

**ИЗУЧЕНИЕ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА УСПОКАИВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КОРНЕЙ И КОРНЕВИЩ ПИОНА ЛЕКАРСТВЕННОГО**

**STUDY OF A LIQUID EXTRACT WITH A CALMING EFFECT DERIVED FROM
THE ROOTS AND RHIZOMES OF THE COMMON PEONY (PAEONIA
OFFICINALIS)**

Г. И. Садикова 1

Х. К. Олимов 2

Т. А. Миррахимова 2

1Ташкентский Государственный медицинский университет,
г. Ташкент, Республика Узбекистан

2Ташкентский фармацевтический институт, г. Ташкент Республика Узбекистан
e-mail: gulnozasadikova1@gmail.com, тель: +998971575343

Аннотация

Проведенные исследования по получению жидкого экстракта, из пиона лекарственного успокаивающего действия, позволило определить оптимальные параметры, влияющих на результативность процесса извлечения биологически активных компонентов из лекарственно- растительного сырья. Среди изученных показателей измельченность лекарственно- растительного сырья, тип и полярность экстрагента, соотношение экстрагента к сырью. На основании изучения параметров сырья и количества извлечённых экстрактивных веществ, для получения жидкого экстракта метод бисмацерации, с использованием различных концентрацией экстрагента 70%, 40% этанол и вода очищенная, признан как наиболее результативный. Таким образом, разработана технология получения жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного успокаивающего действия.

Для идентификации и количественного определения флавоноидов разработаны условия для использования метода ВЭЖХ. В составе жидкого экстракта идентифицированы и количественно определены такие флавоноиды, как рутин, дигидрокверцитин, кверцитин, лютеолин.

Ключевые слова: пион лекарственный, экстракт, экстрагент, перколяция, бисмацерация, реперколяция, экстрактивные вещества, флавоноиды

Introduction

Введение.

Перспективным источником биологически активных компонентов для разработки препаратов успокаивающего действия являются целебные растения. Применение лекарственных растений, являющихся натуральным сырьём, базируется на глубоком взаимодействии синтезированных природных компонентов, имеющие генетически родственно эволюционное сродство, которые дополняя и гармонично взаимодействуя

с организмом человека оказывают терапевтическое действие, отсюда следует, что фитопрепараты быстрее и легче усваиваются организмом и активнее включаются в биохимические процессы [1].

Разработка рациональных условий получения фитопрепаратов из натурального сырья обладающих мягким, поливалентным действием не имеющих не желательных побочных реакций препаратов успокаивающего действия весьма ценно. В современном мире из-за различных стрессов и психотравматических факторов резко возросло число различных заболеваний связанных с неврозами, депрессиями и неврозоподобными состояниями, которые требуют длительного лечения. В данных случаях особое значение приобретает безопасность и переносимость применяемых препаратов. С этих позиций особый интерес вызывают препараты полученные на натуральной основе растительного происхождения. Одним из перспективных источников для получения фитопрепаратов успокаивающего действия являются растения рода Пион (*Paeonia*). Пион, в народе его называют Марьян корень, очень популярное растение, применяющееся при неврастении, неврозах, ипохондрии, бессоннице. Широкий спектр лечебного действия пиона обусловлен разнообразным и богатым составом биологически активных компонентов накапливающихся в растении. В основном биологически активные соединения ответственные за фармакологический эффект накапливаются в подземных органах – в корнях и корневищах, это эфирные масла, свободные кислоты; гликоиридоиды; фенольные соединения дубильные вещества; флавоноиды; сапонины; аминокислоты; минеральные вещества[2].

Цель исследования

Разработка оптимальных условий получения жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного (*Paeonia officinalis*) с наибольшим выходом экстрактивных веществ, а также изучение биологически активных компонентов ответственных за терапевтическое действие эффект[3].

Материалы и методы

Объектом исследований явились корни и корневища пиона лекарственного (*Paeonia officinalis*). Для разработки рациональной технологии получения жидкого экстракта изучены технологические свойства лекарственно растительного сырья подобран экстрагент, размер измельчения сырья, температура, время настаивания, метод и условия проведения процесса экстракции.

Идентификацию и количественную оценку флавоноидов проводили методом ВЭЖХ, на приборе Agilent 1200 серии, укомплектованный дегазатором G1379A и спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны VWDG1314. Для элюирования в качестве подвижной фазы в соотношении 70: 30 использовали смесь 0,1% трифторуксусной кислоты и ацетонитрила. Элюирование проводили в изократическом режиме. Скорость подачи элюента в виде потока 1 мл/мин, температура колонки 20°C, давление в стартовых условиях градиента от 90 до 140 бар,

детектирование пиков проводили при длине волны 254, 320 нм. Объем инъекции вводимой в колонку - 2 μ л.

Количественное определение суммы флавоноидов, содержащихся в жидком экстракте из корней и корневищ пиона лекарственного, в пересчёте на рутин определяли на Спектрофотометр UV- Shimadzu- 1800 Япония при при максимуме поглощения рутина 415 нм .

Экспериментальная часть

Результативность процесса экстрагирования зависит от таких факторов как: полярность экстрагента, степень измельчения лекарственно – растительного сырья, времени настаивания, температуры, соотношения сырья к экстрагенту. При получении экстракта экстрагентом служил этанол различной концентрации. Выбор оптимальных условий экстрагирования лекарственно-растительного сырья устанавливали по выходу экстрактивных веществ и суммы флавоноидов, которые пересчитывали на рутин. Результаты исследований выбора оптимального экстрагента представлены в табл.1

Таблица1 Результаты влияния экстрагента на выход экстрактивных веществ и суммы флавоноидов из корней и корневищ пиона лекарственного

№	Экстрагент	Выход экстрактивных веществ, %	сумма флавоноидов мг/г
1	Вода	11,1	13,13
2	40% этанол	19,6	17,12
3	70% этанол	9,6	20,77
4	96% этанол	1,7	0,7

40% этанолом выделяется наибольшее количество экстрактивных веществ, а сумма флавоноидов извлекается 70% этанолом. Учитывая качественный состав полученных фракций, количественное содержание суммы флавоноидов и максимальный выход экстрактивных веществ из корней и корневищ, в качестве рационального экстрагента для получения жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного выбрана полиэкстракция.

Для качественного обнаружения флавоноидов к 1мл жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного прибавили 7 мл 96% этанола и 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 96% этанола, раствор окрасился в зеленовато-желтый цвет.

Сумму флавоноидов, в пересчёте на рутин, определяли используя реакцию образования комплексных соединений флавоноидов с хлоридом алюминия, который растворяли в 50% этаноле с последующим добавлением 1 капли 16% уксусной кислоты, для создания необходимой рН среды[4,5].

Для определения флавоноидов готовили рабочие растворы следующим образом: 1 мл жидкого экстракта, из корней и корневищ пиона лекарственного, помещали в 50 мл мерную колбу доводили объём до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещали в 25

мл мерную колбу, прибавляли 1 мл 2% раствора хлорида алюминия в 96% этаноле, 1 каплю 16% уксусной кислоты и доводили объем колбы до метки 96% раствором этанола.

По истечении 40 минут на спектрофотометре измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 415 нм в кварцевых кюветах с толщиной в 1 см (рис.1). В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли 16% и доведенной 96% этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно в кварцевых кюветах с толщиной в 1 см измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) рутина.

Для приготовления раствора стандартного образца (СО) рутина около 0,05 г (точная навеска) СО рутина предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 ч, растворяли в 85 мл 96% этанола в колбе вместимостью 100 мл. Растворение проводили при нагревании на водяной бане, после охлаждения, раствор количественно переносили в мерную колбу ёмкостью 100 мл, тем же растворителем объём доводили до метки и перемешивали, оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см (рис. 2).

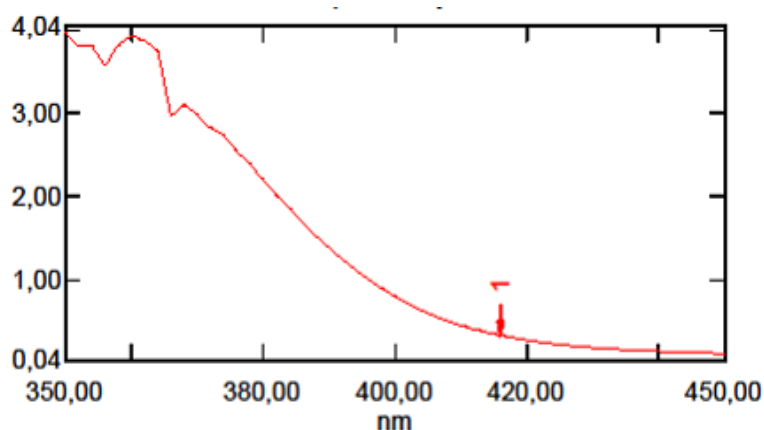


Рис.1. УФ-спектр жидкого экстракта пиона лекарственного

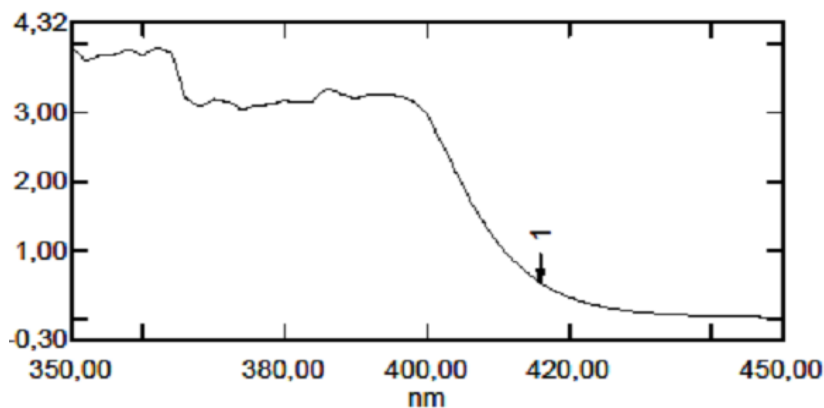


Рис. 2. УФ спектр стандартного образца (СО) рутина

Одним из важнейших фактором, влияющим на процесс экстрагирования являются размер частиц лекарственно - растительного сырья. Для выявления результативной степени измельчения лекарственно-растительного сырья определяли общий выход экстрактивных веществ из сырья с разной степенью измельчения.

При увеличении степени измельчения лекарственно-растительного сырья выход экстрактивных веществ увеличился, но в тоже время увеличился выход и не желательных балластных веществ. При очистке балластных веществ фильтрованием происходит адсорбция биологически активных компонентов на фильтре, что приводит к их потере. Рациональная степень измельчения, при которой достигается максимальное извлечение экстрактивных веществ достигался при размере 2,0-5,0 мм.

Влияние на выход биологически активных компонентов оказывает также соотношение сырьё-экстрагент. Изучались различные соотношения сырьё – экстрагент 1:3; 1:5; 1:10; 1:15. Установлено, что максимальный выход экстрактивных веществ из корней и корневищ пиона лекарственного достигнуто при соотношении сырьё – экстрагент 1:10. Дальнейшее увеличение объёма экстрагента нецелесообразно, т.к. содержание действующих веществ уменьшается.

Одним из основных показателей результативности экстрагирования является правильный выбор метода экстракции при котором происходит максимальное извлечение биологически активных компонентов из растительного сырья. В основном используются следующие методы экстрагирования: бисмацерация, перколяция, реперколяция [3].

При получении экстракта методом бисмацерации экстрагент расходуется в три приёма, свежий экстрагент ступенчато подается на постепенно истощаемое сырьё, по характеру протекания относится к статическим прамоточным периодическим процессам.

Перколяция проводится до истощения сырья, с разделением на первичные и вторичные извлечения. При перколяции экстрагент движется относительно сырья, при котором происходит постепенное удаление извлечённых веществ из зоны экстрагирования или перенос в следующие слои материала. Учитывая выше приведённые результаты в качестве экстрагента оптимальным предложено использовали 70% , 40% этанола и воды очищенной, соотношения сырья к экстрагенту 1:10, толщину измельчения-сырья 2-5мм.

При методе использовании метода бисмацерация, рассчитанное количество экстрагента делили на три порции, в первой порции учитывался коэффициент поглощения экстрагента. Приготовленное лекарственно- растительное сырьё заливали первой порцией экстрагента 70 % этанолом и оставляли для настаивания в продолжении 10 часов. Извлечение полностью сливали и исходное сырьё заливали второй порцией экстрагента, 40 этанолом и оставляли на 10 часов. Извлечения сливали, сырьё отжимали и заливали третьей порцией экстрагента, водой очищенной и оставляли на 10 часов. Все три вытяжки сливали в одну ёмкость и смешивали.

При использовании метода перколяции включающего в продолжение 2 часов стадии набухания , мацерационной паузы- 24 часа и самой перколяции. Скорость перколяции

рассчитывалась исходя из рабочего объёма перколятора, которая составляла 15 капель в минуту.

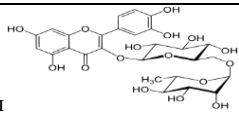
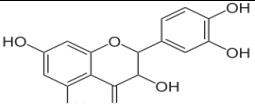
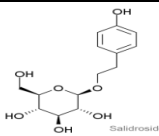
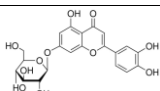
При использовании метода реперколяции лекарственно- растительное сырьё делили на 3 равные порции, которые загружались отдельно в три перколятора. Сырьё в каждом последующем перколяторе экстрагировали извлечением полученным из предыдущего перколятора. Готовый экстракт получали из третьего последнего перколятора.

Экстракты, полученные всеми описанными методами, очищали от нежелательных балластных веществ отстаиванием при температуре 8-10° С в продолжение двух суток с последующим фильтрованием. Экстракты полученные методами перколяции и реперколяции выпаривали под вакуумом, для отгонки растворителя, на вакуум-ротаторном испарителе до получения жидких экстрактов. Эффективность методов экстрагирования определяли по выходу экстрактивных веществ. При получении жидкого экстракта методом бисмацерации выход экстрактивных веществ составил 13,1%, методом перколяции 11,2%, методом реперколяции 12,8%

В результате сравнительных исследований установлено, что оптимальным методом получения жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного является бисмацерация. Полученный экстракт представляет собой жидкую массу буро-коричневого цвета с приятным специфическим запахом, горьковатого вкуса.

Для идентификации и количественного определения флавоноидов в составе жидкого экстракта полученного методом бисмацерации использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию. Систему фосфатного буфера и ацетонитрила использовали в качестве элюента [6,7]. Результаты идентификации и количественного определения флавоноидов содержащихся в жидком экстракте пиона лекарственного приведены в таблице 2. Изображения хроматограмм стандартного образца рутина представлена на рисунке 3, дигидрокверцетина на рисунке 4, кверцетина на рисунке 5, лютеолина на рисунке 6 и жидкого экстракта пиона лекарственного на рисунке 7.

Таблица 2 Результаты идентификации и количественного определения флавоноидов в жидком экстракте полученного из корней и корневищ пиона лекарственного

№	Флавоноиды	Жидкий экстракт
		Концентрация мг/гр
1	 Рутин	6,27
2	 Дигидрокверцетин	3,94
3	 Кверцетин	1,13
4	 Лютеолин	0,24

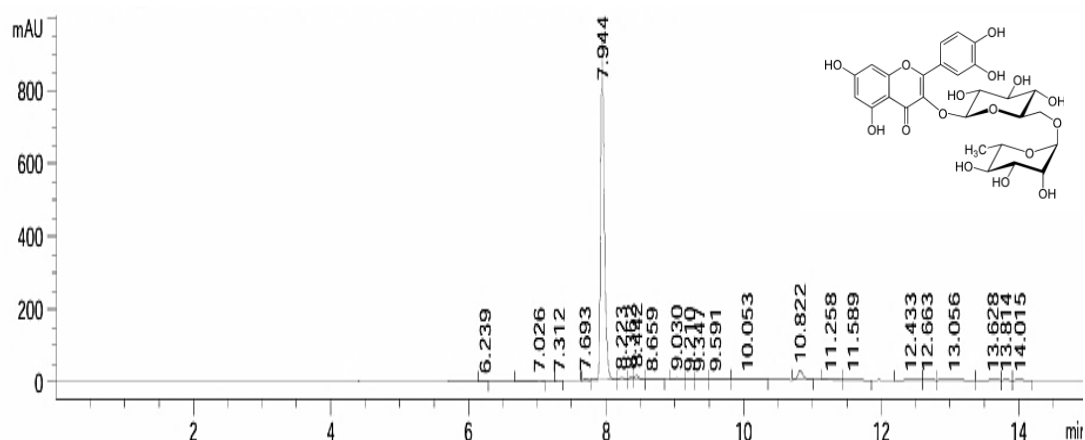


Рис 3. Хроматограмма стандартного образца рутина

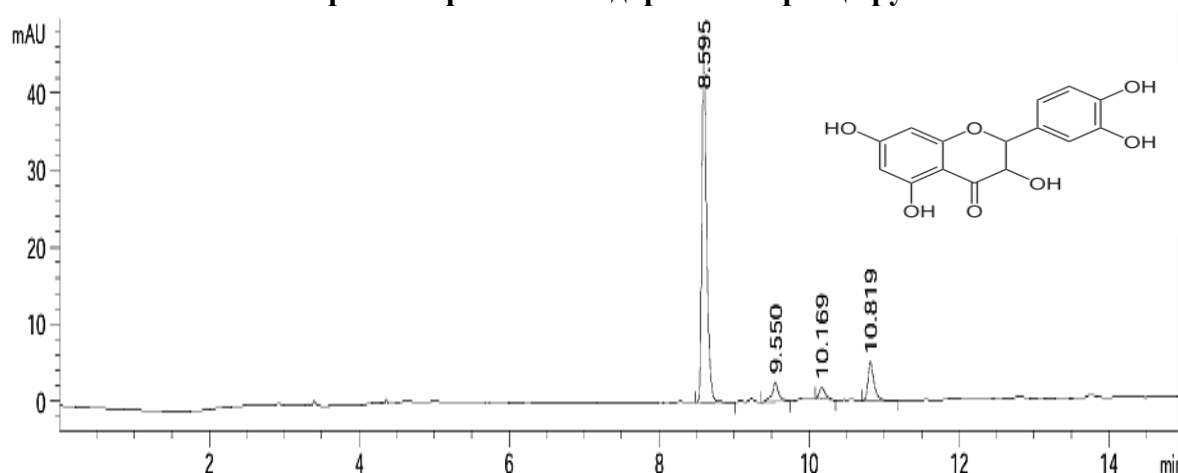


Рис 4. Хроматограмма стандартного образца дигидрокверцетина

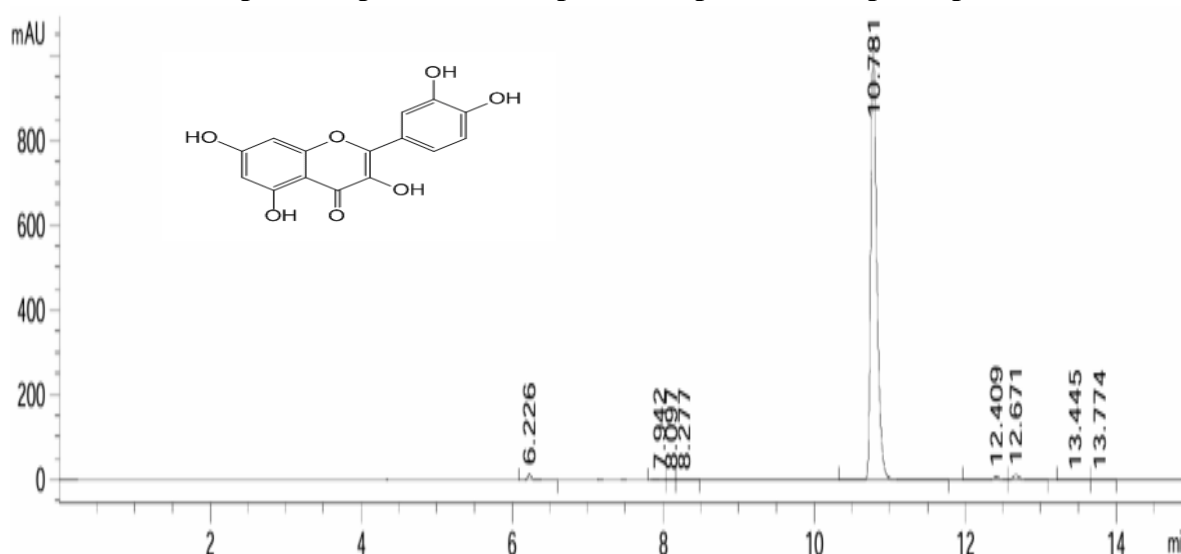


Рис 5. Хроматограмма стандартного образца кверцетина

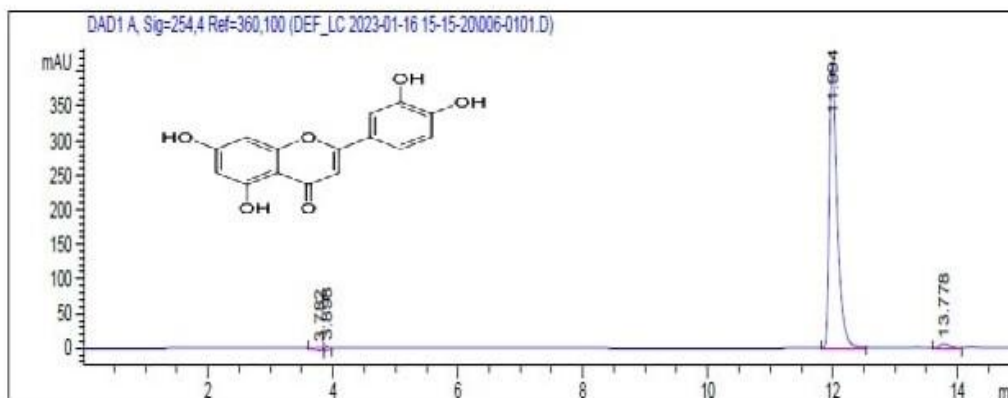


Рис. 6 Хроматограмма стандартного образца лютеолина

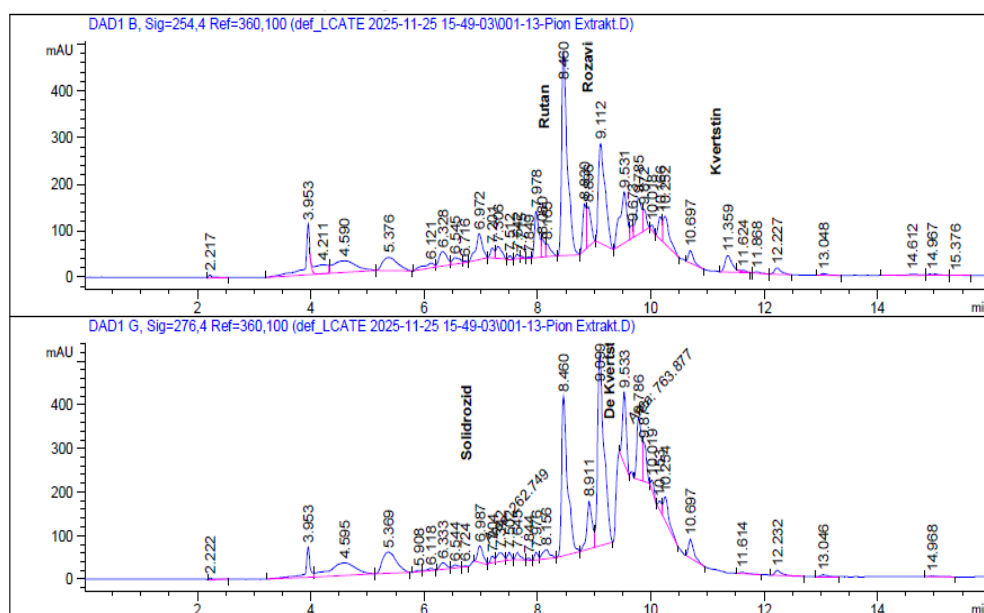


Рис. 7. Хроматограмма жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного

Закключение

Проведенные исследования позволили определить результативно - оптимальные значения параметров, влияющих на процесс извлечения биологически активных компонентов при получении жидкого экстракта из корней и корневищ пиона лекарственного с успокаивающим действием. На основании изучения свойств сырья и процесса экстрагирования метод бисмацерации, с использованием различных концентраций экстрагента 70%, 40% этанол, вода очищенная, признан как наиболее оптимальный.

Для идентификации и количественного определения флавоноидов разработаны условия проведения ВЭЖХ. В составе жидкого экстракта идентифицированы и

количественно определены такие флавоноиды, как рутин, дигидрокверцитин, кверцитин, лютеолин .

Список литературы

1. Исследование по созданию новых лекарственных средств на основе травы пиона садового / М. М. Смирнова [и др.] // Биофарм. журн. - 2016. - Т. 8, № 1. - С. 9 - 12.
2. Королева Л. Р. Фитотерапия при невротических расстройствах/ Л. Р. Королева, А. В. Покровская / Рос. мед. журн. - 2004. - № 4 - С. 26 - 29.
3. Александрова А.Е., Арзамасцев А.П., Багирова В.Л. и др. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация/ Санкт-Петербург, Спец Лит. 2001. 223с.
4. Денисенко Ю.О., Андреева И.Н., Денисенко О.Н., Федорова Е.П. и др. Влияние способа получения экстракционных препаратов из травы эхинацеи пурпурной на состав гидрооксикоричных кислот // Современные проблемы науки и образования. 2011. №6. С.3
5. Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Олейников Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) // Химия растительного сырья. 2008. №3. С. 65-68.
6. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2004. №1. С. 47-52.
7. Зиэп Т.Т., Жохова Е.В. Разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве пустырника спектрофотометрическим методом // Химия растительного сырья. 2007. №4. С. 73-77.