УДК 547.9:615.32 © Е.В. Звездина, О.П. Шейченко, 2019 https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-02

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО (DRACOCEPHALUM MOLDAVICA L.)

Е.В. Звездина

аспирант, ст. науч. сотрудник, отдел фитохимии,

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

О.П. Шейченко

к.х.н., зав. отделом фитохимии,

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

E-mail: vilarnii.sheychenko@mail.ru

Представлены результаты по разработке методик подтверждения подлинности змееголовника молдавского - перспективного сырья для создания новых лекарственных средств, с помощью качественной реакции и метода тонкослойной хроматографии. Подобраны условия и разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве змееголовника молдавского методом прямой спектрофотометрии. Проведена валидация разработанной методики.

Ключевые слова: трава змееголовника молдавского, фенольные соединения, розмариновая кислота, спектрофотометрия, валидация.

Для цитирования: Звездина Е.В., Шейченко О.П. Исследования по стандартизации травы змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(4):7–12. https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-02

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) – травянистое растение 0,5–2 м высотой, относящееся к семейству яснотковые (Lamiaceae), произрастающее в диком виде на территории Евразии (Египет, Китай, Центральная Азия, Монголия и Гималаи) и культивируемое в Восточной и Центральной Европе (Россия, Болгария, Румыния, Молдавия, Украина, Белоруссия) как эфиромасличное, медоносное и пряноароматическое растение [1]. В ФГБНУ ВИЛАР разработана агротехнология его выращивания и создан сорт «Нежность» [2, 3]

Согласно данным литературы, змееголовник молдавский, наряду с другими видами данного рода, с древних времен используется в традиционной медицине Китая при лечении заболеваний сердца (тахикардия, ишемическая болезнь сердца) артериальной гипертензии, трахеитов, атеросклероза, невралгии [4]. Проведенные фармакологические исследования показали, что экстракты травы змееголовника молдавского обладают кардиозащитной и нейротропной активностями [5–7, 9, 10].

Учеными разных стран определено, что экстракты из травы змееголовника молдавского содержат различные классы соединений, в том числе флавоноиды, флавоноидные гликозиды, лигнаны, тритерпеноиды, кумарины и фенилпропаноиды

[7–9]. Неотъемлемым этапом создания лекарственного препарата является стандартизация растительного сырья.

Цель работы – подбор оптимальных условий методик подтверждения подлинности и количественного определения суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы высушенной травы змееголовника молдавского, заготовленные на территориях Ботанического сада, Средне-Волжского и Северо-Кавказского филиалов ФГБНУ ВИЛАР в 2016—2018 гг.

С целью характеристики подлинности данного сырья использовали реакцию с 3%-ным раствором железа хлорида для определения фенольных соединений. Розмариновую кислоту определяли хроматографированием в тонком слое сорбента (ТСХ). В качестве неподвижной фазы применяли пластинки Sorbfil ПТСХ-ПА размером 10×15. Хроматографирование осуществляли восходящим способом в системе растворителей этилацетат – уксусная кислота – вода (40:5:5). В экспериментах использован стандартный образец (СО) розмариновой кислоты («Sigma Aldrich», кат. №536954-5G). УФ-спектры

поглощения снимали на спектрофотометрах UV-1800 («Shimadsu»), Cary 100Scan («Varian»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении качественной реакции появление черно-зеленого окрашивания свидетельствует о присутствии фенольных соединений.

Для подтверждения наличия розмариновой кислоты в траве змееголовника молдавского предложена методика ТСХ-анализа и подобраны оптимальные условия её выполнения:

аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. В колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г измельченного сырья, прибавляют 40 мл спирта этилового 50% и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение пропускают через складчатый фильтр «синяя лента» в коническую колбу вместимостью 100 мл.

На стартовую линию, отступив на 1 см от края хроматографической пластинки, наносят 20 мкл извлечения длиной 20 мм и шириной 2–5 мм и рядом наносят 5 мкл 0,1%-ного стандартного образца розмариновой кислоты в спирте этиловом 50%-ном. Пластинку помещают в вертикальную хроматографическую камеру, которую предвари-

тельно насыщают в течение 2 ч при комнатной температуре смесью растворителей, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей проходит 12 см, пластинку вынимают из камеры, оставляют под вытяжным шкафом до удаления запаха растворителей. Затем пластинку обрабатывают 10%-ным раствором хлорида алюминия в спирте этиловом 96%-ном и прогревают в течение 2-3 мин при температуре 105 °C. Пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции бирюзовой (1) флюоресценции с R_f около 0,82, аналогичная зоне адсорбции СО розмариновой кислоты. Также имеется наличие других зон адсорбции: светло-желтая (2) флюоресценция с R_f приблизительно 0,35, 0,51, 0,64; ярко-желтая (3) флюоресценция с бурыми вкраплениями (нижняя зона) с R_f примерно 0,25 (рис. 1), указывающая на наличие фенольных соединений.

При разработке методики количественного определения суммы фенольных соединений был изучен УФ-спектр водно-спиртового извлечения из травы змееголовника молдавского. Согласно полученным данным, в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм наблюдается два максимума поглощения: при 327±2 и 279±2 нм. Аналогичный максимум поглощения при 327±2 нм имеет раствор СО розмариновой кислоты (рис. 2).

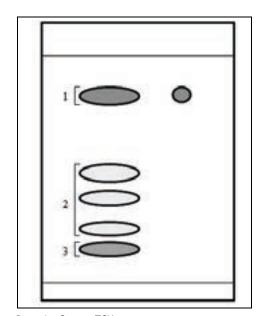


Рис. 1. Схема ТСХ-хроматограммы спиртового извлечения из травы змееголовника молдавского и раствора СО розмариновой кислоты

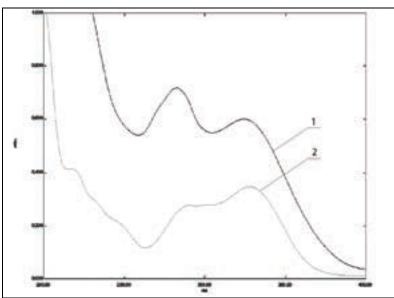


Рис. 2. Спектр поглощения спиртового извлечения из травы змееголовника молдавского (1) и раствора СО розмариновой кислоты (2)

Полученный результат позволяет проводить количественное определение суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского в пересчете на розмариновую кислоту.

В процессе исследования были подобраны оптимальные условия для проведения экстрагирования и количественного определения фенольных соединений в траве змееголовника молдавского, которые указаны в табл. 1. Установлено, что максимальный выход изучаемой группы биологически активных веществ достигается при нагревании на кипящей водяной бане, где экстрагентом является спирт этиловый 50%-ный.

На основании подобранных условий (табл.1), экстрагирование из 1 г (точная навеска) сырья целесообразно проводить 100 мл спирта этилового 50%-ного при измельчении сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, в течение 1 ч.

Таблица 1. Содержание фенольных соединений в зависимости от исследуемых параметров

Параметр	Содержание фенольных соединений, %	
Концентрация,	40	6,09±0,12
используемого спирта этилового, %	50	6,81±0,13
,	70	6,16±0,12
Соотношение	1:50	3,48±0,07
сырье: экстрагент	1:150	7,23±0,14
	1:200	6,98±0,14
Степень измельчения, мм	0,5	7,11±0,14
	1	6,81±0,13
	2	6,08±0,12
Время, мин	30	7,01±0,14
	60	7,11±0,14
	90	7,23±0,14
	120	7,36±0,15

Таким образом, подобранные условия позволили разработать методику количественного определения суммы фенольных соединений:

аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия размером 0,5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл и добавляют 100 мл спирта этилового 50%-ного, взве-

шивают с точностью до 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят растворителем до первоначальной массы, перемешивают. Извлечение пропускают через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» (раствор A).

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл раствора А и доводят объем раствора спиртом этиловым 50%-ным до метки, перемешивают (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%-ный.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора CO розмариновой кислоты.

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

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

$$\begin{split} &X\% = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot \left(100 - W\right) \cdot A_0 \cdot 100 \cdot 25} = \\ &= \frac{A \cdot a_0 \cdot 40000}{A_0 \cdot a \cdot \left(100 - W\right)}, \end{split}$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность СО розмариновой кислоты; a — масса навески травы змееголовника молдавского, Γ ; a_0 — масса навески СО розмариновой кислоты, Γ ; W — потеря в массе при высушивании травы змееголовника молдавского, %.

Валидация методики проведена по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность: сходимость и воспроизводимость.

Специфичность методики характеризовали совпадением максимумов поглощения спиртового извлечения из травы змееголовника молдавского и

раствора CO розмариновой кислоты при длине волны 327±2 нм.

Определение линейности проводилось на семи уровнях концентраций СО розмариновой кислоты в диапазоне 2,3–10,5 мгк/мл (рис. 3). По ре-

зультатам 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).

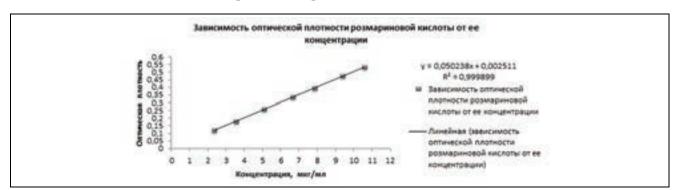


Рис. 3. График зависимости оптической плотности розмариновой кислоты от её концентрации

Таблица	2.	Контроль п	равильности	метолики
Iaviiiua	4.	ΙΝΟΠΙΙΟΟΙΙΟ ΙΙ	vabnilbnocin	МСІОДИКИ

№ п/п	Найдено, мг	Добавлено СО, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Абсолютная ошибка, мг	Выход, %
1.1	0,692	0,103	0,795	0,799	-0,004	100,50
2.1	0,692	0,309	1,001	1,032	-0,031	103,09
3.1	0,692	0,515	1,207	1,248	-0,041	103,39
1.2	0,731	0,103	0,834	0,845	-0,011	101,31
2.2	0,731	0,309	1,039	1,064	-0,025	102,40
3.2	0,731	0,515	1,246	1,290	-0,044	103,53
1.3	0,749	0,103	0,852	0,845	0,007	99,17
2.3	0,749	0,309	1,058	1,060	-0,002	100,18
3.3	0,749	0,515	1,264	1,272	-0,008	100,63
	Среднее значение выхода, %		101,57			

Контроль правильности методики выполнялся на модельных смесях трех концентраций с содержанием СО розмариновой кислоты 25, 50, 75% к ее исходной концентрации в спиртовом извлечении из сырья змееголовника молдавского (табл. 2).

В разработанной методике процент восстановления (выход) находится в пределах от 99,17 до 103,50%, что отвечает требованиям критерия приемлемости (от 95 до 105%).

Для установления сходимости провели шесть параллельных определений на основании результатов, которых вычислили величину стандартного отклонения (S=0,144), относительной вероятной погрешности отдельного измерения (\pm 1,99%) и коэффициента вариации. Значение коэффициента вариации 1,99% (критерий приемлемости не более

5%), что свидетельствует о прецизионности методики по сходимости.

Внутрилабораторную воспроизводимость определяли два аналитика на шести повторностях образца сырья змееголовника молдавского травы каждый, приготовленных независимо друг от друга в течение двух дней

Полученные значения коэффициента вариации не превышают 2%, различия между результатами сотрудников статистически незначимы ($F_{\text{факт.}} < F_{\text{табл.}}$), что позволяет считать внутрилабораторную прецизионность результатов приемлемой.

По разработанной методике определено содержание фенольных соединений в зависимости от мест произрастания и фазы вегетации (табл. 3). Наибольшее содержание фенольных соединений определено в сорте «Нежность».

Таблица 3. Содержание фенольных соединений в траве змееголовника молдавского в зависимости от места произрастания и фазы вегетации

Место произрастания	Фаза вегетации	Содержание фенольных соединений, в пересчете на розмариновую кислоту, %
Средне-Волжский филиал ВИЛАР	Фаза бутонизации	6,05±0,31
	Фаза цветения	7,22±0,36
Северо-Кавказский филиал ВИЛАР	Фаза бутонизации	4,95±0,26
	Фаза цветения	5,81±0,28
Китай	Фаза цветения	6,17±0,32
Московская область (сорт «Нежность»)	Фаза бутонизации	11,03±0,56
	Фаза цветения	10,89±0,56

На основании полученных данных можно заключить, что сырье рациональнее заготавливать в фазу цветения, а также определить ориентировочную норму содержания фенольных соединений в сырье – не менее 5,5%.

ВЫВОДЫ

- 1. Предложены методики подтверждения подлинности травы змееголовника молдавского с помощью качественной реакции TCX со стандартным образцом розмариновой кислоты.
- 2. Подобраны оптимальные условия анализа и разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве змееголовника молдавского, которая оценена положительно по параметрам: специфичность, линейность, правильность, сходимость, внутрилабораторная прецизионность. Данная методика может быть включена в проект нормативной документации на новый вид лекарственного сырья змееголовник молдавский трава.

ЛИТЕРАТУРА

- Попова О.И., Никитина А. С. Змееголовник молдавский и иссоп лекарственный: современный взгляд на растения. Волгоград: Издательство ВолгГМУ. 2014. 224 с.
- 2. Патент №9895, 8260990 (РФ). Змееголовник молдавский Dracocephalum moldavica L. Сорт «Нежность» / Л.В. Бабаенко, В.В. Воробьев, М.Ю. Грязнов, О.М. Савченко, C.А. Тоцкая, Ф.М. Хазиева.
- Тоцкая С.А., Грязнов М.Ю. Некоторые особенности выращивания нового сорта змееголовника молдавского селекции ФГБНУ ВИЛАР // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018. № 9. С. 43–47.

- 4. Sultan A., Bahang H.A., Aisa A., Eshbakova K.A. Flavonoids from Dracocephalum moldavica // Chemistry of Natural Compounds. 2008.V. 44. P. 366–367.
- 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. V. 14. P. 74–82.
- Najafi M., Ghasemian E., Fathiazad F., Garjani A. Effects of Total Extract of Dracocephalum moldavica on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in the Isolated Rat Heart // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2009. V. 11. № 4.P. 229–235.
- Martínez-Vàzquez M., Estrada-Reyes R., Martínez-Laurrabaquio A., López-Rubalcava C., Heinze G. Neuropharmacological study of Dracocephalum moldavica L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract // Journal of Ethnopharmacology. 2012. V. 141. P. 908–917.
- 8. *Gu H.F., Chen R.Y., Sun Y.H., Lui F.* Studies on chemical constituents from herb of *Dracocephalum moldavica* L. // China Journal of Chinese MateriaMedica.2004.V. 29. P. 232–234.
- 9. 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. V. 34. P. 57.
- Бойко В.П., Омельницкий П.П. Нейротропная активность змееголовника молдавского // Тезисы докладов науч. конф. «Решение актуальных задач фармации на современном этапе». 1994. С. 280–281.
- 11. 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. V. 7. P.1911–1929.
- Dastmalchi K., Dorman D., Kosarb M., Hilttunen R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble Moldavican balm (Dracocephalum moldavica L.) extract // LWT Food Science and Technology.2007. V. 40. P. 1655–1663.

Поступила 5 февраля 2019 г.

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF PENOLIC COMPOUNDS IN HERB MOLDAVIAN DRACONHEAD (DRACOCEPHALUM MOLDAVICA L.)

© E.V. Zvezdina, O.P. Sheichenko, 2019

E.V. Zvezdina

Post-graduate Student, Senior Researcher, Phytochemistry Department,

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

O.P. Sheichenko

Ph.D. (Chem.), Head of Phytochemistry Department,

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: vilarnii.sheychenko@mail.ru

The purpose of the work is selection of optimal conditions for methods of authenticating and quantifying the amount of phenolic compounds in the herb of the moldavian draconhead (*Dracocephalum moldavica* L.)

Material and methods. The objects of the study were samples of the dried above-ground part of the Dracocephalum moldavica L., harvested in the Botanical Garden, the Middle Volga and North Caucasus branches of All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants from 2016-2018.

To characterize authenticity of this raw material, a sensitive reaction with 3% solution of iron chloride was used for determine action of phenolic compounds. To determine rosmarinic acid, thin layer chromatography on sorbent (TLC) was used. Sorbfil PTSH-PA plates measuring 10×15 were used as the stationary phase. Chromatography was carried out in an ascending fashion using an ethyl acetate – acetic acid – water solvent system (40: 5: 5). In experiments were used standard sample (CO) of rosmarinic acid (Sigma Aldrich, cat. No. 536954-5G). UV absorption spectra were recorded on spectrophotometers UV-1800 (Shimadsu), Cary 100 Scan (Varian).

Results and conclusions. *Dracocephalum moldavica* L. is prospective source for production of new medicinal remedies. Results of the methods of their products are worked out in order to worked out of their identity using novel quality tests and TLC. There was found condition and there was worked out methods of qualitative determination of the total phenolic compounds calculated on rosmarinic acids in *Dracocephalum moldavica* L. herb using direct spectrophotometric method and their validation was carried out according to the following indicators: specificity, linearity, correctness, intralaboratory precision: convergence and reproducibility.

Key words: Dracocephalum moldavica L. herb, phenolic compounds, rosmarinic acid, spectrophotometry, validation.

For citation: Zvezdina E.V., Sheichenko O.P. Development of the method of quantitative analysis of penolic compounds in herb moldavian draconhead (*Dracocephalum moldavica* L.). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019; 22(4):7–12. https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-02

REFERENCES

- Popova O.I., Nikitina A.S. Zmeegolovnik moldavskij i issop lekarstvennyj: sovremennyj vzglyad na rasteniya. Volgograd: Izdatel'stvo VolgGMU. 2014. 224 s.
- Patent №9895, 8260990 (RF). Zmeegolovnik moldavskij Dracocephalum moldavica L. Cort «Nezhnost'» / L.V. Babaenko, V.V. Vorob'ev, M.Yu. Gryaznov, O.M. Savchenko, S.A. Tockaya, F.M. Hazieva.
- 3. Tockaya S.A., Gryaznov M.Yu. Nekotorye osobennosti vyrashchivaniya novogo sorta zmeegolovnika moldavskogos elekcii FGBNU VILAR // Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2018. № 9. S. 43–47.
- 4. Sultan A., Bahang H.A., Aisa A., Eshbakova K.A. Flavonoids from Dracocephalum moldavica // Chemistry of Natural Compounds. 2008. V. 44. P. 366–367.
- 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. V. 14. P. 74

 –82.
- 6. Najafi M., Ghasemian E., Fathiazad F., Garjani A. Effects of Total Extract of Dracocephalum moldavica on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in the Isolated Rat Heart // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2009. V. 11. № 4. P. 229–235.
- 7. Martínez-Vàzquez M., Estrada-Reyes R., Martínez-Laurrabaquio A., López-Rubalcava C., Heinze G. Neuropharmacological study of Dracocephalum moldavica L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract // Journal of Ethnopharmacology. 2012. V. 141. P. 908–917.
- 8. Gu H.F., Chen R.Y., Sun Y.H., Lui F. Studies on chemical constituents from herb of Dracocephalum moldavica L. // China Journal of Chinese Materia Medica. 2004. V. 29. P. 232–234.
- 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. V. 34. P. 57.
- 10. Bojko V.P., Omel'nickij P.P. Nejrotropnaya aktivnost' zmeegolovnika moldavskogo // Tezisy dokladov nauch. konf. «Reshenie aktual'nyh zadach farmacii nasovremennom ehtape». 1994. S. 280–281.
- 11. 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. V. 7. P. 1911–1929.
- 12. Dastmalchi K., Dorman D., Kosarb M., Hilttunen R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble Moldavican balm (Dracocephalum moldavica L.) extract // LWT Food Science and Technology. 2007. V. 40. P. 1655–1663.