

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОДЛИННОСТИ КОРНЕВИЦ С КОРНЯМИ ЧЕМЕРИЦЫ

Н.Э. Коломиец, докт. фарм. наук,
Т.В. Полуэктова, канд. фарм. наук, А.Ю. Малышев
Сибирский государственный медицинский университет;
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2

E-mail: borkol47@mail.ru

Разработана методика ТСХ определения стероидных алкалоидов в корневищах с корнями чемерицы. Уточнены и визуализированы микроскопические признаки корневищ с корнями чемерицы.

Ключевые слова: чемерица Лобеля, *Veratrum lobelianum* Bernh., подлинность, микроскопия, стероидные алкалоиды, ТСХ.

Чемерица Лобеля – *Veratrum lobelianum* Bernh. – травянистое растение высотой до 180 см с характерными складчатыми (гофрированными) листьями, имеющими замкнутые влагалищные основания. У нецветущих растений листовые влагалища плотно вложены одно в другое, образуя ложный стебель. Чемерица предпочитает увлажненные почвы, произрастает преимущественно на пастбищах, по сырым лугам и лесным полянам, в поймах рек. Растение ядовито, при соприкосновении способно вызвать возбуждение, рвоту, судороги [1].

В качестве лекарственного сырья используют корневища с корнями, которые являются официальным средством для уничтожения эктопаразитов. Галеновые препараты чемерицы применяют в ветеринарии для борьбы с кожными паразитами животных, при гиподерматозе крупного рогатого скота. Настойка чемерицы внесена в Государственный реестр лекарственных средств [2, 3]. Других препаратов чемерицы в РФ не производится, в отличие от других алкалоидоносных растений, на основе которых получен ряд эффективных лекарственных средств [4].

В последние годы за рубежом алкалоиды, выделенные из чемерицы белой и чемерицы зеленой, изучаются с целью использования в качестве источника получения гипотензивных средств. Так, проточератрин – один из алкалоидов чемерицы применяют при гипертонии разной этиологии, острой и хронической

почечной недостаточности, карциноме коры надпочечников [2, 5, 6].

Действующая нормативная документация (НД) на корневища с корнями чемерицы нуждается в усовершенствовании в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к НД на лекарственное растительное сырье [7, 8].

Цель данной работы – совершенствование характеристик подлинности корневищ с корнями чемерицы.

Экспериментальная часть

Объектами исследования служили образцы сырья, собранного на территории Кемеровской, Томской и Новосибирской областей и Красноярского края от дикорастущих растений в 2013–2014 гг.

Микроскопический анализ сырья проводили в соответствии с общими фармакопейными статьями «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья», «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы» ГФ XI издания [9]. Для получения объективных данных анализировали не менее 10 микропрепаратов, которые изучали под микроскопом МИКМЕД-1. Препараты фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата «Canon Power Shot A 470».

Результаты исследования подтвердили следующие основные анатомо-диагностические признаки корневищ с корнями чемерицы, указанные в фармакопейной статье (ФС) 42–1051–89: отсутствие эпидермы; наличие многорядной гиподермы, состоящей из клеток желтого цвета; паренхимы коры из клеток округло полигональной формы с межклетниками, крахмальными зернами и рафидами; однорядной эндодермы из подковообразно утолщенных клеток; проводящих пучков коллатерального типа в центральном осевом цилиндре (ЦОС), перерезанных в разных направлениях. Проводящие пуч-

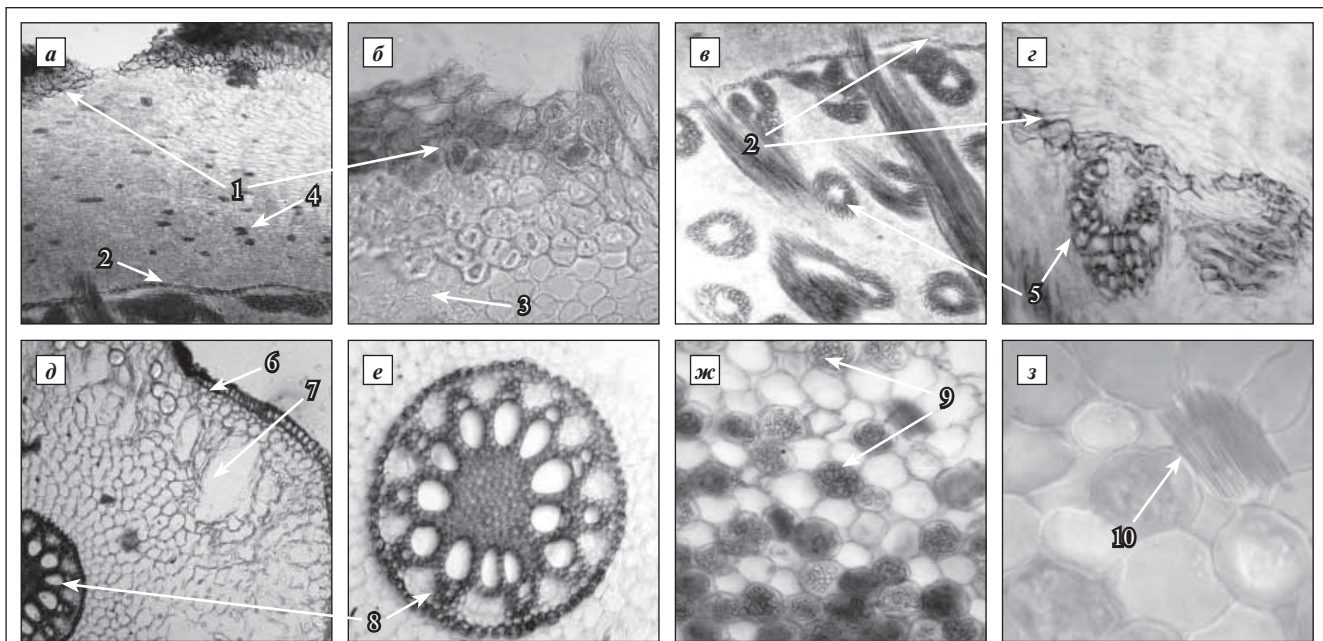
ки, лежащие ближе к эндодерме, большей частью коллатерального типа, иногда неполноконцентрические. Для корней характерно наличие эпидермиса; первичной коры с очень рыхлой паренхимой и крупными, радиально вытянутыми, неправильной формы межклетниками, крахмальными зернами, рафидами; однорядной эндодермы, состоящей из подковообразно утолщенных клеток с пористыми стенками; ЦОС состоит из 15–20 лучей древесины (см. рисунок).

В действующей ФС на корневища с корнями чемерицы предусматривается определение подлинности сырья только на основании анализа внешних и микроскопических признаков. Однако это не может в полной мере гарантировать подлинность сырья.

Согласно данным литературы, все части растения содержат алкалоиды, которых в корнях накапливается до 2,4%, в корневищах – до 1,3% [2,6]. Алкалоиды чемерицы являются азотсодержащими стероидными соединениями, к которым относятся: иервератровые алкалоиды – иервин, изоиервин, изорубиервин, вератрамин; цевератровые алкалоиды – протOVERIN, протOVERATРИНЫ А и В. Была разработана методика определения алкалоидов методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ), включенная в соответствующий раздел проекта новой ФС. В ходе разработки методики определения подлинности сырья методом ТСХ были подобраны оптимальные условия хроматографирования,

включающие выбор экстрагента, элюентов, пластинок, количества наносимой пробы. Стероидные алкалоиды обладают умеренно полярными свойствами, поэтому для их выделения из сырья можно использовать как хлороформ, так и диэтиловый эфир. В качестве систем растворителей были протестированы различные комбинации и соотношения растворителей, чаще всего встречаемые в литературе: гексан – метиловый спирт – ацетон (1:1:1; 1:3:1; 1:6:1; 1:1:10; 10:1:1); гексан – ацетон (1:1); гексан – этиловый спирт (1:1); метиловый спирт – вода (20:80); дихлорметан – метиловый спирт – аммиак (100:100:1); дихлорметан – метиловый спирт – этилацетат (85:13:2); хлороформ – метиловый спирт (9:1); ацетон; хлороформ – ацетон (9:1); аммиак – хлороформ – этиловый спирт (1:3:3) [2, 6, 10]. Для проявления хроматографических пластин, обнаружения и визуализации алкалоидов использовали как специфические (реактив Драгендорфа), так и неспецифические реагенты (50% раствор серной кислоты).

Методика ТСХ-анализа. Около 0,5 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5–0,25 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 12 мл кислоты хлористоводородной разбавленной (до pH=1). Колбу закрывают пробкой и встряхивают на встряхивающем аппарате в течение 30 мин. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в дели-



Фрагменты поперечных срезов чемерицы. Корневище (а, в – 56×; б, г – 280×): 1 – гиподерма; 2 – эндодерма; 3 – клетки паренхимы с крахмальными зёрнами; 4 – рафиды; 5 – проводящие пучки. Корень (д – 56×; е – 135×; ж – 600×; з – 900×): 6 – эпидермис; 7 – межклеточные пространства; 8 – центральный осевой цилиндр; 9 – клетки паренхимы с крахмальными зёрнами; 10 – клетки паренхимы с пучками рафид

тельную воронку и экстрагируют 20 мл хлороформа. Хлороформное извлечение сливают в колбу вместимостью 50 мл. Водный раствор подщелачивают 5 мл аммиака 10% до pH=8, перемешивают на встряхивающем аппарате в течение 30 мин, переносят в делительную воронку и экстрагируют 20 мл хлороформа. Хлороформные извлечения объединяют, упаривают на ротационном испарителе либо на водяной бане до объема 2–5 мл.

На линию старта хроматографической пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ со слоем силикагеля, размером 100×50 мм, в виде полосы длиной 10–20 мм, наносят микропипеткой 50 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 2–5 мин, помещают в камеру (предварительно насыщенную не менее 30 мин) со смесью растворителей н-гексан – этиловый спирт (1:1) и хроматографируют. После прохождения фронтом растворителя около 8 см от линии старта пластинку вынимают из камеры, высушивают в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 и 365 нм.

После высушивания хроматограмму обрабатывают реактивом Драгендорфа. Затем обесцвечивают 10% раствором нитрита натрия. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона адсорбции с R_f 0,33–0,35 с оранжево-коричневой флюоресценцией; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

Выводы

1. Уточнены диагностические признаки анатомического строения сырья. Выявленные основные анатомо-диагностические признаки визуализированы.
2. Предложена методика ТСХ-анализа, позволяющая достоверно определить присутствие характерных для корневищ с корнями черемиды стероидных алкалоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаммерман А.Ф., Гусынин И.А., Ильин М.М. и др. Ядовитые растения лугов и пастбищ. М., СПб.: Изд. АН СССР, 1950: 524.
2. Azimova S.S., Yunusov M.S. Natural Compounds / Alkaloids: plant sources, structure and properties. Springer Science Business Media. New York, 2013: 654–721.
3. Государственный реестр лекарственных средств. М., 2006.
4. Толкачев О.Н., Шейченко О.П., Крепкова Л. В., Савина Т.А., Сокольская Т.А., Сидельников Н.И. Растительные препараты ВИЛАР на основе алкалоидов: химико-технологические исследования. Ч. 1. Семейства *Apopynaceae*, *Papaveraceae*, *Menispermaceae*, *Berberidaceae*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014; 12 (1): 3–15.
5. Glen W.L., Myers G.S., Barber R., Morozovitch P., Grant G. Hypotensive alkaloids of *Veratrum album*. Nature, 1952; 29. 170 (4335): 932.
6. Shakirov R., Yunusov S.Yu. Alkaloids of *Veratrum lobelianum*. Chemistry of Natural Compounds, 1971; 7. 6: 840–841.
7. Государственная фармакопея СССР. МЗ СССР. 9-е изд. М: Медгиз, 1961; 911.
8. Отраслевой стандарт. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. 91500.05.001-00. М., 2000.
9. Государственная фармакопея СССР. XI изд., вып. 2. М.: Медицина, 1989; 400.
10. Hunter Irving R., Walden Mayo K., Wagner Joseph R. et al. Thin-layer chromatography of steroidal alkaloids. J. Chromatogr. A., 1976; 118. 2: 259–262.

Поступила 4 августа 2015 г.

IMPROVEMENT OF THE CHARACTERISTICS OF IDENTITY OF HELLEBORE (*Vertrum lobelianum* Bernh) RHIZOMES AND ROOTS

N.E. Kolomiets, PhD; T.V. Poluektova, PhD; A.Yu. Malyshev

Siberian State Medical University; 2, Moskovsky Road, Tomsk 634050

SUMMARY

The current pharmacopeia article on hellebore rhizomes and roots needs to be updated. Performed investigations could specify their microscopic signs and develop a procedure for the qualitative determination of steroidal alkaloids in the raw material by thin-layer chromatography. The description of the microscopic signs of hellebore rhizomes and roots is added by valid photos. Chromatographic analysis was carried out using n-hexane-ethanol (1:1). Chromatogram processing yielded a main adsorption zone at R_f 0.33-0.35 with orange-brown fluorescence.

Key words: hellebore, *Vertrum lobelianum* Bernh., identity, microscopy, steroidal alkaloids, thin-layer chromatography.

REFERENCES

1. Gammerman A.F., Gusynin I.A., Ilyin M.M. Poisonous plants of meadows and pastures Moscow, St.Petersburg: Publishing house of the Academy of Sciences of the USSR, 1950; 524 (in Russian).
2. Azimova S.S., Yunusov M.S. Natural Compounds. Alkaloids: plant sources, structure and properties. Springer Science Business Media New York, 2013; 654–721.
3. The State Register of medicinal products. Moscow, 2006 (in Russian).
4. Tolkahev O.N., Sheychenko O.P., Krepkova L.V., Savina T.A., Sokolskaya T.A., Sidelnikov N.I. Herbal preparations VILAR based alkaloids: chemical-technological research. P. 1. *Apopynaceae*, *Papaveraceae*, *Menispermaceae*, *Berberidaceae*. Voprosy biologicheskoy, mediczinskoj i farmaceutvicheskoj ximii. 2014; 12 (1): 3–15 (in Russian).
5. Glen W.L., Myers G.S., Barber R., Morozovitch P., Grant G. Hypotensive alkaloids of *Veratrum album*. Nature, 1952; 29. 170(4335): 932.
6. Shakirov R., Yunusov S.Yu. Alkaloids of *Veratrum lobelianum*. Chemistry of Natural Compounds, 1971; 7. 6: 840–841.
7. The State pharmacopoeia of the USSR. 9-th ed. M: Medgiz, 1961; 911 (in Russian).
8. The industry standard. Standards for the quality of medicines. The main provisions. 91500.05.001-00. М., 2000 (in Russian).
9. The State pharmacopoeia of the USSR. Xled vol. 2. Moscow: Medicine, 1989; 400 (in Russian).
10. Hunter Irving R., Walden Mayo K., Wagner Joseph R. et al. Thin-layer chromatography of steroidal alkaloids. J Chromatogr. A. 1976; 118; 2: 259–262.