

**РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИКИ
ХРОМАТОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЕРНИАРИНА И УМБЕЛЛИФЕРОНА
В ТРАВЕ ГРЫЖНИКА МНОГОБРАЧНОГО**

Е.В.Акульшина, В.Н. Дармограй

Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П.Павлова

На основании изучения и систематизации литературных данных, касающихся таксономической и химической характеристик, результатов собственного анализа качественного состава травы грыжника многобрачного (*Herniaria polygama* J.Gay.), для этого сырья авторами разработана методика хроматоспектрофотометрического определения содержания герниарина и умбеллиферона, которая может быть использованы при разработке и дополнении нормативной документации на траву грыжника многобрачного.

Ключевые слова: трава грыжника многобрачного, семейство гвоздичные, диуретическое средство, фармакогностический анализ, кумарины, методика хроматоспектрофотометрического определения содержания, герниарин, умбеллиферон

В официальной медицине европейских стран наряду с травой грыжника гладкого (*Herniaria glabra* L.) источником сырья являются другие виды грыжников, в том числе грыжник многобрачный (*H. polygama* J.Gay), заготавливаемый в нашей стране как сырьё для экспорта [4]. Сырьё грыжников активно используется как диуретические, спазмолитические, антимикробные средства при заболеваниях почек и мочевыводящих путей, ряде обменных и других заболеваний в виде настоев, настойки, свежего сока, в составе лекарственных сборов, в сухих экстрактах в составе ряда комплексных зарубежных препаратов [2]. Фармакологические исследования грыжников, в том числе и г. многобрачного, подтвердили увеличение диуреза, снижение уровня остаточного азота, и мочевины в крови, спазмолитическое и салуретическое действия [12,13]. В нашей стране г.многобрачный применяется только в народной медицине [10]. В связи с тем, что г.многобрачный является эффективным лекарственным средством, имеет обширные ареалы на территории страны, длительное время трава г.многобрачного отправлялась на экспорт, растение заслуживают внедрения в отечественную официальную медицинскую и фармацевтическую практику, для чего необходимо проведение фармакогностических исследований, оценка количественного содержания действующих веществ в сырье.

Грыжник многобрачный (=г. душистый; =г. кустарниковый) (*Herniaria polygama* J.Gay). (= *H. odorata* Andr.; = *H. fruticosa*) относится к роду (*Herniaria* L.) (секция *Paronychiella* William), подсемейства приноготковые (*Paronychioideae*) семейства гвоздичные (*Caryophyllaceae*) порядка гвоздичноцветные

(Caryophyllales).

Многолетнее травянистое растение с простёртыми ветвистыми стеблями, 5-20см длиной, с супротивными мелкими яйцевидно-продолговатыми листьями, длиной до 12 мм, суженными к основанию в короткий черешок, с прилистниками, на поверхности голые. Цветки мелкие, невзрачные, скученные по несколько. Околоцветник чашечковидный, венчик из беловатых шиловидных лепестков, который обычно не виден. Доли чашечки островатые, тычинок большей частью 4, столбик хорошо заметен. Цветки иногда однополые. Цветки в соцветиях сближены, на развилинах соцветий наблюдаются группы цветков, дающих не клубочек, а “колосовидное” образование. Стебель и чашелистики в нижней половине могут быть коротко опушены загнутыми вниз волосками. Плод орешковидный, односеменной, нераскрывающийся, семя с мучнистым эндоспермом [5,8].

Г.многобрачный считается видом чернозёмных степных и лесостепных районов, в европейской части СНГ растёт в регионах: Верхний Днепр, Днепр, Волжско-Донские, Заволжские, Причерноморские, Нижне-Донские, Нижне-Волжские районы; в Средней Азии растёт в Арало-Каспийских и Прибалхашских районах. Растение известно на песчаных и чернозёмных почвах в Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Нижегородской, Орловской, Оренбургской, Пензенской, Самарской, Саратовской, Тамбовской, Ульяновской, Челябинской областях, в Калмыкии. Во Владимирской, Московской, Рязанской областях в юго-восточных районах на вторичных местообитаниях этим видом заменяется грыжник гладкий [9,11].

В работах И.Г.Зоз, Н.Ф.Комиссаренко, Н.А.Черных [6] указано, что виды секции *Paronychia* William, в том числе г.многобрачный, содержат кумарины - умбеллиферон, скополетин и герниарин, которые присутствуют и в видах секции *Herniaria* L. – однолетниках с неполным числом тычинок в цветке, включая г.волосистый, а преимущественно многолетники с пятью тычинками в цветке, среди которых г.гладкий и г.Бессера секции *Herniaria* L., кумаринов не имеют. Для разделения кумаринов спиртовых экстрактов грыжников применялась тонкослойная хроматография на бумаге №12 в системе хлороформ-формамид. Хроматографией на полиамиде, с последующим разделением на колонке с силикагелем, с элюированием хлороформом и хлороформ-метанолом, при увеличении концентрации последовательно от 10 до 40, подтверждено наличие в траве г.многобрачного флавоноидов – кверцетина, изорамнетина, рутина [3].

Для травы г.многобрачного разработаны технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт по ГОСТ 21566-76э [4], включающие числовые показатели влажности, измельчённости, наличия других частей растения, органической и минеральной примесей.

В предшествующей работе [1] на основании изучения и систематизации литературных данных, касающихся ботанической, таксономической и химической характеристик и собственного сравнительного фармакогностического макроскопического, микроскопического изучения и анализа качественного состава травы грыжника волосистого (*Herniaria hirsuta* L.), грыжника Бессера (*H.Besseri* Fisch.), грыжника седоватого (*H.incana* Lam.), грыжника многобрачного (*H.polygama* J.Gay.) для фармакогностической идентификации травы грыжника многобрачного рекомендовано следующее.

При макроскопическом анализе ориентироваться на то, что морфологически для г.многобрачного характерен четырёхмерный цветок, для остальных

рассматриваемых грыжников пятимерный. У г.волосистого и многобрачного цветки не сближены, находятся в колосовидных соцветиях. Органолептически высушенная трава г.волосистого и г.многобрачного отличается кумариновым запахом.

При микроскопическом анализе листа, при прочих типичных для грыжников микроскопических признаках, у г.многобрачного наблюдаются короткие простые одноклеточные волоски или волоски отсутствуют, в то время как у г.волосистого и г. Бессера (седоватого) - простые одноклеточные длинные волоски.

Для г. многобрачного, как для сырья других видов грыжника, положительны качественные реакции на флавоноиды (цианидиновая проба, с раствором калия гидроокиси спиртовым), сапонины (пенообразование с 0,1н кислотой соляной и 0,1н натрия гидроокисью).

Для г.многобрачного и г.волосистого специфична, в отличие от других грыжников, реакция микросублимации с последующим просмотром в УФ свете раствора этилового спирта с появлением голубой флюоресценции.

При использовании хроматографической пробы на пластинах «Силуфол» в системе 15% уксусная кислота, с обработкой парами концентрированного аммиака и просмотром в УФ свете (время хроматографирования 0,7ч) для г. многобрачного и г.волосистого должны отмечаться: рутин ($R_f=0,86$), герниарин ($R_f=0,74$), умбеллиферон ($R_f=0,56$). Возможна хроматографическая проба в системе бутанол-этанол-вода (7:2:5)(1,7ч). Для г. многобрачного и г.волосистого должны отмечаться: рутин ($R_f=0,77$) и умбеллиферон ($R_f=0,97$) (г.многобрачного голубовато-фиолетового, г.волосистого голубого цвета). Для других изученных нами видов грыжника, в том числе грыжника гладкого пятна кумаринов отсутствуют.

В этой системе для г.гладкого, как для других видов грыжника, обозначаются по два сапониновых пятна (контроль по достоверному образцу гипсогенина) с $R_{f1}=0,78$ и $R_{f2}=0,37$ после проявления раствором 1% ванилина в концентрированной серной кислоте.

В связи с тем, что на основании изучения литературных данных и по результатам собственных исследований можно сделать вывод о наличии среди видов грыжника только в г.многобрачном (как и в г.волосистом) наряду с флавоноидами и сапонинами кумаринов – герниарина и умбеллиферона, и при отсутствии в литературе методик количественного определения действующих веществ для этого растения, нами на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники была поставлена задача разработать и апробировать методику хроматоспектрофотометрического определения кумаринов в траве г.многобрачного.

Материалы и методы

Гербарные образцы г. многобрачного, предоставленные Ботаническим институтом АН России и ВИЛРОм. Образцы травы г.многобрачного, заготовленные в Липецкой области (Усмьинский р-н).

Для хроматографических исследований использованы пластины «Силуфол» (Чехословакия), 15x15 см.

Применены 6 систем растворителей:

Е – эфир-бензол-2н уксусная кислота (5:5:1)(верхняя фаза) [15];

Ж – бензол-ацетон (9:1) [7];

З – толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:1)[14];

И – бензол-этилацетат (2:1) [7];

К – петролейный эфир-этилацетат (2:1) [7];

Л – хлороформ-петролейный эфир (1:2) [7];

М – петролейный эфир-эфир (1:1)[7];

Использованы достоверные образцы умбеллиферона, герниарина.

Для обнаружения кумаринов пробы сырья (0,1:1,0 мл) и достоверные образцы, приготовленные на 96% этиловом спирте, наносились микрокапилляром в количестве 2×10^{-3} мл (20 мкл) и $0,2 \times 10^{-3}$ (2 мкл) соответственно. Для проявления использовалась обработка 5% спиртовым раствором калия гидроокиси с дальнейшим просмотром в УФ-свете. Источник УФ света - М-833. Спекрофотометр СФ 26.

Результаты и их обсуждение

Для хроматоспектрофотометрического определения кумаринов в траве г.многобрачного определены: 1) условия максимальной экстракции кумаринов; 2) система растворителей для оптимального хроматографического разделения кумаринов.

Экстракция кумаринов из навески травы г. многобрачного проводилась 96% этиловым спиртом, учитывая их хорошую растворимость в этом растворителе. Варианты условий экстракции кумаринов представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Варианты условий экстракции кумаринов
из травы грыжника многобрачного**

Вариант экстракции	Условия экстракции	Время извлечения, ч *	Содержание герниарина, % **
1	2	3	4
1	20 мл экстрагента первоначально, затем 4 раза по 10 мл при нагревании по 30 мин. на водяной бане с обратным холодильником	2,5	0,90±0,045
2	5 раз по 10 мл по 7 мин. нагревания, затем дважды по 10 мл по 30 мин. нагревания	1,5	0,71 ±0,037
3	20 мл первоначально при трехчасовом встряхивании и настаивании 1 сут., затем 10 мл при 30 мин. встряхивании и 3 раза по 10 мл по 30 мин. нагревания	29,0	0,69 ±0,035

* -без учёта времени на фильтрование извлечения;

** -три параллельных определения;

Выигрышным во времени является вариант 2, но наибольшее содержание герниарина определяется по варианту 1, что делает предпочтительным этот вариант экстракции кумаринов. Вариант 3 вряд ли пригоден, так как длительное холодное настаивание не обеспечивает полноты извлечения кумаринов и требует дополнительной трехкратной тепловой экстракции.

Схемы разделения кумаринов травы грыжника многобрачного методом ТСХ в 6 различных системах растворителей приведены в табл.2.

Таблица 2

Схемы разделения кумаринов травы грыжника многобрачного

методом ТСХ в различных системах растворителей

Система растворителей	Свидетель			Грыжник многобрачный		Время хроматографирования, мин.
	Название кумарина	Rf	Цвет пятна*	Rf	Цвет пятна*	
1	2	3	4	5	6	7
Е	герниарин	0,7	Ф	0,7	Ф	20
	умбеллиферон	0,48	Г	0,48	Г	
Ж	герниарин	0,59	Ф	0,59	Ф	15-20
	умбеллиферон	0,20	Г	0,20	Г	
З	герниарин	0,67	Ф	0,67	Ф	20
	умбеллиферон	0,58	Г	0,58	Г	
И	герниарин	0,84	Ф	0,84	Ф	15-20
	умбеллиферон	0,61	Г	0,61	Г	
	-	0,52	Ф	0,52	Ф	
	-	0,39	СГ	0,39	СГ	
К	герниарин	0,42	Ф	0,42	Ф	15-20
	умбеллиферон	0,25	Г	0,25	Г	
	-	0,17	Ф	0,17	Ф	
	-	0,13	СГ	0,13	СГ	
Л	герниарин	-	Ф	-	ГФ	20
	умбеллиферон	-	Г	-	ГФ	
М	герниарин	-	Ф	-	ГФ	20
	умбеллиферон	-	Г	-	ГФ	

*Условные обозначения:

-при просмотре в УФ свете: Ф-фиолетовый; Г-голубой; СГ-сине-голубой;

-после обработки 5% спиртовым раствором калия гидроксида и просмотре в УФ свете: меняется только цвет пятна с СГ –сине-голубого на ЖФ-жёлто-фиолетовый, цвета остальных пятен сохраняются).

Системы Л и М не обеспечивают деление кумаринов, в системах Е, Ж и З наблюдается деление кумаринов на герниарин и умбеллиферон. В системах И и К происходит наиболее полное деление – выявляется по четыре «кумариновых» пятна, из которых два принадлежат герниарину и умбеллиферону. В системе И (бензол-этилацетат (2:1)) «пятна» имеют больший разбег. Результаты определения количественного содержания герниарина (0,610% в системе И и 0,690% в системе К) и умбеллиферона (0,050% и 0,054% соответственно) при трех параллельных определениях сходны. Во всех системах время прохождения фронта растворителя 15-20 минут. Возможно применение обеих систем И и К, но система И предпочтительнее, так как практически исключает «наложение» «кумариновых» пятен.

При пробном применении для ТСХ пластинок «Алусил», с большей ёмкостью сорбента, чем «Силуфол», в системах И и К чётко выражено лишь «пятно» герниарина.

Методика хроматоспектрофотометрического определения содержания кумаринов в траве грыжника многобрачного:

Трава грыжника многобрачного измельчается до размеров частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченной травы помещается в колбу вместимостью 50 мл, заливается 20 мл 96% этилового спирта, присоединяется к обратному холодильнику и экстрагируется на кипящей водяной бане 30 минут. Смесь охлаждается до комнатной температуры и фильтруется через бумажный фильтр. Экстракция проводится ещё четыре раза по 10 мл указанным выше способом. Спиртовые извлечения фильтруются через тот же фильтр, в тот же сосуд. Объединённое извлечение отгоняется до объёма 5 мл. Пластина «Силуфол», размером 15x15 см делится на пять частей. На стартовую линию первой части наносится спиртовый раствор образца умбеллиферона, на вторую – герниарина в качестве свидетелей, на третью и четвёртую части – по 0,05 мл полученного извлечения в виде пятна диаметром 10 мм, пятая часть пластинки служит контролем при спектрофотометрировании. Пластина с нанесёнными пробами высушивается на воздухе, затем помещается в камеру со смесью растворителей бензол-этилацетат (2:1) и хроматографируется восходящим способом. Когда фронт растворителя доходит до конца пластинки (15-20 минут), она вынимается и высушивается на воздухе. Участок пластинки с тремя первыми полосами отрезается, обрабатывается 5% спиртовым раствором калия гидроокиси, высушивается при температуре 105-110°C 3-5 минут и просматривается в УФ-свете. На уровнях зон фиолетового свечения герниарина и голубого - умбеллиферона отмечаются зоны на двух оставшихся частях пластинки. Зоны чистого сорбента на пятой части пластинки служат контролем при количественном определении. Отмеченные зоны сорбента переносятся количественно в центрифужные пробирки на 10 мл, заливаются 5 мл 96% этилового спирта, закрывают пробками и элюируют 30 минут при постоянном встряхивании. Полученные взвеси центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. Полученные растворы спектрофотометрируют (герниарин при 309 нм, умбеллиферон при 324 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание герниарина и умбеллиферона в пересчёте на абсолютно сухое сырьё рассчитывается по формуле:

$$X(\%) = \frac{D \times 5 \times 5 \times 100}{E \times M \times 0,05 \times (100-B)} ; \text{ где}$$

Д – оптическая плотность исследуемого раствора;
 Е - удельный показатель поглощения:
 герниарина в этаноле при 309 нм (Е1%/1см= 567,63);
 умбеллиферона в этаноле 324 нм (Е1%/1см= 955,47);
 М – навеска сырья (г);
 В - потеря в массе при высушивании (%);
 Метрологическая характеристика методики отражена в табл.3.

Таблица 3

**Метрологическая характеристика методики
 хроматоспектрофотометрического определения содержания
 герниарина и умбеллиферона в траве гречки многообраного**

п	X _{ср.}	S	S ²	S _{хср.}	Δx _{ср.}
герниарин					
20	0,597	0,07662	0,584x10 ⁻³	0,0170	0,0355
умбеллиферон					
20	0,0576	8,2x10 ⁻³	6,8x10 ⁻⁵	1,8x10 ⁻³	3,8x10 ⁻³

Выводы

На основании изучения и систематизации литературных данных, касающихся таксономической и химической характеристик, результатов собственного анализа качественного состава травы гречки многообраного (*Herniaria polygama* J.Gay.), для этого сырья авторами разработана методика хроматоспектрофотометрического определения содержания герниарина и умбеллиферона, которая, как и предложенные ранее диагностические макро-, микроскопические, органолептические признаки и качественные пробы, может быть использованы при разработке и дополнении нормативной документации на траву гречки многообраного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акульшина Е.В., В.Н.Дармограй. Результаты фармакогностического изучения травы гречки волосистого, г.седоватого, г.многообраного //Рос медико-биол. вестник имени И.П.Павлова. -2008. -№2. –С.55-62.
2. Бендер К.И., Гоменюк Г.А., Фрейдман С.Л. Указатель по применению лекарственных растений в научной и народной медицине.-Саратов: Изд-во Саратов.ун-та.-1988. -110с.
3. Богуславская Л.И., Тихонов А.И. Флавоноидные соединения *Herniaria polygama* //Химия природ. Соединений. -1985.-№3. –С.411.
4. ГОСТ 21566-76э.Трава гречки. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт. Утв.Гос.ком.станд. 13.02.76. №387-4с.
5. Зоз И.Г. О восточно-европейских видах //Новости систематики высших растений *Herniaria L.* /АН СССР. Ботанич.ин-тим.В.Л.Комарова. –Л.,-1976.-Т.13.- С.105-109.
6. Зоз И.Г., Комиссаренко Н.Ф., Черных Н.А. Хематаксономическое изучение видов рода *Herniaria L.* флоры СССР //Раст.ресурсы.-1976. –Т.12. –В.3.-С.411-414.
7. Кузнецова Г.А. Природные кумарины и фурукумарины.-Л.: Наука. -1967.- 246с.

8. Клоков М.В. Нови матер. Первглед,родини гвоздичных – роди *Cerastium L.*, *Miniartia L.*, *Herniaria L.*//Ботанич.журнал АН УССР.-1947.-№4.-С.1-2.
9. Минетзон И.Л. Флора Нижнего Новгорода. -3-я электр.версия.-Н.Новгород.-2009.-С.63.-120с.
10. Носаль М.А., Носаль И.М. Лекарственные растения и способы их применения в народе. –М.: Профиздат.-1993. -272с.
11. Сенатор С.А., Саксонов С.В. Обзор гвоздичных (Caryophyllaceae) флоры Самарской Луки //Самарская лука: проблемы региональной и глобальной экологии. -Сам.Лука.-2009.-Т.18,№2. -С.109-125.
12. Соколова В.Е., Васильченко И.Ф., Комиссаренко И.Ф. Влияние растений рода *Herniaria L.* на некоторые показатели азотистого обмена и функции почек у животных //Материалы 2-го съезда фармакологов СССР. –Киевю-1973.-С.226-227.
13. Czyszewska S., Karzmerek F., Szpunar K. /Wplyw *Herniaria glabra* na gladnie miesnie izolowanych cienkich jelit krolika oraz na wydzie-lanie moczu//Biul.Inst.Roslin leczniezych.-1963.-Т.9.-№3.-S.121-135.
14. Tamas M., Canciu E. Comparative phytochemical study of saponine, flavones and coumarine from *H.glabra L.* *H. hirsuta L.*//Clujul.med.-1977.-Vol.50.-№20.-P.196-203.
15. Sarsunova M., Schwars V., Michlec ces. A kolektiv/ Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармацевтической и клинической биохимии: В 2-х Ч., -М.: Мир. 1980. –Ч.2.-621с.

**RESULTS DEVELOPMENT OF TECHNIQUES CHROMATOSPECTROPHOTOMETRICAL
DEFINITIONS AND GERINIARINA UMBELLIFERONE
IN THE GRASS GRYZHNIKA POLYADELPHOUS**

E.V. Akulshina, V.N. Darmohray

Based on the study and systematization of data in the literature concerning the taxonomic and chemical characteristics, the results of its own analysis of the quality of the grass gryzhnika polygamous (*Herniaria polygama J. Gay.*), For these materials the authors developed a method of determining the content chromatophotometrical herniarin and umbelliferone, which can be used to develop and completion of regulatory documents on the grass gryzhnika polygamous.

Key words: grass gryzhnika polygamous, family Caryophyllaceae, diuretic means Pharmacognostic analysis, coumarins, technique chromatophotometrical definition content, herniarin, umbelliferone

Акульшина Е.В., к.фарм.наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ГОУ ВПО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Росздрава;
root@ryazgmu.ryazan.ru