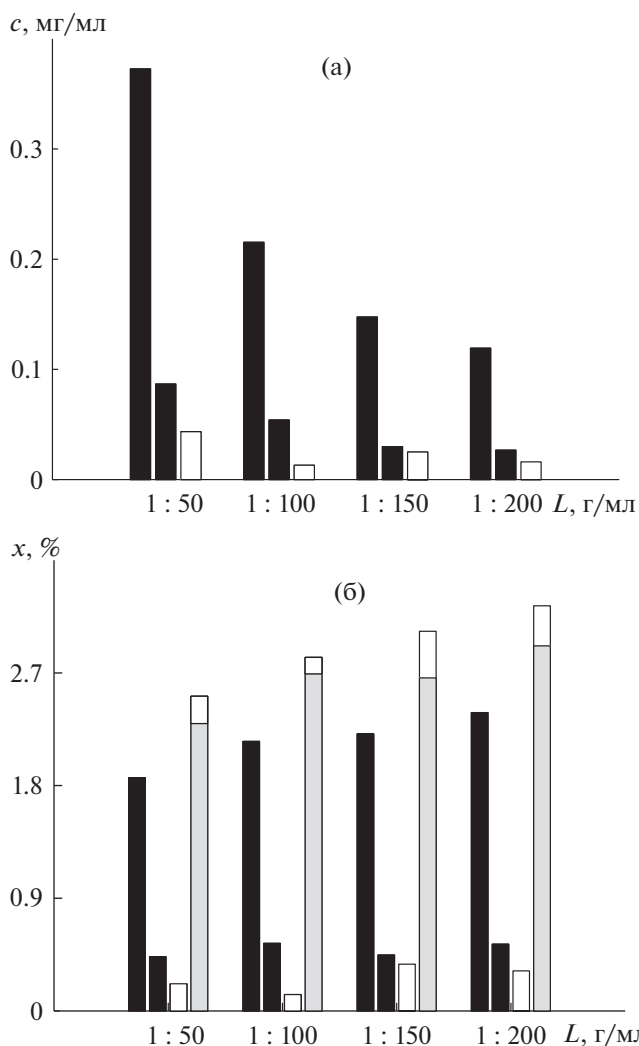


Рис. 4. Зависимость концентрации (а) и содержания (%) (б) дитерпеновых кислот в экстракте, извлеченных трехкратной экстракцией петролейным эфиром 40/70, от соотношения массы навески к объему растворителя. Черные столбцы – результаты первых двух последовательных экстракций, белые столбцы – извлечение за третью экстракцию, серые столбцы – суммарное извлечение за первые две экстракции (продолжительность каждой экстракции 20 мин).

марное извлечение). Анализ измеренных значений оптической плотности A показал, что в исследуемых условиях, начиная с соотношения $1 : 150$, возможна высокая погрешность показаний прибора, особенно после второй экстракции, что может значительно исказить суммарный результат. Результаты третьей экстракции, а также их вклад в суммарный выход, отмечены на рис. 4 белым цветом. С точки зрения полноты извлечения и достоверности результатов оптимальна двукратная экстракция при отношении массы навески к объему растворителя $1 : 200$, для которой суммарное извлечение составило $x = 2.94\%$.

Результаты определения дитерпеновых кислот в различных образцах листьев шалфея лекарственного ($n = 10$, $P = 0.95$)

Образец	Найдено, %
Ботанический сад (2013 г.)	3.6 ± 0.1
Ботанический сад (2012 г.)	3.02 ± 0.09
ОАО "Красногорсклексредства" (серия 141108)	3.00 ± 0.07
ЗАО "Ст-Медифарм" (серия 050410)	2.94 ± 0.07
ООО "Фитобот" (серия 11209)	2.81 ± 0.07
ЗАО "Здоровье" (серия 060708)	2.20 ± 0.06
ООО "Фитофарм" (серия 061109)	2.10 ± 0.06

Методика количественного определения суммы дитерпеновых кислот в листьях шалфея лекарственного. Пробу сырья измельчают до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0.25 мм. Около 1 г (точная навеска) помещают в колбу емк. 500.0 мл, заливают 200.0 мл петролейного эфира 40/70 и экстрагируют в кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения раствор фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу емк. 500.0 мл. Процедуру экстракции повторяют второй раз в том же режиме. Экстракт фильтруют в ту же мерную колбу емк. 500.0 мл, доводят объем раствора до метки петролейным эфиром 40/70. Измеряют оптическую плотность раствора при 285 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения петролейный эфир 40/70.

Содержание (x , %) суммы дитерпеновых кислот в листьях шалфея в пересчете на карнозоловую кислоту и абсолютно сухое сырье рассчитывают по следующей формуле

$$x = \frac{AV}{E_{1\text{ см}}^{1\%} m 100 - W}, \quad (1)$$

где A – оптическая плотность анализируемого раствора; V – суммарный объем экстракта, мл (в предлагаемой методике 500 мл); $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения карнозоловой кислоты при 285 нм в петролейном эфире 40/70, равный 40.92; m – масса навески, г; W – потеря массы при высушивании сырья, %.

Ниже представлены метрологические характеристики разработанной методики количествен-

ного определения дитерпеновых кислот в листьях шалфея лекарственного:

f	$x_{\text{ср}}$	s^2	s	P	$t(0.95, 9)$	Δx	ε , %
9	2.94	0.0096	0.0979	0.95	2.26	0.07	± 2.38

Полученные результаты укладываются в норму допустимых отклонений для спектрофотометрического метода.

С использованием разработанной методики проанализировали ряд образцов листьев шалфея лекарственного (таблица). Содержание дитерпеновых кислот варьируется в пределах от 2.10 до 3.6% в пересчете на карнозоловую кислоту и абсолютно сухое сырье.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-31-00007 мол_а, а также из средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Авторы благодарны Родионовой Виктории Александровне за помощь в подготовке экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M.* // J. World Aquaculture Soc. 2014. V. 45. № 5. P. 545.
2. *Mattazi N., Farah A., Fadil M., Chraibi M., Benbrahim K.F.* // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2015. V. 7. № 9. P. 73.
3. *Крышень К.Л., Гусева С.И., Тесакова С.В., Ацапкина А.А.* // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8. № 4. С. 67.
4. Справочник Видаль 2015. Лекарственные препараты в России. <http://www.vidal.ru> (21.01.2017).
5. *Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N.* // J. Agr. Food Chem. 2002. V. 50. № 7. P. 1845.
6. *Bors W., Michel C., Stettmaier K., Lu Y., Foo L.Y.* // Biol. Res. 2004. V. 37. № 2. P. 1099.
7. *Алимхожаева Н.З.* Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Львов, 1974. 17 с.
8. Государственная Фармакопея РФ. Т. 3. 13-е изд. М.: МЗ РФ, 2015. С. 737. [Электронный ресурс]. <http://www.femb.ru/feml> (21.01.2016).
9. *Зилфикаров И.Н., Жилин А.В.* // Фармация. 2007. № 2. С. 7.
10. *Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A.* // Free Radic. Res. 2006. V. 40. № 2. P. 223.
11. *Al-Bayati F.A.* // Tikrit J. Pure Sci. 2011. V. 16. № 4. P. 6.
12. *Thorsen M.A., Hildebrandt K.S.* // J. Chromatogr. A. 2003. V. 995. № 1–2. P. 119.
13. *Lu Y., Foo L.Y.* // Phytochemistry. 2002. V. 59. № 2. P. 117.
14. *Саламатин А.А., Хазиев Р.Ш., Макарова А.С., Иванова С.А.* // Теорет. основы хим. технол. 2015. Т. 49. № 2. С. 200. (*Salamatin A.A., Khaziev R.Sh., Makarova A.S., Ivanova S.A.* // Theor. Found. Chem. Eng. 2015. V. 49. № 2. P. 200.)
15. *Bucic-Kojic A., Sovova H., Planinic M., Tomas S.* // Food Chem. 2013. V. 136. № 3–4. P. 1136.