

М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЦВЕТКОВ РОМАШКИ

Пятигорская государственная фармацевтическая академия, Пятигорск, Россия

С целью совершенствования методов контроля качества и выбора наиболее объективных критериев качества ромашки цветков изучена возможность использования метода капиллярного электрофореза. Установлено, что в качестве ведущего электролита целесообразно использовать раствор натрия тетрабората с концентрацией 10 мг/мл и вести разделение при напряжении 20 кВ. В ходе работы выявлено, что одним из основных флавоноидов является апигенин-7-О-гликозид, содержание которого варьирует от 0,17 до 0,36 %.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, ромашки цветки, апигенин-7-О-гликозид.

В отечественной фармацевтической практике качество цветков ромашки аптечной нормируется по содержанию эфирного масла. Вместе с тем содержание эфирного масла достаточно мало, а его биологическая доступность и биологическая активность мало изучены. Не случайно фармакопеи США и Великобритании предлагают вести оценку качества данного вида сырья по содержанию основных флавоноидов, в частности апигенина и апигенин-7-О-гликозида. В данном сырье также присутствуют апигенин-7-О-(6"-малонил)гликозид, апигенин-7-О-(6"-каффеоил)гликозид, апигенин-7-О-(4"-ацетил-6"-малонил)гликозид и др. [1]. Выбор этих флавоноидов для оценки качества сырья не является случайным, так как именно апигенин и его производные обеспечивают противоопухолевое действие ромашки [2 – 4]. Для этого сырье экстрагируется спиртом этиловым, а затем полученное извлечение анализируется методом ВЭЖХ с применением градиентного элюирования. Как правило, используется ступенчатый градиент, вначале содержащий не более 25 % органического растворителя (метанола или ацетонитрила).

Несмотря на все достоинства метода ВЭЖХ, представляло интерес использовать для оценки качества данного сырья метод капиллярного зонного электрофореза, который благодаря своей экономичности и высокой эффективности с успехом может применяться для анализа сложных биологических компонентов, в том числе содержащих флавоноиды [5 – 7].

Целью настоящей работы являлась разработка методики количественного определения апигенин-7-О-гликозида и апигенина в ромашки цветках.

Для исследования использовали стандартные образцы апигенина и апигенин-7-О-гликозида (Sigma), а так же сырье, собранное в районе Кавказских Минеральных Вод (КМВ) в 2006 г., и фасованное от таких поставщиков как ОАО "Красногорсклексредства" и ЗАО "Кубаньлектравы". Все сырье соответствовало требованиям нормативной документации. Работу проводили с использованием системы капиллярного электрофореза Капель 103 Р (НПФ Льюмэкс, Санкт-Петербург) с кварцевым капилляром диаметром 50 мкм, общей длиной 75 см и эффективной длиной 65 см. Для подготовки капилляра и восстановления его поверхности проводили его последовательную промывку водой,

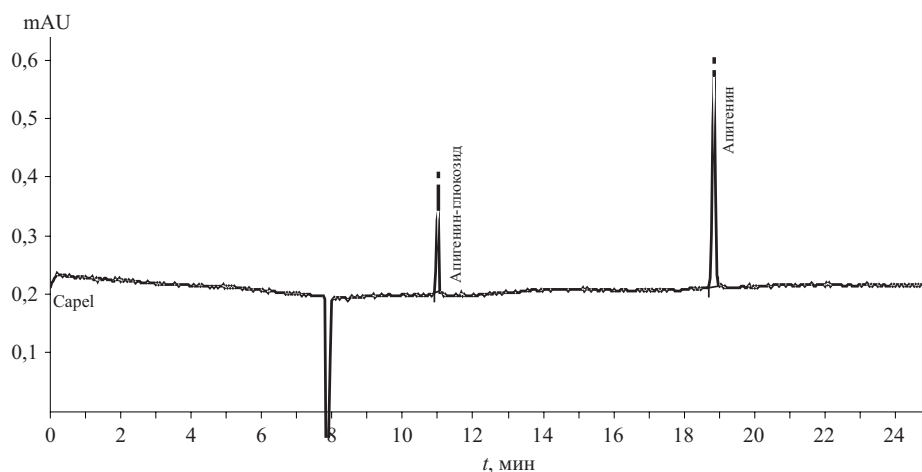


Рис. 1. Электрофореграмма раствора стандартных образцов апигенина и апигенин-7-гликозида.

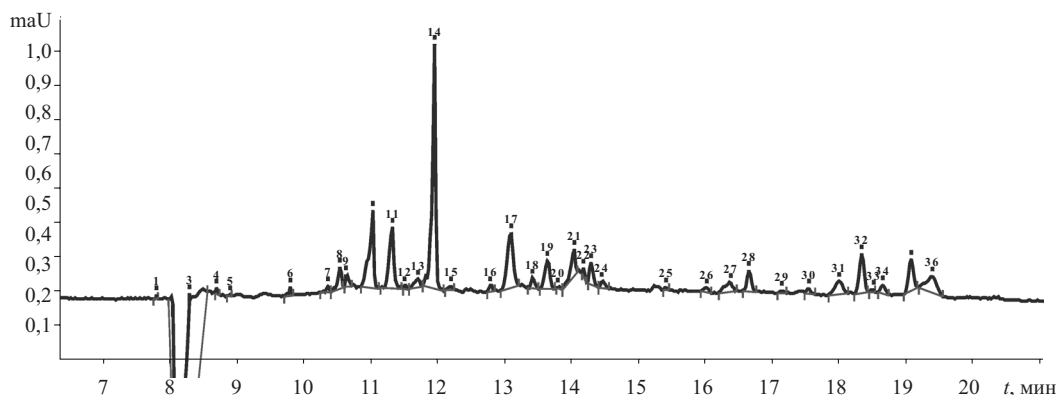


Рис. 2. Электрофореграмма извлечения из ромашки цветков

1 М раствором натрия гидроксида, водой, 1 М раствором кислоты хлороводородной, водой и затем ведущим электролитом. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм в катодной области капилляра. Работу проводили при комнатной температуре. В качестве ведущего электролита использовали раствор натрия тетрабората (10 и 20 мг/мл), ввод пробы осуществляли давлением — 150 мБар · с. Для анализа 1 г сырья экстрагировали 50 мл спирта этилового 70 % на кипящей водяной бане в течение 1 ч, затем охлаждали, доводили до первоначального объема и центрифугировали при 8000 мин⁻¹, в течение 10 мин.

Предварительно было проведено изучение влияния концентрации ведущего электролита и напряжения на некоторые характеристики пиков апигенина и его гликозида. Полученные результаты представлены в табл. 1 – 2 и рис. 1.

Как следует из представленных данных, во всех случаях эффективность возрастает с увеличением напряжения, однако при этом существенно уменьшаются площади пиков, что неизбежно должно привести к увеличению величины случайной погрешности. Увеличения площадей пиков можно достичь с помощью повышения концентрации ведущего электролита, но при этом падает эффективность, что также приводит к возрастанию величины случайной погрешности. Кро-

ме того, увеличение концентрации ведущего электролита приводит к существенному возрастанию времени анализа. В то же время для большей скорости электрофореза целесообразно увеличивать напряжение. Таким образом, концентрация электролита и напряжение противоположным образом влияют на электрофретические свойства веществ. Поэтому в данном случае представляется весьма затруднительным обосновать условия анализа. Следует отметить, что в доступной литературе по капиллярному электрофорезу нет обобщающих сведений по методологии выбора оптимальных условий анализа фенольных соединений.

В этой связи актуальным представляется поиск и обоснования алгоритма выбора условий анализа. В данном случае можно считать более целесообразным использование буфера с концентрацией 10 мг/мл, так как увеличение концентрации существенно снижает эффективность, что нежелательно при анализе извлечений из растительного сырья, характеризующегося большим количеством пиков и существенной вариабельностью. Также можно считать оптимальным напряжение в 20 кВ, так как при увеличении напряжения сокращается время анализа, что может привести к ухудшению разделения пиков, несмотря на увеличение эффективности. В данных условиях были получены электрофореграммы извлечений из различных образцов сырья (рис. 2).

Таблица 1
Влияние концентрации ведущего электролита на характеристики подвижности апигенин-7-гликозида (0,01 мг/мл), n = 6

Показатель	Напряжение, кВ		
	15	20	25
Концентрация электролита, мг/мл	10		
Эффективность	330000	380000	420000
Асимметрия	0,80 – 0,85	0,80 – 0,85	0,80 – 0,85
Время миграции, с	910 – 915	670 – 680	530 – 540
Площадь пика	0,35	0,25	0,21
Концентрация электролита, г/л	20		
Эффективность	270 000	280 000	390000
Асимметрия	0,85 – 0,90	1,02 – 1,07	0,60 – 0,70
Время миграции, с	1190 – 1220	895 – 1100	600 – 740
Площадь пика	0,50	0,45	0,32

Влияние концентрации ведущего электролита на характеристики подвижности апигенина (0,01 мг/мл); $n = 6$

Напряжение, кВ	15	20	25
Концентрация электролита, мг/мл		10	
Эффективность	190000	290000	340000
Асимметрия	0,99 – 1,02	1,0 – 1,05	0,95 – 1,05
Время миграции, с	1500 – 1600	1000 – 1100	700 – 800
Площадь пика	0,50	0,40	0,35
Концентрация электролита, мг/мл		20	
Эффективность	120000	150000	180000
Асимметрия	0,99 – 1,02	1,1 – 1,2	0,98 – 1,03
Время миграции, с	2800 – 2900	2050	1200
Площадь пика	2,40	1,80	1,10

При этом установлено, что профиль электрофореграмм в основном одинаков для всех образцов сырья.

Следующим этапом работы стало количественное определение этих соединений в сырье. Для этого предварительно было изучено наличие линейной зависимости между площадью пика и концентрацией анализируемого раствора. При этом установлено, что для изучаемых соединений линейность соблюдается в интервале 0,01 – 0,15 мг/мл. Результаты количественного определения основных флавоноидов ромашки цветков, проведенные с использованием градуировочных графиков, представлены в табл. 3.

Таким образом, разработана методика количественного определения апигенин-7-О-гликозида и апигенина в цветках ромашки методом капиллярного электрофореза. С помощью варьирования концентрации ведущего электролита и напряжения в системе выбраны оптимальные условия анализа основных флавоноидов ромашки цветков. Благодаря своей экономичности и высокой эффективности метод капиллярного электрофореза может быть альтернативой методу ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. V. Švehliková, M. Repčák, *Biochem. Systematics Ecology*, **34**, 654 – 657 (2006).

USE OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR ESTIMATING THE QUALITY OF CHAMOMILE HERBS

M. V. Gavrilin and S. P. Senchenko

Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Stavropol region, 357500 Russia

With the aim of improving the quality control and selecting the most objective criteria of quality of chamomile flowers, the possibility of using the method of capillary electrophoresis was studied. It is established that an aqueous solution of sodium tetraborate with a concentration of 10 mg/ml should be used as the leading electrolyte and the separation can be performed at a voltage of 20 kV. Experiments showed that one of the main flavonoids in these herbs is apigenin-7-O-glucoside, the content of which varies from 0.17 to 0.36%.

Key words: capillary electrophoresis, Chamomile flower, apigenin-7-O-glucoside.

Таблица 3
Результаты количественного определения апигенин-7-О-гликозида и апигенина в цветках ромашки, %

Происхождение сырья	Апигенин-7-гликозид	Апигенин
КМВ	0,359 ± 0,018	0,046 ± 0,002
ОАО “Красногорсклек-средства”	0,205 ± 0,010	0,049 ± 0,003
ЗАО “Кубаньлектравы”	0,174 ± 0,009	0,028 ± 0,001

2. S. Balasubramanian, L. Zhu, R. L. Eckert, *J. Biol. Chem.*, **281**, 36162 – 36172 (2006).
3. M. B. Ujiki, X-Z. Ding, M. R. Salabat, et al., *Mol. Cancer*, **5**, 1476 – 1498 (2006).
4. V. Trochon, E. Blot, F. Cymbalista, *Inter. J. Cancer*, **85**, 691 – 696 (2000).
5. S.-P. Wang, K.-J. Huang, *J. Chromatogr. A*, **1032**, 273 – 279 (2004).
6. T.-F. Jiang, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 854 – 858 (2007).
7. Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев, *Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза “КАПЕЛЬ”*, Веда, СПб. (2006).

Поступила 28.08.07