

В.А. Воравко

**ТОНКОСЛОЙНАЯ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ ТРАВЫ ПОСТЕННИЦЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ**

Научный руководитель: ст. преп. Н.М. Борабанова

Кафедра фармацевтической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.A. Voravko

**THIN-LAYER AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
OF THE HERB PARIETARIA OFFICINALIS**

Tutor: senior lecturer N.M. Borabanova

Department of Pharmaceutical Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В статье представлены результаты установления качественного и количественного состава водного и водно-спиртовых экстрактов травы постенницы лекарственной (*Parietaria officinalis*), собранной на территории Гомельской и Минской областей Республики Беларусь, методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: *Parietaria officinalis*, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, лекарственное растительное сырьё, фенольные соединения.

Resume. The article presents the results of establishing the qualitative and quantitative composition of aqueous and aqueous-alcoholic extracts of the herb *Parietaria officinalis*, collected on the territory of the Gomel and Minsk regions of the Republic of Belarus, using thin-layer and high-performance liquid chromatography methods.

Keywords: *Parietaria officinalis*, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, medicinal plant material, phenolic compounds.

Актуальность. Постенница лекарственная (*Parietaria officinalis*, семейство *Urticaceae*) – распространённый сорняк, произрастающий в умеренном климате, в том числе на территории Республики Беларусь и в Прибалтийском районе России [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Трава постенницы лекарственной как лекарственное растительное сырьё входит лишь во Французскую гомеопатическую фармакопею, издавна применяется в народной медицине в виде настоя и экстракта как кровоостанавливающее при лёгочных, маточных, геморроидальных кровотечениях, как мочегонное, муколитическое, наружно – для достижения ранозаживляющего и антибактериального эффекта. Растение имеет хорошую сырьевую базу и высокий потенциал использования в медицинской практике, что обуславливает необходимость дальнейшего его изучения [2, 6].

Цель: идентифицировать и провести количественное определение БАВ методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в извлечении травы постенницы лекарственной.

Задачи:

1. провести качественное определение БАВ в извлечении травы *P. officinalis* с помощью ТСХ различными методиками;

2. изучить качественный и количественный состав водно-спиртовых извлечений травы постенницы лекарственной посредством ВЭЖХ;

определить оптимальную концентрацию водно-спиртовой смеси для экстракции БАВ из травы *P. officinalis*.

Материалы и методы. Были приготовлены извлечения из измельчённого сырья *Parietaria officinalis*, собранного в 2021-2022 годах на территории Гомельской и Минской областей Республики Беларусь и высушенного воздушно-теневым способом, с применением воды, 40%, 70%, 96% этанола (соотношение сырья и экстрагента 1 : 50) на водяной бане при температуре 80°C в течение 45 минут и с применением 40% метанола (1 : 125) на ультразвуковой бане при температуре 40°C в течение 30 минут.

Для тонкослойной хроматографии использовали пластинки TLC Silica gel 60 F₂₅₄. Выбраны следующие системы подвижных фаз (соотношения по объёму): бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2; 4:1:3; 4:1:5) (БУВ), этилацетат-метилэтилкетон-кислота муравьиная безводная-вода (50:30:10:10) (ЭММВ). В методике с применением БУВ (4:1:2) использовали обработку 30 г/л раствором алюминия хлорида на 96% этаноле, в методике с ЭММВ – 10 г/л дифенилборной кислоты аминоэтиловым эфиром в метаноле и затем 50 г/л раствором макрогола 400 в метаноле. Просматривали до и после проявления в УФ-свете с длиной волны 365 нм.

Для ВЭЖХ использовали хроматограф жидкостный Dionex UltiMate 3000, программу Chromeleon 7; условия хроматографирования: подвижная фаза А – кислота фосфорная-вода (1:999), подвижная фаза В – ацетонитрил; хроматографическая колонка – HPLC-COLUMN 250*4.6 mm MZ-Aqua Perfect C18; скорость потока подвижной фазы – 1,5 мл/мин; температура колонки – +35°C; объём вводимой пробы – 20 мкл; время элюирования – 20 минут; детектор спектрофотометрический с длиной волны 330 нм. Режим элюирования градиентный, подобран экспериментально в соответствии с наилучшим разделением пиков.

Для ТСХ и ВЭЖХ в качестве стандартов были взяты рутина гидрат, кофейная, хлорогеновая, феруловая кислоты, кемпферола-3-глюкозид, дигидрокверцетин.

Результаты и их обсуждение. Для тонкослойной хроматографии с извлечением из травы постенницы лекарственной на 70% этаноле в качестве испытуемого раствора предварительно были взяты подвижные фазы БУВ с различным соотношением компонентов, причём наибольшей разделяющей способностью отличился БУВ (4:1:2), поэтому данную систему использовали для дальнейшего исследования.

В системе подвижных фаз БУВ (4:1:2) до обработки этанольным раствором хлорида алюминия обнаружены пятна светло-синего цвета R_f 0,39; 0,45; 0,65; 0,71. После обработки пластинки с испытуемым раствором наблюдались пятна светло-зелёного цвета с R_f 0,62; 0,65; 0,68. Для раствора сравнения рутина обнаружено светло-зелёное пятно с R_f 0,64. Оформленных флуоресцирующих пятен для растворов сравнения хлорогеновой, кофейной, феруловой кислот, кемпферола-3-глюкозида и дигидрокверцетина отмечено не было.

Для тонкослойной хроматографии с извлечением из травы постенницы лекарственной на 40% метаноле в качестве испытуемого раствора и после обработки дополнительными реактивами в виде дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира в метаноле и раствора макрогола 400 в метаноле в системе подвижных фаз ЭММВ обнаружены: пятно светло-зелёного цвета с R_f 0,58 (неидентифицированное вещество)

и пятно коричневатого-оранжевого цвета с R_f 0,61 (рутин) наложились друг на друга; пятно светло-синего цвета с R_f 0,78 (хлорогеновая кислота) и пятно светло-синего цвета с R_f 0,96 (кофейная кислота).

Для изучения качественного и количественного состава водно-спиртового извлечения из травы постенницы лекарственной методом ВЭЖХ был взят экстракт на 70% этаноле (испытуемый раствор №1).

Полученная в ходе анализа хроматограмма с отмеченными наиболее значимыми идентифицированными пиками изображена на рисунке 1.

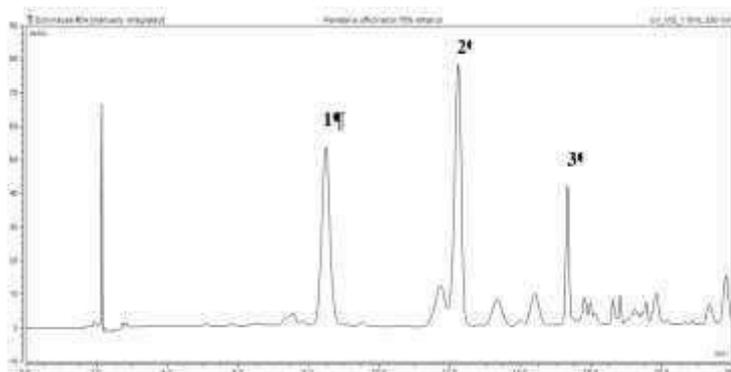


Рис. 1 – Результат ВЭЖХ (хроматограмма) с обозначением наиболее чётких пиков

С помощью заколов стандартов хлорогеновой и кофейных кислот (1 мг на 10 мл 70% спирта этилового каждый) были идентифицированы пики номер 1 (производные хлорогеновой кислоты) и 2 (кофейная кислота).

С использованием стандарта в виде раствора рутина гидрата (0,1 мг рутина гидрата, что соответствует 0,097 мг рутина, на 1 мл 70% спирта этилового) был идентифицирован пик номер 3.

Также методом добавок было рассчитано количественное содержание рутина в испытуемом растворе, для чего потребовалось изготовить новый испытуемый раствор №2.

Испытуемый раствор №2: в вialу помещают 1,000 мл испытуемого раствора 1 и 1,000 мл раствора рутина гидрата.

Полученные результаты аналитического эффекта (площадей пиков) в расчёте на три пробы по три измерения: испытуемый раствор №1 – $(4,35 \pm 0,17)$ mAu*min; испытуемый раствор №2 – $(19,49 \pm 0,82)$ mAu*min.

Для расчётов использовалась формула 1 для метода добавок.

$$C_x = \frac{C_{\text{доб}} \times V_{\text{доб}} \times u_x}{(V_{\text{доб}} + V_x) \times u_{\text{доб}} - V_x \times u_x}$$

Формула 1 – Формула для расчёта концентрации рутина в экстракте травы постенницы лекарственной на 70% этаноле

Причём C_x – концентрация рутина в испытуемом растворе №1, мкг/мл; $C_{\text{доб}}$ – концентрация рутина в стандартном растворе рутина, мкг/мл; V_x – объём испытуемого раствора, мл; $V_{\text{доб}}$ – объём стандартного раствора рутина, мл; $(V_x + V_{\text{доб}})$ – объём испытуемого раствора №2, мл; u_x – площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора №1, mAu*min; $u_{\text{доб}}$ – площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора №2, mAu*min.

Подставляя числовые значения в формулу, получаем:

$$C_x = \frac{97,00 \frac{\text{МКГ}}{\text{мл}} \times 1 \text{ мл} \times (4,35 \pm 0,17) \text{ мАу} \cdot \text{мин}}{(1 \text{ мл} + 1 \text{ мл}) \times (19,49 \pm 0,82) \text{ мАу} \cdot \text{мин} - 1 \text{ мл} \times (4,35 \pm 0,17) \text{ мАу} \cdot \text{мин}} =$$
$$= 12,17 \pm 0,49 \frac{\text{МКГ}}{\text{мл}}$$

Проводился выбор оптимального экстрагента для извлечения БАВ из травы постенницы лекарственной. Для сравнительного количественного анализа веществ были взяты извлечения на воде, 40%, 70% и 96% этаноле в качестве экстрагентов.

Числовые значения площадей пиков хлорогеновой, кофейной кислот и рутина для извлечений с изучаемыми экстрагентами приведены в таблице 1.

Табл. 1. Сравнительная характеристика значений площадей пиков для идентифицированных БАВ с применением воды и водно-этанольных смесей в качестве экстрагентов

Площадь пика, мАу*мин	Вода	40% водно-этанольная смесь	70% водно-этанольная смесь	96% водно-этанольная смесь
Производные хлорогеновой кислоты (пик 1)	8,189±0,328	18, 283±0,695	9,109±0,292	0,208±0,008
Кофейная кислота (пик 2)	18, 469±0,739	30,789±1,078	16,420±0,591	0,684±0,015
Рутин (пик 3)	0,157±0,007	3,726±0,093	5,355±0,066	0,853±0,034

Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что оптимальным экстрагентом для извлечения хлорогеновой и кофейной кислот стал 40% этанол, а для рутина – 70% этанол, поскольку, используя данные экстрагенты, можно получить максимальные значения площадей пиков для соответствующих определяемых БАВ. Наименьшие значения площадей пиков наблюдались для 96% водно-этанольной смеси.

Выводы:

1. методом ТСХ в метанольном и этанольном извлечениях из травы постенницы лекарственной были разделены и идентифицированы с помощью стандартов рутина, хлорогеновая и кофейная кислоты, рассчитаны коэффициенты подвижности веществ для хроматографических систем БУВ (4:1:2) и ЭММВ (50:30:10:10);

2. методом ВЭЖХ в экстракте травы *P. officinalis* на 70% этиловом спирте с помощью стандартов были идентифицированы производные хлорогеновой кислоты, кофейная кислота, рутин, причём количественное содержание последнего, рассчитанное методом добавок, составило $12,17 \pm 0,49$ мкг на 1 мл экстракта;

3. методом ВЭЖХ путём сравнения значений площадей пиков искомым веществ были определены оптимальные концентрации водно-спиртовых смесей для экстракции кофейной, хлорогеновой кислот (40% водно-этанольная смесь) и рутина (70% водно-этанольная смесь) из травы постенницы лекарственной.

Литература

1. Тахтаджян, А. Л. Система магнолиофитов / А. Л. Тахтаджян. – Л.: Наука, 1987. – 439 с.
2. Лавренова, Г. В. Энциклопедия лекарственных растений / Г. В. Лавренова, В. К. Лавренов. – СПб.: Издательский дом «Нева», 2003. – Т.2. – 272 с.
3. Brandes, D. Die gattung *Parietaria* L. in Deutschland. The genus *Parietaria* L. in Germany / D. Brandes // *Florist Rundbriefe*. – 2018. – № 52. – С. 45 – 68.
4. Bubel, K. Stanowisko *Parietaria officinalis* L. (Urticaceae) w Sobótce-Górcie (Masyw Ślęży) / K. Bubel, E. Szczęśniak // *Przyroda sudetów*. – Jelenia góra, 2019. – Т.22. – С. 27-32.
5. *Parietaria officinalis* L. / *Atlas of Living Australia* [Электронный ресурс]. – 2010. Режим доступа: <https://bie.ala.org.au/species/https://id.biodiversity.org.au/node/apni/2893311>. (дата обращения: 22.05.2023).
6. *Pharmacopée Française XI éd / Commission nationale de pharmacopée, Association pour le développement de la recherche appliquée a la pharmacopée (Paris)* [Электронный ресурс]. – 2019. Режим доступа: <https://ansm.sante.fr/documents/reference/pharmacopree/la-pharmacopree-francaise>. (дата обращения: 20.05.2023).
7. The plants Database / Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture. [Электронный ресурс]. – 2016. Режим доступа: <https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=PAOF>. (дата обращения: 16.05.2023).