

Е. Н. Жукович, М. Ю. Семенова, Л. А. Шарикова, Т. Ф. Прибыткова

## К ВОПРОСУ О СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТОВ “ЧАГИ НАСТОЙКА” И “БЕФУНГИН”

ООО “Камелия НПП”, Московская обл., Лобня, Россия

Разработаны методики стандартизации препаратов “Чаги настойка” и “Бефунгин”, заключающиеся в выделении нефенольной фракции, содержащей преимущественно тетрациклические тритерпены, в т.ч. ланостерол и эргостерол, последующее спектрофотометрирование окрашенных комплексов с ванилином в кислой среде. Содержание тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол колеблется в “Чаги настойке” от 0,01 до 0,035 %; в “Бефунгине” — 0,01 – 0,02 %.

**Ключевые слова:** чага, стандартизация, окрашенный комплекс, спектрофотометрия, нефенольная фракция, тетрациклические тритерпены, ланостерол.

Чага — березовый гриб *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., сем. гименохетовых Hymenochaetaceae издавна используется в народной и научной медицине. Препараты чаги обладают общеукрепляющим, тонизирующим, противоопухолевым действием, применяются для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, послеоперационного лечения злокачественных новообразований, синдрома хронической усталости [1, 2].

В настоящее время в нашей стране производятся биологически активные добавки на основе экстрактов чаги: “Чаговит” в виде капсул и эликсира, “Экстрабе-сунгин”, бальзам “Березка”, таблетки “Литовит Ч”, сухой экстракт чаги, криопорошок. Большим спросом среди населения пользуются лекарственные препараты: “Чаги настойка” и “Бефунгин”. Дефицит этих препаратов связан прежде всего с тем, что предприятия-производители испытывают трудности, связанные с их стандартизацией. НД на “Бефунгин” (ФС 42-3991-83), “Чаги настойку” (ФС 42-659-94) и “Чагу” (ГФ XI, вып. 2, ст. 63) морально устарели и не отвечают современным требованиям. В этих статьях качественно и количественно определяют “Хромогенный комплекс” — понятие расплывчатое, химический состав его не расшифрован, метод определения гравиметрический.

Чага как объект химических исследований содержит комплекс биологически активных соединений различных классов, таких как фенольные вещества (в том числе полифенолы), алифатические кислоты (щавелевая, уксусная, муравьиная), а также ароматические (оксibenзойная и ванилиновая кислоты), кумарины (пеуциданин), липиды, тетрациклические тритерпены (инонотовая кислота, обликвиновая кислота, инотодиол, ланостерол), стероиды (эргостерол). В чаге содержатся микроэлементы в виде оксидов меди, бария, магния, алюминия, натрия, калия [1 – 5].

Выраженное фармакологическое действие чаги и ее препаратов, обусловленное содержанием различных классов биологически активных веществ, стимулирует углубленные химические исследования их состава. Предпринимаются попытки стандартизации препаратов чаги и сырья на современном уровне. Согласно исследованиям [6, 7] “Бефунгин” можно стандартизировать,

используя спектрофотометрию окрашенных комплексов свободных углеводов и свободных фенолов, присутствующих в препарате. Методика количественного определения свободных фенолов в хлороформной фракции положена в основу ФС. Существенным недостатком предложенных методик является то, что стандартизацию препарата проводят на основе веществ, не отвечающих за фармакологическую активность “Бефунгина”. Извлечение фракции свободных фенолов сопровождается образованием стойкой эмульсии, что не только затрудняет, но существенно искажает результат количественного анализа.

Таким образом, исходя из вышеизложенного, перед нами стояла задача разработать методики качественного и количественного анализа препаратов “Бефунгин”, “Чаги настойка” и сырья. При этом мы руководствовались положением о стандартизации препаратов на основе класса биологически активных веществ, определяющих их фармакологическую ценность. По данным доступной нам литературы биологической активностью в экстрактах чаги обладают тетрациклические тритерпены: инонотовая кислота, обликвиновая кислота, инотодиол и ланостерол. Инотодиол и ланостерол проявляют антибластическую (противоопухолевую) активность [1, 8, 9].

Проведенные нами исследования позволили выделить из препаратов и сырья нефенольные фракции с преимущественным содержанием тетрациклических тритерпенов и стероидов, в том числе ланостерол и эргостерол. Дальнейшая задача заключалась в получении стойкого окрашенного комплекса тетрациклических тритерпенов с ванилином в кислой среде и последующее спектрофотометрирование в сравнении с окрашенным комплексом ланостерола стандарта. Разработанные методики, основанные на получении нефенольной фракции тетрациклических тритерпенов, позволяют достоверно качественно и количественно охарактеризовать не только “Чаги настойку”, “Бефунгин”, водно-спиртовые и пропиленгликолевые экстракты, производимые ООО “Камелия НПП”, но и сырье — чагу. Приводим пропись методики качественного и количественного определения суммы тетрациклических тритерпенов (в пересчете на ланостерол) на примере “Чаги настойки”.

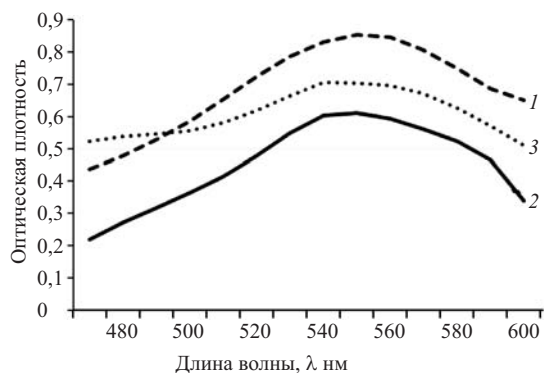


Рис. 1. УФ-спектры окрашенных комплексов ланостерола, настойки чаги и “Бефунгина”: 1 — настойка чаги, 2 — ланостерол, 3 — бефунгин.

### Экспериментальная часть

**Количественное определение тетрациклических тритерпенов в “Чаги настойке”.** В круглодонную колбу вместимостью 250 мл помещают 100 мл настойки, концентрируют до объема около 50 мл. Сгущенный экстракт количественно переносят в делительную воронку, колбу дважды промывают водой порциями по 10 мл. Промывные воды присоединяют к основному экстракту. Прибавляют 70 мл этилового эфира и встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения слоев эфирное извлечение отделяют. Экстракцию эфиром повторяют еще 3 раза порциями  $2 \times 70$  и  $1 \times 30$  мл. Объединенное эфирное извлечение доводят под вакуумом до объема около 60–70 мл, помещают в делительную воронку и обрабатывают 5 % раствором едкого натра порциями по 10 и 5 мл. После разделения фаз щелочной раствор, содержащий фенольные соединения, отбрасывают. В эфирном извлечении остаются вещества нефенольного характера, в том числе тетрациклические тритерпены и стероиды. Эфирную фракцию дважды промывают водой порциями по 5 мл. Фильтруют через бумажный фильтр с 5 г безводного сульфата натрия. Фильтр промывают 5 мл эфира. Эфирное извлечение выпаривают под вакуумом до сухого остатка и получают очищенную фракцию тетрациклических тритерпенов. Сухой остаток растворяют в 20 мл 96 % этилового спирта, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл раствора А и доводят до метки этиловым спиртом 96 % (раствор Б).

В пробирку с притертой пробкой вместимостью 15 мл помещают 1 мл раствора Б, прибавляют 1 мл 10 % раствора ванилина в 96 % спирте, встряхивают. Добавляют 5 мл 72 % раствора серной кислоты. Со-

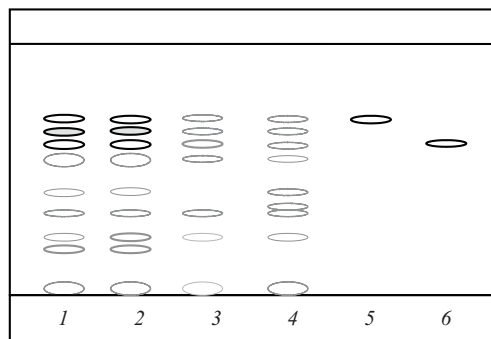


Рис. 2. Схема хроматограммы очищенных фракций тетрациклических тритерпенов из сырья чаги и экстрактов на ее основе в системе растворителей хлороформ — метанол (25:1): 1 — настойка чаги, 2 — сырье чаги (извлеч.), 3 — бефунгин, 4 — пропиленгликолевый экстракт, 5 — ланостерол, 6 — эргостерол.

держимое пробирки выдерживают при температуре  $60^\circ\text{C}$  в течение 10 мин, и затем охлаждают до комнатной температуры.

Оптическую плотность окрашенного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны  $550 \pm 5$  нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (рис. 1).

Для приготовления раствора сравнения в пробирку помещают 1 мл спирта этилового 96 %, добавляют 1 мл 10 % раствора ванилина в спирте этиловом 96 % и 5 мл 72 % раствора серной кислоты. Далее поступают так же, как и с испытуемым раствором.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного раствора ланостерола. В пробирку с притертой пробкой помещают 1 мл раствора СО ланостерола (Sigma-Aldrich, L5768, 2008), прибавляют 1 мл 10 % раствора ванилина и 5 мл 72 % серной кислоты. Далее поступают так же, как и с испытуемым раствором.

Содержание тетрациклических тритерпенов в препарате в пересчете на ланостерол рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_{\text{лан}} \cdot 1}{D_{\text{лан}} \cdot 50 \cdot (1+1+5)}; \frac{100 \cdot 5 \cdot 1}{100 \cdot 25 \cdot (1+1+5)} \times 100 = \frac{D \cdot m_{\text{лан}} \cdot 10}{D_{\text{лан}}}$$

где  $D$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $D_{\text{лан}}$  — оптическая плотность раствора СО ланостерола;  $m_{\text{лан}}$  — навеска стандартного образца ланостерола, г.

### Примечание

**1. Приготовление раствора СО ланостерола.** Около 0,008 г (точная навеска) СО ланостерола растворяют при слабом нагревании в 20 мл 96 % этилового спирта в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводят этим же растворителем до метки. Срок годности раствора — 1 мес.

Таблица 1

Метрологические характеристики метода количественного определения содержания тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол в нефенольной фракции “Чаги настойки”

$n$	$f(n-1)$	$\bar{x}$	$S^2$	$\pm S$	$P, \%$	$t_{(p,f)}$	$\pm \Delta X$	$\pm E \%$
10	9	0,0225	$2,62 \cdot 10^{-7}$	$5,12 \cdot 10^{-4}$	95	2,26	$1,157 \cdot 10^{-3}$	5,14

Таблица 2

## Результаты опытов с добавками ланостерола

Найдено тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол, г	Добавлено ланостерола, г	Рассчитано, г	Найдено, г	Относительная погрешность, %
0,0225	0,0203	0,0428	0,0415	3,04
	0,0148	0,0373	0,0356	4,56
	0,0105	0,0330	0,0314	4,85

**2. Приготовление 10 % раствора ванилина.** В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1 г ванилина (ТУ 6-09-10-544–76), растворяют в 5 мл этилового спирта 96 % при слабом нагревании и после охлаждения доводят полученный раствор спиртом 96 % до метки.

**3. Приготовление 72 % раствора серной кислоты.** К 28 мл бидистиллированной воды прибавляют 72 мл кислоты серной концентрированной. Срок хранения раствора 1 мес.

Метрологические характеристики метода количественного определения содержания тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол в “Чаги настойке” представлены в табл. 1.

Метрологический анализ методики показал, что относительная погрешность единичного определения при доверительном уровне 95 % составляет 5,14 %.

Отсутствие систематической ошибки было доказано опытами с добавлением ланостерола (табл. 2).

Содержание тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол в нефенольной фракции “Чаги настойки” колеблется от 0,01 до 0,035 %.

**Определение подлинности “Чаги настойки”**

Сгущают под вакуумом 80 мл раствора А, приготовленного для количественного определения, до объема 1 – 2 мл (раствор 1). 40 мл раствора СО ланостерола сгущают под вакуумом до объема 1 – 2 мл (раствор 2). По 0,02 мл растворов 1 и 2 наносят на пластинку Сорбфил ПТСХ-П-В-УФ размером 10 × 10 см полосой около 2 см. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру со смесью растворителей хлороформ — метанол (25:1) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет 8 см, пластинку вынимают из камеры, высушивают под тягой и обрабатывают реактивом Ли-

бермана — Бурхарда. На хроматограмме проявляются 9 – 11 зон желтого и серо-фиолетового цвета. Зона желтого цвета на уровне свидетеля СО ланостерола с  $R_f$  около 0,8 соответствует ланостеролу во фракции тетрациклических тритерпенов настойки чаги (рис. 2).

**Примечание. Приготовление реактива Либермана — Бурхарда.** К 20 мл охлажденного уксусного ангидрида медленно при помешивании добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты. Раствор хранят при 5 – 6 °С в течение 3 дней.

Испытания препарата “Бефунгин” показали, что содержание очищенной фракции тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол колеблется от 0,01 до 0,02 %. Исследования проводили на “Бефунгине” производства ОАО “Татхимфармпрепараты”, ЗАО “Вифитех” и ООО “Камелия НПП” (опытные партии).

Содержание тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол в пропиленгликолевых экстрактах составляет около 0,02 %.

Проведенные исследования сырья чаги выявили, что содержание тетрациклических тритерпенов в пересчете на ланостерол в нефенольной фракции колеблется от 0,35 до 0,8 % в пересчете на абсолютно сухое сырье.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. К. Р. Саакян, К. Ф. Ващенко, Р. Е. Дармограй, *Провизор*, вып. 16, (2004)
2. М. Я. Шишкина, П. Н. Шишкин, А. Б. Сергеев, *Хим.-фарм. журн.*, **40**(10), 37 – 44 (2006).
3. Г. П. Рыжова, С. С. Кравцова, С. С. Матасова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **31**(10), 44 – 47 (1997).
4. W. Mazurkiewicz, *Acta Poloniae Pharm. – Drug Res.*, **63**(6), 497 – 501 (2006).
5. М. А. Сысоева, В. Р. Хабибрахманова, В. С. Гамаюрова, Э. Ф. Зайнетдинова, *Химия растит. сырья*, № 1, 111 – 114 (2008).
6. В. Г. Беликов, Е. А. Калашникова, *Материалы VII Международного съезда Фитофарм 2003 “Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения”*, Санкт-Петербург – Пушкин (2003), сс. 321 – 323.
7. В. Г. Беликов, Е. А. Калашникова, *Материалы VII Международного съезда Фитофарм 2003 “Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения”*, Санкт-Петербург – Пушкин (2002), сс. 178 – 182.
8. K. Kahlos, R. Hiltunen, V. Schfintz, *Planta Med.*, **50**(2), 197 – 198 (1984).
9. T. Tajis Yamada, S. Wada, H. Tokuda, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, (2008).

Поступила 18.06.09

**TO STANDARDIZATION OF CHAGA TINCTURE AND BEFUNGIN PHYTOPREPARATIONS**

E. N. Zhukovich, M. Yu. Semenova, L. A. Sharikova, and T. F. Pribytkova

“Kameliya” Research and Production Enterprise, Lobnya, Moscow oblast, Russia

Methods for standardization of Chaga tincture and Befungin preparations have been developed, which are based on the isolation of a nonphenolic fraction containing predominantly tetracyclic triterpenoids (lanosterol and ergosterol) followed by the formation and spectrophotometric analysis of stable colored complexes with vanillin in an acid medium. The content of tetracyclic triterpenoids has been established at 0.01 – 0.035% in Chaga tincture, 0.01 – 0.02% in Befungin, and 0.35 – 0.8% in the initial Chaga raw material.

**Key words:** Chaga, Befungin, standardization, steady colored complex, nonphenolic fraction, tetracyclic triterpenoids, lanosterol