

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования "Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

Медико-психолого-фармацевтический факультет  
Кафедра фармацевтической технологии и фармакогнозии с курсом ПО

Курсовая работа по фармакогнозии

Тема: «Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего  
витамины»

Выполнил:

Студент 453 группы

Беллер Олеся Вячеславовна

Проверил: КФармН

Савельева Елена Евгеньевна

  
7.11.2019  
СН

Красноярск 2019г.

## Оглавление

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Введение.....                                                                                                           | 3  |
| 1. Общая характеристика лекарственного растительного сырья, содержащего витамины .....                                  | 4  |
| 2. Оценка качества лекарственного растительного сырья, содержащего витамины. Методы анализа.....                        | 8  |
| 3. Перспективный метод количественного определения филлохинона (витамина K <sub>1</sub> ) в растительных объектах. .... | 11 |
| Заключение .....                                                                                                        | 16 |
| Список использованной литературы .....                                                                                  | 17 |

## **Введение**

В настоящее время практически все витамины получают синтетическим путем. Однако витаминосодержащие лекарственные растения не утратили своего значения. Они широко используются, особенно в педиатрии, в гериатрии и для лечения лиц, склонных к аллергическим заболеваниям, поскольку:

- во-первых, витамины в лекарственном растительном сырье находятся в комплексе с полисахаридами, сапонинами, флавоноидами, поэтому такие витамины легче усваиваются;

- во-вторых, растительные витамины реже дают аллергические реакции, чем их синтетические аналоги;

- в-третьих, в организме человека есть специальные системы защиты от передозировки витаминов (например, каротин в организме человека превращается в витамин А по мере необходимости).

В связи с этим в последнее время все возрастает актуальность применения и, следовательно, анализа лекарственного растительного сырья, содержащего витамины, что объясняет актуальность и научное значение цели данной работы.

Цель данной курсовой работы – изучить основные аспекты анализа лекарственного растительного сырья, содержащего витамины.

Задачами работы являлось изучение следующих вопросов:

1. Общая характеристика лекарственного растительного сырья, содержащего витамины;

2. Оценка качества лекарственного растительного сырья, содержащего витамины. Методы анализа;

3. Перспективный метод количественного определения филлохинона (витамина К1) в растительных объектах.

## **1. Общая характеристика лекарственного растительного сырья, содержащего витамины**

Витамины – органические вещества различной химической природы, не образующиеся в достаточном количестве клетками человеческого организма, но необходимые для его нормальной жизнедеятельности. Витамины проявляют биологическую активность в очень малых концентрациях. Они выполняют функции регуляторов обмена веществ. Большинство витаминов входит в состав ферментов, являясь их коферментами [4, 10].

Классификация витаминов и витаминосодержащего лекарственного растительного сырья.

Существует несколько классификаций витаминов.

1. Буквенная классификация - первая в историческом плане. При обнаружении новых факторов витаминной природы им присваивали условные названия в виде буквы латинского алфавита. Например: витамины А, В, С, D и др.

2. Фармакологическая классификация. Эта классификация вводилась параллельно с буквенной и указывала на заболевание, от которого предохраняет витамин:

- витамин С - противцинготный;
- витамин К - антигеморрагический;
- витамин D - антирахитический и др.

3. Химическая классификация. В зависимости от химической структуры выделены группы:

- витамины алифатического ряда - С, F и др.;
- витамины алициклического ряда - А, D и др.;
- витамины ароматического ряда - К и др.;
- витамины гетероциклического ряда - Е, Р и др.

4. Классификация по растворимости витаминов:

- водорастворимые витамины – группы В, С, Р, Н, РР;
- жирорастворимые витамины - А, D, Е, К, F, U [5, 12].

Витамины содержатся во всех растениях, но витаминосодержащими называют только те растения, которые избирательно накапливают витамины в дозах, способных оказать выраженный фармакологический эффект. Это в 500-1000 раз больше, чем в других растениях.

Физические свойства. В чистом виде витамины - кристаллические вещества или жидкости белого, желтого, оранжевого или красного цвета, имеющие специфический вкус, без характерного запаха. В основу их первой классификации положена растворимость в воде или жирах. В настоящее время установлено, что витамины - индивидуальные вещества различных химических классов.

Химические свойства. Строение витаминов изучено сравнительно недавно. Оказалось, что витамин С относится к классу кислот, витамин А - к первичным спиртам, витамины группы D - производные высокомолекулярных спиртов стеринов. Если витамин С имеет углеводный характер строения, то витамин D относится к сложным стероидным или гормоноподобным соединениям. В растениях витамины встречаются иногда в виде провитаминов, например каротин - провитамин А, состоящий из двух молекул витамина А.

Заготовка. Собирают сырье в фазе максимального накопления преобладающего витамина. В плодах шиповника это витамин С, хотя в них содержатся также витамины группы В, витамин Е и др. Сырье заготавливают в сухую погоду, сушат в день сбора. Витамины - относительно стойкие соединения и сушка допускается при температуре 70-90°C [6, 11].

Хранение. В сухом, хорошо проветриваемом помещении, оберегая от действия факторов окружающей среды и вредителей.

Лекарственное растительное сырье, содержащее витамины, и лекарственные средства на его основе обладают широким спектром фармакологического действия. Действие обусловлено витаминами и другими

биологически активными веществами, содержащимися в сырье: флавоноидами, дубильными веществами и др.

Действие витаминов заместительное (восполняющее витаминную недостаточность), либо фармакологическое (влияющее на течение ферментативных процессов, повышающее иммунные, защитные силы).

Например: введение в организм витамина С повышает фагоцитарную активность лейкоцитов. Витамин С усиливает фармакологическое действие лекарственных веществ и снижает их побочное токсическое действие. Каротиноиды оказывают противовоспалительное и ранозаживляющее действие.

В медицине витамин С применяется для лечения гиповитаминозов, инфекционных заболеваний, при кровотечениях, болезнях печени и почек.

Наиболее доступными источниками витамина С являются разные виды растений, в которых его содержание различно. Лидером по содержанию аскорбиновой кислоты являются отдельные виды рода Шиповник (*Rosa*).

Такие как шиповник майский (*Rosa majalis* Hermn.), шиповник иглистый (*Rosa acicularis* Lindl.), шиповник морщинистый (*Rosa rugosa* Thund.), шиповник даурский (*Rosa davurica* Pall.), шиповник Беггера (*Rosa beggeriana* Schrenk), шиповник Федченко (*Rosa fedtschenkoana* Regel). Эти виды встречаются в лесах, на полях, около дорог, отдельными кустами или группами.

Некоторые из них культивируют, чаще шиповник морщинистый и коричневый в европейской части страны.

В качестве источника витамина С так же могут использоваться низковитаминные виды, например шиповник собачий, или роза собачья (*Rosa canina* L.). Для этой цели собирают плоды, которые сушат и из них готовят настой, чай или отвар [14].

Лекарственное растительное сырье, содержащее витамины, используют как:

- поливитаминные средства — плоды черной смородины, плоды рябины обыкновенной, плоды шиповника, листья крапивы;

- кровоостанавливающие средства – цветки и листья зайцегуба, листья крапивы, кора калины, трава пастушьей сумки, трава тысячелистника;
- ранозаживляющие и противоязвенные средства — масло облепихи и масло шиповника, трава череды, трава сушеницы топяной;
- противовоспалительное и антисептическое средство — цветки календулы;
- противовоспалительное и противоаллергическое средство — трава череды;
- желчегонные средства — кукурузные столбики с рыльцами, плоды шиповника;
- мочегонные средства — плоды и листья земляники, трава череды [7, 13].

## **2. Оценка качества лекарственного растительного сырья, содержащего витамины. Методы анализа.**

Согласно существующей нормативной документации подтверждают присутствие витамина К<sub>1</sub> только в листьях крапивы. Метод определения хроматографический. Определение основано на способности витамина К<sub>1</sub> флуоресцировать в УФ-свете. Экстрагируют из растительного сырья витамин К<sub>1</sub> гексаном. Хроматографическое разделение проводят восходящим способом на пластинке «Силуфол» при температуре 40-70 °С. Система растворителей: бензол — петролейный эфир (1:1). Готовую хроматограмму высушивают на воздухе 2-3 мин и выдерживают в УФ-свете при длине волны 360 нм в течение 2 мин, должно появиться пятно с желто-зеленой флуоресценцией. Количественное определение витамина К<sub>1</sub> в сырье не проводится [1].

Качественное и количественное определение содержания витамина С в лекарственном растительном сырье связано с использованием натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята. Для количественного определения кислоты аскорбиновой в плодах шиповника навеску сырья экстрагируют горячей водой и аликвоту экстракта титруют раствором реактива, который имеет синий цвет. Кислота аскорбиновая способна окисляться до дегидроформы раствором натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята и восстанавливать последний до лейкоформы (стадия 1). Точка эквивалентности устанавливается появлением розового окрашивания, не исчезающего в течение 30-60 сек, которое свидетельствует об отсутствии восстановителя, т.е. кислоты аскорбиновой (2,6-дихлорфенолиндофенол имеет в щелочной среде синее окрашивание, в кислой — красное, а при восстановлении обесцвечивается) (стадия 2).

Для качественного определения часть водного экстракта хроматографируют на пластинках «Силуфол» или «Сорбфил», высушивают и обрабатывают указанным реактивом (нанеся одновременно раствор свидетеля — чистой кислоты аскорбиновой) — пятна кислоты аскорбиновой выглядят бесцветными на синем фоне [15, 16].

Существуют исследования по определению содержания аскорбиновой кислоты по методу Тильманса.

Этот метод основан на способности АК окисляться 2,6-дихлорфенолиндофенолом в ДАК. Определение проводили путём титрования исследуемой жидкости 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола в кислой среде, предохраняющей аскорбиновую кислоту от разрушения.

В результате проведённых исследований было отмечено, что наибольшее содержание аскорбиновой кислоты в свежих плодах и составило 1670 мг/100г. Уменьшение количества кислоты происходит по мере воздействия на сырьё различных факторов. Так, после сушки наблюдается незначительное уменьшение витамина С, которое было равно 1402 мг/100г. Под действием высоких температур, аскорбиновая кислота разрушается, что приводит к снижению её и содержания в жидком сырье. В настое определённое количественное содержание аскорбиновой кислоты составило 991 мг/100г, в отваре 122 мг/100 г. Как в настое, так и в отваре содержание витамина заметно снижается, что объясняется продолжительным действием высокой температуры при их приготовлении [8].

Для качественного обнаружения каротиноидов можно использовать химические реакции и хроматографию на силикагеле. Каротиноиды извлекают из сырья хлороформом и к хлороформному извлечению прибавляют кислоту серную концентрированную (синее окрашивание, переходящее в слой кислоты серной) или кислоту азотную концентрированную (синее окрашивание, переходящее в зеленое и грязно-желтое). Хроматограммы проявляют 10 % этанольным раствором кислоты фосфорномолибденовой, нагревают в сушильном шкафу при температуре 60-80°C несколько минут. На желто-зеленом фоне появляются синие пятна каротиноидов.

Для количественного определения каротиноидов в лекарственном сырье используют фотоколориметрический или спектрофотометрический методы. В качестве стандарта применяют раствор калия бихромата. Из сырья каротиноиды извлекают абсолютным спиртом, петролейным эфиром.

Извлечения высушивают над безводным натрия сульфатом перед определением оптической плотности [3].

### **3. Перспективный метод количественного определения филлохинона (витамина К<sub>1</sub>) в растительных объектах.**

Витамин К относится к классу жирорастворимых витаминов, влияющих на систему гемостаза. К природным витаминам группы К относятся два типа метилированных хиноидных соединений с боковыми цепями, представленными изопреноидными звеньями: витамины К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub>. В основе структуры указанных витаминов лежит система 1,4-нафтохинона. Витамин К<sub>1</sub> (филлохинон) синтезируется всеми фотосинтезирующими организмами.

Витамин К<sub>2</sub> (менахинон) синтезируется микрофлорой толстого кишечника. Биологическая роль витаминов группы К заключается в активации факторов свертывающей и противосвертывающей систем млекопитающих.

В Государственной фармакопее, в настоящее время, отсутствуют методики определения филлохинона в растительном сырье. Для оценки целесообразности использования лекарственного растительного сырья в качестве источников витамина К<sub>1</sub>, актуальной проблемой является решение вопросов стандартизации и разработки методик, направленных на определение содержания филлохинона в растительных объектах.

Лукша и др. (2014) [9] провели следующие исследования разработки методики определения витамина К<sub>1</sub> в лекарственном растительном сырье.

Объектами исследования являлись официальные виды лекарственного растительного сырья: кора калины, столбики с рыльцами кукурузы, листья крапивы, трава пастушьей сумки. Все виды сырья были приобретены через аптечные сети. Выбор рационального способа определения витамина К<sub>1</sub> проводили на основании оценки валидационных характеристик, полученных с помощью хроматографических и спектрофотометрических методов анализа.

Для разработки методики количественного определения филлохинона в растительном сырье использовали метод обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) с диодно-матричным детектором на приборе Shimadzu LC-20 Prominence в

изократическом режиме в следующих условиях: аналитическая колонка, заполненная сорбентом PerfectSil 300 ODS C18, 4,6x250 мм, с размером частиц 5 мкм; состав подвижной фазы: ацетонитрил–изопропанол-вода в соотношении 75:20:5; детектирование при длине волны 254 нм; температура колонки – комнатная; скорость подвижной фазы 1 мл/мин; объем вводимой пробы 20 мкл.

Оценку результатов проводили по величине времени удерживания ( $t_r$ ) филлохинона, совпадающим с показателем  $t_r$  PCO (20,00±1,00 мин.) и по величине площади пика филлохинона. Обработку результатов производили с использованием программного обеспечения LC Solutions.

Спектрофотометрическое определение содержания витамина  $K_1$  проводили на приборе UNICO 2802S в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см (рисунок 1).

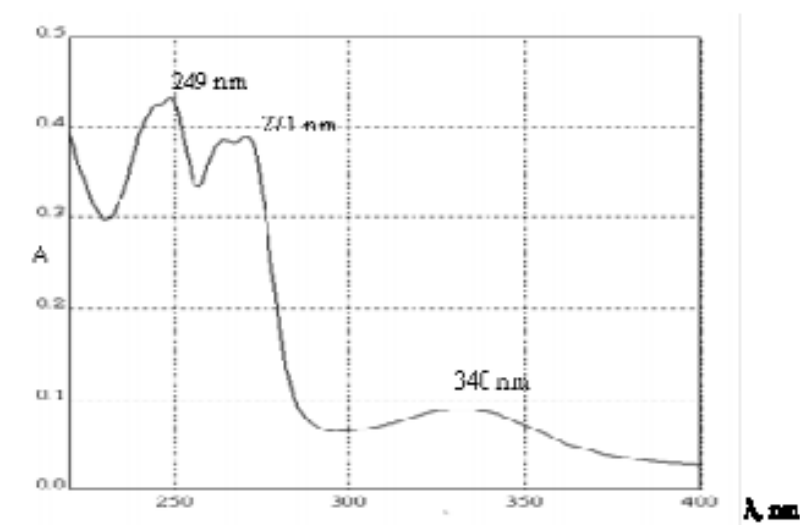


Рисунок 1 - Спектр в УФ- и видимой области раствора PCO филлохинона (витамина  $K_1$ ).

С целью разработки рационального метода определения содержания витамина  $K_1$  были подобраны условия для его извлечения из сырья. В качестве объекта для разработки методики служили листья крапивы. С учетом неустойчивости филлохинона к воздействию световой энергии, все этапы исследования проводили в условиях, предполагающих защиту извлечений от

света. Полноту извлечения определяли методом ВЭЖХ по величине площади пика с  $t_r$  20,00±2,00 мин.

В результате оценки влияния факторов пробоподготовки на полноту извлечения филлохинона были подобраны следующие параметры и условия: измельченность сырья – частицы, проходящие сквозь сито с величиной диаметра отверстий 0,5 мм; экстрагент – гексан; количественное соотношение «сырье:экстрагент» - 1:25; однократная экспозиция в течение 60 мин.; температурный режим – комнатная температура (20-22°C).

Для разработки методики определения витамина  $K_1$  в растениях спектрофотометрическим методом, предварительно был проведен сравнительный анализ спектров поглощений извлечений из фармакопейного сырья (рисунок 2) и раствора РСО филлохинона (рисунок 1).

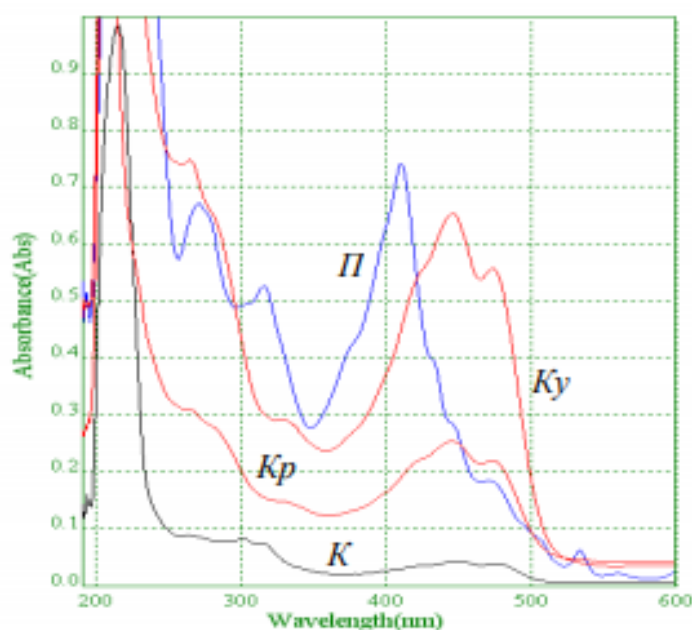


Рисунок 2 - Спектры поглощения извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего филлохинон ( $K_p$  – листья крапивы,  $K$  – кора калины,  $K_y$  – столбики с рыльцами кукурузы,  $\Pi$  – трава пастушьей сумки)

Наиболее приемлемым вариантом для определения витамина  $K_1$  в растительном сырье представляется использование метода обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) с диодно-

матричным детектором. По разработанным параметрам пробоподготовки сырья к анализу была разработана следующая методика: аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, заливают 25 мл гексана, закрывают пробкой и перемешивают на механическом встряхивателе в течение 60 минут. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу и отгоняют гексан на ротационном испарителе. Остаток количественно переносят в мерную колбу на 5 мл (пикнометр) с помощью 4 мл этанола. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф.

В результате было установлено, что доказать присутствие витамина K<sub>1</sub> в сырье по референтному максимуму (249 нм) не представляется возможным, ввиду отсутствия данного максимума в спектре всех исследуемых объектов. Следовательно, методика определения витамина K<sub>1</sub> в суммарном комплексе биологически активных веществ растительного сырья прямым спектрофотометрическим методом изначально не может быть положительно провалидирована по показателю «специфичность». Повысить показатель специфичности методики при использовании спектрофотометрии возможно при условии извлечения из сырья очищенного филлохинона, что требует введения дополнительных препаративных манипуляций на стадии пробоподготовки объекта исследования. Дополнительная очистка извлечения может отрицательно повлиять на экспрессность и точность методики в конечном результате.

Проведенные исследования показали целесообразность использования метода обращенно-фазовой ВЭЖХ для определения филлохинона в растительном сырье.

Преимуществом метода ВЭЖХ является возможность проведения оценки качественного и количественного содержания филлохинона в одной навеске

сырья, что существенно экономит временные затраты на анализ. Разработанная методика может быть использована для определения содержания витамина  $K_1$  в растительных объектах.

## **Заключение**

В результате проведенной работы было установлено следующее:

1. Применение лекарственного растительного сырья, содержащего витамины, обладает рядом преимуществ перед синтетически синтезированными витаминами.
2. Существуют методы определения в лекарственном растительном сырье следующих витаминов: К<sub>1</sub>, С и каротиноиды.
3. В настоящее время разработан перспективный метод определения витамина К<sub>1</sub> в лекарственном растительном сырье на основании метода ВЭЖХ.

## Список использованной литературы

1. Абышев А. З. Синтез, свойства и контроль качества витаминных препаратов и витаминоподобных веществ: учебно-методическое пособие / А. З. Абышев. – СПб. : Изд-во СПФХА, 2010. – 136 с.
2. Патудин А. В. Биологически активные вещества гомеопатического лекарственного сырья / А.В. Патудин. – М.: Наука, 2009. – 588 с.
3. Гаммерман А. Ф. Курс фармакогнозии / А. Ф. Гаммерман. - М.: Государственное издательство медицинской литературы, 2017. - 640 с.
4. Гаммерман А. Ф., Гром И. И. Дикорастущие лекарственные растения СССР / А. Ф. Гаммерман. – М.: Машиностроение, 2016. - 286 с.
5. Фармакогнозия / Е. В Жохова, М. Ю. Гончаров, М. Н.Повыдыш, С. В. Деренчук. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017 – 544 с.
6. Йирасик В.; Стары Ф. Лекарственные растения /В. Йиирасик, Ф. Стары. – С.: Артия, 2017. – 255 с.
7. Кобыльченко Н. В. Разработка норм качества экстракта жидкого из корней шиповника собачьего *Rosa canina* L. / Н.В. Кобыльченко // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск. - 2010. – Вып. 65. – С. 328-329.
8. Лавренов, В.К.; Лавренова, Г.В. 500 важнейших лекарственных растений / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – М.: АСТ, 2015 – 512 с.
9. Лукша Е. А., Погодин И. С. Разработка методики количественного определения филлохинона (витамина К<sub>1</sub>) в растительных объектах / Е. А. Лукша, И. С. Погодин // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - №3. – С. 737-741.
10. Пастушенков, Л. В. Лекарственные растения: монография / Л. В. Пастушенков. – М.: Лениздат, 2015. – 384 с.
11. Самылина И.А. Лекарственные растения и пищевые продукты в медицине / И. А. Самылина. М.: Наука, 2015. - 3350 с.

12. Самылина И. А. Фармакогнозия. / И.А. Самылина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 3. – 488 с.
13. Соколов С. Я.; Замотаев И. П. Лекарственные растения / С. Я. Семенов, И. П. Замотаев. – М.:Vita, 2015. - 512 с.
14. Ткачева Ю. С., Сапронова С. Г. Лекарственные растения как источник содержания аскорбиновой кислоты / Ю. С. Ткачева, С. Г. Сапронова // Интеграция наук. – 2018. - №8(23). – С. 627-628.
15. Hussain I. Analysis of Vitamin C in Selected Medicinal Plants / I. Hussain // Journal- Chemical Society of Pakistan. – 2011. - №33 (2). – С. 260-262.
16. Iqbal Y. Significance of Vitamin C in Plants / Iqbal Y. //Journal- Chemical Society of Pakistan. – 2009. - №3(31) – С. 169-170.