СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ В КОРНЕВИЩАХ И КОРНЯХ МАРЕНЫ КРАСИЛЬНОЙ

М.В. Рыбалко, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург

Для цитирования: Рыбалко М.В., Шмыгарева А.А., Саньков А.Н. Совершенствование методики количественного определения антраценпроизводных в корневищах и корнях марены красильной // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 5–6. – С. 143–147. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.143-147>

Поступила: 10.06.2019

Одобрена: 20.08.2019

Принята: 09.09.2019

■ В настоящей работе обсуждаются актуальные аспекты совершенствования методики стандартизации лекарственного растительного сырья марены красильной (*Rubia tinctorum* L.). Предложены новые подходы к количественному анализу корневищ и корней марены красильной, заключающиеся в использовании метода спектрофотометрии при аналитической длине волны 520 нм и использовании ультразвука для максимального выхода антраценпроизводных из сырья. В настоящее время в основе технологии извлечения лекарственных веществ из тканей животных и растений применяется чаще всего малоэффективный и длительный процесс экстрагирования. Низкочастотный ультразвук в десятки и сотни раз сокращает время экстракции. Во время прохождения ультразвука через молекулу ее легкая часть будет колебаться в резонансе с частотой волны, а тяжелая часть станет отставать. В результате возникнут зоны напряженности, значительные силы трения, превосходящие силы химической связи, произойдет разрыв цельной молекулы вещества. Данная тема, на сегодняшний день актуальна, так как развитие и применение ультразвуковых технологий открывает в настоящее время новые перспективы. С использованием усовершенствованной методики нами установлено, что содержание суммы антраценпроизводных в образцах лекарственного растительного сырья марены красильной варьирует от 4,20 до 4,60 % (в пересчете на руберитриновую кислоту). Результаты свидетельствуют о максимальном выходе антраценпроизводных из лекарственного растительного сырья марены красильной и о целесообразности дальнейших исследований в области разработки новых препаратов.

■ **Ключевые слова:** марена красильная (*Rubia tinctorum* L.); корневище с корнями; антраценпроизводные; руберитриновая кислота; стандартизация; спектрофотометрия.

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTHRACEN DERIVATIVES IN RHIZOMES AND ROOTS OF *RUBIA TINCTORUM*

M.V. Rybalko, A.A. Shmygareva, A.N. Sankov

Orenburg State Medical Academy, Orenburg, Russia

For citation: Rybalko MV, Shmygareva AA, Sankov AN. Development of the method of quantitative determination of anthracen derivatives in rhizomes and roots of *Rubia tinctorum*. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2019;(5-6):143-147. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.143-147>

Received: 10.06.2019

Revised: 20.08.2019

Accepted: 09.09.2019

■ This paper discusses the current methods to improve standardization procedure of medicinal plant raw materials of *Rubia tinctorum*. New approaches for quantitative analysis of rhizomes and roots of *Rubia tinctorum* are introduced. They include spectrophotometry at the analytical wavelength of 510 nm and ultrasound. These methods helped to achieve the maximal output of anthracen derivatives from raw materials. At present, existing technology for extracting medicinal substances from animal and plant tissues is mostly inefficient and time-consuming. Low-frequency ultrasound reduces the time of extraction by ten or several hundred folds. During ultrasound transmission through a molecule, its light part oscillates in resonance with the frequency of the wave, and its heavy part lags behind. As a result, areas of tension, considerable friction forces, superior to the forces of chemical bonding appear and the whole substance of the molecule break. Nowadays this topic is relevant because the development and application of ultrasound technique opens up new opportunities. By means of the improved technique, we found that the content of the total of anthracene derivatives in samples of medicinal plant raw materials of *Rubia tinctorum* varies from 4.20% to 4.60% (calculated with reference to ruberythric acid). Our findings indicate the maximum yield of anthracene derivatives from medicinal plant raw materials of *Rubia tinctorum* and the feasibility of further research in the development of new drugs.

■ **Keywords:** *Rubia tinctorum* L.; rhizomes and roots; anthracene derivatives; ruberythric acid; standardization; spectrophotometry.

Введение

Несмотря на бурное развитие производства синтетических лекарственных средств, многие биологически активные вещества получают из лекарственного растительного сырья. Каждый третий лекарственный препарат современной медицины является продуктом растительного происхождения.

Экстрагирование биологически активных веществ — главная и наиболее продолжительная стадия переработки сырья [3, 10]. На большинстве предприятий экстрагирование ведется малоэффективными, трудоемкими и длительными методами. Использование современных интенсивных методов позволяет значительно сократить время процесса, повысить производительность труда.

Одним из перспективных физических методов воздействия на вещества с целью интенсификации технологических процессов является метод, основанный на использовании механических колебаний ультразвукового диапазона. В фармации ультразвук находит применение в экстракции, при растворении, получении эмульсий, суспензий, изготовлении микрогранул, стерилизации и т. д. [1, 8].

Наиболее успешно ультразвуковые колебания используются в процессах, связанных с жидкими состояниями реагентов, поскольку только в них возникает специфический процесс ультразвуковой кавитации, обеспечивающий максимальные энергетические воздействия на различные вещества. Низкочастотный ультразвук в десятки и сотни раз сокращает время экстракции. Во время прохождения ультразвука через молекулу ее легкая часть будет колебаться в резонансе с частотой волны, а тяжелая часть станет отставать. В результате возникнут зоны напряженности, значительные силы трения, превосходящие силы химической связи, произойдет разрыв цельной молекулы вещества [7, 9].

При использовании ультразвука наблюдается, как правило, не только значительное ускорение во времени, но и увеличение по сравнению с другими методами экстрагирования выхода основного вещества. Ультразвуковые волны значительно увеличивают скорость пропитки структурных элементов клетки.

При экстрагировании лекарственного растительного сырья почти всегда приходится иметь дело с высушенным материалом, который необходимо подвергать предварительно замачиванию, для лучшего выхода веществ. В результате использования ультразвука время замачивания сокращается, ультразвук способствует быстрому и более глубокому проникновению экстрагента в клеточные

структуры. Как показывает опыт, ультразвуком из сырья растительного происхождения возможно извлекать практически все известные соединения, продуцируемые растениями [5, 13].

Разрабатывая данную методику количественного определения, учитывались результаты ранее существующей методики, в которой были использованы следующие условия: экстрагент — 80 % спирт, соотношение сырья и экстрагента — 1 : 30, время экстракции — 90 мин на водяной бане. Существенным минусом данной методики является время экстракции, которое составляет 90 мин. В статье представлена модернизированная методика количественного определения, в условиях экстракции ультразвуком, который обеспечивает максимальный выход антраценпроизводных и в значительной степени сокращает продолжительность анализа.

Данный метод может быть использован не только для количественного анализа, но и в целях максимальной экстракции веществ из сырья для изготовления различных лекарственных форм. Так, например, на сегодняшний день количество препаратов из сырья марены красильной невелико и сводится только к сухому экстракту марены красильной в таблетированной форме, хотя корневища и корни марены красильной широко используются в урологии для лечения заболеваний мочевыводящих путей, почек и мочевого пузыря. Марена помогает в борьбе с камнями, разрыхляет их и выводит наружу [2, 6, 12].

Отсутствие разнообразия лекарственных форм сырья марены красильной может быть связано с несовершенным технологическим процессом экстракции доминирующих веществ [4, 11, 14, 15].

Экстракция антраценпроизводных из сырья марены красильной с использованием ультразвука может стать перспективным способом в плане разработки новых лекарственных форм. Данная тема на сегодняшний день актуальна, так как развитие и применение ультразвуковых технологий открывает в настоящее время новые перспективы. Несмотря на все достоинства Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания в ней отсутствуют методики количественного анализа с использованием ультразвука.

Цель исследования — модификация существующей методики количественного определения суммы антраценпроизводных в корневищах и корнях марены красильной с использованием ультразвука и спектрофотометрии.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили корневища и корни марены красильной производства ООО «Славянская здравница», Россия, г. Саранск, 2017 г.; ООО «Ортилия», Россия, г. Новосибирск, 2017 г. Электронные спектры измерялись на УФ-спектрофотометре UNICO 2800.

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее с целью обоснования методических подходов к стандартизации корневищ и корней марены красильной проведено исследование по выделению веществ. Установлено, что доминирующим компонентом является руберитриновая кислота. Исследование УФ-спектров показало, что максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из корневищ и корней марены красильной находится в длинноволновой области спектра при 510 ± 2 нм (рис. 1). В длинноволновой области электронного спектра щелочно-аммиачного раствора руберитриновой кислоты также наблюдается четкий максимум поглощения при 510 ± 2 нм (рис. 2). Следовательно, в качестве аналитической длины волны может быть использовано значение 510 нм, а стандартным образцом может служить доминирующий антрагликозид — руберитриновая кислота, причем в случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения ($E_{1\%}^{1\text{см}}$) — 520.

С целью модернизации методики количественного определения экстракция проводилась при различных соотношениях «сырье – экстрагент», а также варьировалось время экстракции на водяной бане и время воздействия ультразвука (табл. 1). При модификации методики количественного определения суммы антраценпроизводных в корневищах с корнями марены красильной выявлены оптимальные условия экстракции антраценпроизводных: экстрагент — 80 % спирт этиловый; соотношение «сырье – экстрагент» — 1 : 30; время экстракции — 10 мин на водяной бане при температуре 80–90 °С, 15 мин — экстракция при воздействии ультразвука.

Методика определения

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью

Рис. 1. Электронные спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора (2) водно-спиртового извлечения из корневищ и корней марены красильной

Fig. 1. Electronic spectra of initial solution (1) and alkaline ammonia solution (2) of water-alcohol extraction from the rhizomes and roots of *Rubia tinctorum* L.

Рис. 2. Электронный спектр раствора руберитриновой кислоты

Fig. 2. The electronic spectrum of the solution of rube-rythric acid

Таблица 1 / Table 1

Влияние различных факторов на полноту извлечения антраценпроизводных из корневищ и корней марены красильной
The influence of various factors on the rate of the extraction of anthracene derivatives from the rhizomes and roots of *Rubia tinctorum* L.

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение «сырье : экстрагент»	Время экстракции, мин	Содержание суммы антраценпроизводных, %
80	1 : 30	5 мин воздействия ультразвука	2,28 ± 0,02
80	1 : 30	10 мин воздействия ультразвука	2,62 ± 0,02
80	1 : 30	15 мин воздействия ультразвука	3,26 ± 0,03
80	1 : 30	30 мин воздействия ультразвука	3,36 ± 0,03
80	1 : 30	10 мин водяной бани, 15 мин воздействия ультразвука	4,55 ± 0,04
80	1 : 50	10 мин водяной бани, 15 мин воздействия ультразвука	4,2 ± 0,04
80	1 : 30	90 мин водяной бани	3,92 ± 0,03

Таблица 2 / Table 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в сырье марены красильной

Metrological characteristics of the method of quantitative determination of the amount of anthracene derivatives in the raw material of *Rubia tinctorum* L.

<i>f</i>	$\bar{X}$	<i>S</i>	<i>P</i> , %	<i>t</i> (<i>P</i> , <i>f</i>)	ΔX	<i>E</i> , %
10	4,55	0,07071	95	2,25	± 0,1576	± 3,46

100 мл, прибавляют 30 мл 80 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой, взвешивают с точностью до ± 0,01, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 10 либо 90 мин. Затем в течение 15 мин проводят экстракцию при воздействии ультразвука, после чего взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («красная» полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 0,5 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки щелочно-аммиачным раствором, приготовленным в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи СССР XI издания. После охлаждения измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 510 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 0,5 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки. Содержание антраценпроизводных рассчитывают по формуле

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 30 \cdot 100}{m \cdot 520 \cdot (100 - W) \cdot 0,5},$$

где *D* — оптическая плотность испытуемого раствора; *m* — масса сырья, г; 520 — удель-

ный показатель превращения руберитриновой кислоты; *W* — потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в сырье марены красильной представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют, что ошибка единичного определения суммы антраценпроизводных в сырье марены красильной составляет ± 3,46 %.

Выводы

Разработана модификация спектрофотометрической методики количественного определения суммы антраценпроизводных в корневищах и корнях марены красильной с использованием экстракции ультразвуком. Максимальное содержание антраценпроизводных (4,55 %) достигается сочетанием экстракции на водяной бане и экстракции ультразвуком. Данная методика позволяет получить высокое содержание антраценпроизводных с минимально затраченным временем исследования, по сравнению с ранее предложенной методикой экстракции на водяной бане в течение 90 мин.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Акопьян В.Б., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами / Под ред. С.И. Шукина. – М.: МГТУ им. Баумана, 2005. – 222 с. [Akopyan VB, Ershov YuA. Osnovy vzaimodeystviya ul'trazvuka s biologicheskimi ob'yektami. Ed by S.I. Shchukin. Moscow: Bauman Moscow state technical University; 2005. 222 p. (In Russ.)]
2. Куркин В.А., Шмыгарева А.А., Саньков А.Н. Антраценпроизводные фармакопейных растений. – Самара: Офорт, 2016. – 208 с. [Kurkin VA, Shmygareva AA, San'kov AN. Antratsenproizvodnyye farmakopeynykh rasteniy. Samara: Ofort; 2016. 210 p. (In Russ.)]
3. Брух М.М., Казарновский Л.С., Каравай Н.Я., и др. Получение лекарственных препаратов из растительного и животного сырья под действием ультразвука // Ультразвук в физиологии и медицине. Т. 1. – Ростов-на-Дону, 1972. – С. 115–116. [Bruxh MM, Kazarnovskiy LS, Karavay NYa, et al. Polucheniye lekarstvennykh preparatov iz rastitel'nogo i zhivotnogo syr'ya pod deystviyem ul'trazvuka. In: Ul'trazvuk v fiziologii i meditsine. Vol. 1. Rostov-on-Don; 1972. Pp. 115–116. (In Russ.)]
4. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. МЗ СССР. 11-е изд. Вып. 2. – М.: Медицина, 1990. – 400 с. [Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. Obshchiye metody analiza. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye. MZ SSSR. 11th ed. Issue 2. Moscow: Meditsina; 1990. 400 p. (In Russ.)]
5. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: Офорт, 2007. – 1239 с. [Kurkin VA. Farmakognosiya: uchebnik dlya studentov farmatsevticheskikh vuzov (fakul'tetov). 2nd revised and updated. Samara: Ofort; 2007. 1239 p. (In Russ.)]
6. Куркин В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: Офорт, 2009. – 963 с. [Kurkin VA. Osnovy fitoterapii: uchebnoye posobiye dlya studentov farmatsevticheskikh vuzov. Samara: Ofort; 2009. 963 p. (In Russ.)]
7. Белодубровская Г.А., и др. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: учеб. пособие / Под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб.: СпецЛит, 2004. – 765 с. [Belodubrovskaya GA, et al. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye. Farmakognosiya: ucheb. posobiye. Ed by G.P. Yakovlev, K.F. Blinova. Saint Petersburg: SpecLit; 2004. 765 p. (In Russ.)]
8. Молчанов Г.И. Ультразвук в фармации. – М.: Медицина, 1980. – 176 с. [Molchanov GI. Ul'trazvuk v farmacii. Moscow: Meditsina; 1980. 176 p. (In Russ.)]
9. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 2002. – 656 с. [Murav'eva DA, Samylina IA, Yakovlev GP. Farmakognosiya. Moscow: Meditsina; 2002. 656 p. (In Russ.)]
10. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. – М.: Медицина, 1976. – 204 с. [Ponomarev VD. Ekstragirovanie lekarstvennogo syr'ya. Moscow: Meditsina; 1976. 204 p. (In Russ.)]
11. Правдивцева О.Е., Куркин В.А., Авдеева Е.В., и др. Актуальные вопросы стандартизации антраценсодержащих видов лекарственного растительного сырья, включенных в государственную фармакопею Российской Федерации // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 12-2. – С. 272–276. [Pravdivceva OE, Kurkin VA, Avdeeva EV, et al. The actual queschens of anthracencontaining plant medicinal drugs, including in the state pharmacopoeia of Russian Federation. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016;(12-2):272–276. (In Russ.)]
12. Соколов С.Я. Фитотерапия и фармакология. – М.: Мед. информ. агентство, 2000. – 976 с. [Sokolov SYa. Fitoterapiya i farmakologiya. Moscow: Med. inform. agentstvo; 2000. 976 p. (In Russ.)]
13. Тихонов В.Н., Калинкина Г.И., Сальникова Е.Н. Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты / Под ред. С.Е. Дмитрука. – Томск: СибГМУ, 2004. – 264 с. [Tihonov VN, Kalinkina GI, Sal'nikova EN. Lekarstvennye rasteniya, syr'e i fitopreparaty. Ed by S.E. Dmitruk. Tomsk: Siberian state medical University; 2004. 264 p. (In Russ.)]
14. Shmygareva AA, Kurkin VA, San'kov AN. Quantitative determination of total anthracene derivaties in rubia syrup preparation. *Int J Pharmacognos Phytochem Res*. 2016;8(2):332–334.
15. Shmygareva AA. The development of new approaches of standardization of Rubia tinctorum rhizomata et radices. *Int J Pharmacognos Phytochem Res*. 2016;8(3):415–418.

■ Информация об авторах

Майя Викторовна Рыбалко — ассистент кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург. E-mail: majya.rybalko@yandex.ru.

Анна Анатольевна Шмыгарева — доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург. E-mail: a.shmygareva@mail.ru.

Анатолий Николаевич Саньков — кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург. E-mail: a.n.sankov@mail.ru.

■ Information about the authors

Majya V. Rybalko — Assistant of the Department of Management and Economics of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Pharmacognosy, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia. E-mail: majya.rybalko@yandex.ru.

Anna A. Shmygareva — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Management and Economics of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Pharmacognosy, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia. E-mail: a.shmygareva@mail.ru.

Anatoly N. Sankov — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Management and Economics of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Pharmacognosy, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia. E-mail: a.n.sankov@mail.ru.