

# ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Жанымханова П.Ж.

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»

г. Караганда, Республика Казахстан

**Резюме.** В статье приведены результаты разработки технологии лекарственного средства на основе субстанции оксима пиностробина и его стандартизации. Разработаны параметры технологического процесса и контрольные точки производства густого экстракта почек тополя бальзамического для выделения пиностробина. Подобраны условия для модификации оксимированного производного на основе субстанции пиностробина. Проведена стандартизация субстанции оксима пиностробина и разработана спецификация качества оксима пиностробина.

**Ключевые слова:** пиностробин, густой экстракт, почки тополя бальзамического, субстанция, оксим пиностробин, стандартизация.

## TECHNOLOGY OF THE SUBSTANCE OXIME OF PINOSTROBINA AND STANDARDIZATION

Zhanymkhanova P. Zh.

International scientific-industrial holding «Phytochemistry»

Karaganda, Republic of Kazakhstan

**Resume.** The article contains results the technology development of drug based on substance of pinostrobin oxime and its standardization. There were developed the parameters of technological process and control points of production of dense extract of buds of *Populus balsamifera* L. The conditions for modification of an oxime derivative based on substance of pinostrobin were selected. The standardization of substance of pinostrobin oxime was carried out and the specification quality on pinostrobin oxime was developed.

**Keywords:** pinostrobin, dense extract, buds of *Populus balsamifera* L., substance, pinostrobin oxime, standardization.

В свете решений фармацевтической политики Республики Казахстан химическое исследование растительного сырья, поиск биологически активных веществ, разработка и создание отечественных фитопрепаратов является актуальной задачей.

Наиболее многочисленной группой природных фенольных соединений являются флавоноиды. Известно, что для почек тополя характерно наличие флавононов, флавонов, флавонолов и др. [1, 2]. Они принимают участие в фотосинтезе, образовании лигнина и суберина, в качестве защитных агентов в патогенезе растений [3].

Перспективными источниками многих биологически активных веществ, в том числе флавоноидов, являются растения семейства *Salicaceae* (Ивовые), в частности, рода *Populus* L. (тополь). Фитохимическое изучение растений данного рода, выделение полифенольных соединений и химическая модификация их молекул позволяют создать новые эффективные препараты широкого фармацевтического действия [4-9]. Имеющиеся литературные сведения указывают на наличие в коре и почках тополей (белого, черного, лавролистного, душистого) фенолгликозидов, фенолкарбоновых кислот (кофейная, феруловая, гидроксикоричная),

флавоноидов, дубильных веществ [10]. Многие из этих соединений интересны с фармакологической и терапевтической точек зрения. Кроме того, известно, что большинство фенольных соединений обладают антимикробной активностью и антиоксидантными свойствами [11-13].

Препараты тополя бальзамического широко используются при болезнях суставов как в народной, так и в традиционной медицине. На сегодняшний день используют настойку тополя бальзамического в виде галеновых препаратов, отличающихся простотой технологии.

В этой связи исследования по созданию доступного широким слоям населения фитопрепарата гепатопротекторного, противовоспалительного, антиоксидантного действия на основе местного, экологически безопасного сырья, содержащего флавоноиды, являются практически важными.

Состав фенолпропаноидов почек тополя зависит от целого ряда факторов, таких как вид и форма тополя, фаза развития, место произрастания и др.

Нами ранее была приведена сравнительная характеристика баротермического и экстракционного способов получения густого экстракта почек тополя

## ВОПРОСЫ ФАРМАЦИИ

бальзамического [14]. Разработаны параметры технологического процесса и контрольные точки производства густого экстракта почек тополя бальзамического для выделения пиностробина. Баротермический способ получения густого экстракта почек тополя более прост, повышает производительность труда и более экономичен, чем экстракционный. Полученный баротермическим способом густой экстракт почек тополя дешевле и экологически безопасен по сравнению с экстрактом, полученным экстракционным способом.

Выделение пиностробина из густого экстракта почек тополя бальзамического методом колоночной хроматографии.

Для разработки параметров технологического процесса хроматографического выделения пиностробина провели серию экспериментов по подбору оптимального

соотношения элюентов и условий элюирования. Результаты анализа выхода пиностробина из трех серий густого экстракта и его чистоты в зависимости от условий элюирования представлены в таблице 1.

По результатам эксперимента оптимальными условиями хроматографического разделения густого экстракта с целью выделения пиностробина являются соотношение массы густого экстракта и массы силикагеля 1:2, элюирование петролевым эфиром в течение 1 суток и смесью петролевым эфир - этилацетат в соотношении 98:2 в течение 4 суток.

Контроль процесса осуществляли методом тонкослойной хроматографии (проявитель 3%-ный р-р FeCl<sub>3</sub>). Для ТСХ использовали систему растворителей: петролевым эфир-этилацетат 4:1. Для идентификации выделенного пиностробина использовали данные ИК-, УФ-,

Таблица 1 - Количество пиностробина, выделенного из густых экстрактов почек тополя, в зависимости от условий хроматографирования

Серия и масса густого экстракта	Содержание пиностробина в экстракте (%)	Содержание пиностробина в экстракте (г)	Элюент, система элюентов	Время элюирования (сутки)	Расход растворителей (кг)	Количество выделенного пиностробина (г)	Чистота пиностробина (%)
010214 0,250 кг	5,8	14,50	Петролевым эфир	15	19,8	-	-
			Петролевым эфир: этилацетат= 98:1	10	31,9:0,8	3,73 8,25 1,31 Итого 13,29	97,0 99,9 93,6
020414 0,375 кг	5,8	21,75	Петролевым эфир	7	21,7	-	-
			Петролевым эфир: этилацетат= 98:2	5	9,7:0,22	15,4 2,6 1,3 Итого 19,30	99,8 96,9 95,3
030510 0,375 кг	5,8	21,75	Петролевым эфир	1	3,5	-	-
			Петролевым эфир: этилацетат= 98:2	4	13,9:0,24	10,9 2,85 6,86 Итого 20,61	99,9 97,3 96,4

ЯМР-спектров  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и температуру плавления.

На основании сравнения спектральных данных выделенное соединение идентифицировали как:

*Пиностробин*: кристаллическое вещество состава  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , с т. пл. 96-99 °С. Выход 2,8 % относительно воздушно-сухого сырья.

УФ-спектр ( $\lambda$ , нм, Ige, EtOH): 212 (4,31); 289 (4,29); 334 (3,53).

ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr): 3059, 2971, 2916, 2848, 1647 (C=O), 1620, 1579, 1444, 1352, 1339, 1198, 1159, 1092, 1034, 887, 699, 612.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д., J/Гц): 2.83 (1H, дд, J=4.0, 16.0, H-3a), 3.08 (1H, дд, J=12.0, 16.0, H-3б), 3.79 (3H, с., OMe), 5.41 (1H, дд., J=12.0, 3.0, H-2), 6.45 (1H, д., H-6), 6.63 (1H, д., H-8), 7.24 (1H, м., H-4'), 7.39 (2H, м., H-3', H-5'), 7.44 (2H, м., H-2', H-6'), 12.15 (1H, с, OH).

Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 43.26 т., 55.56 кв., 79.10 д., 94.14 д., 95.02 д., 103.02 с., 126.01 д., 128.75 д., 138.25 с., 162.66 с,

164.02 с., 167.86 с.

Подбор условий для модификации оксимированного производного на основе субстанции пиностробина, обладающего антиоксидантным, гепатопротекторным, противовоспалительным свойствами

Подобраны оптимальные условия для проведения синтеза оксима пиностробина. В ходе экспериментов варьировали соотношение пиностробина, растворителя этанола, реагентов, а также изменяли время синтеза. Зависимость количественного выхода оксима пиностробина от условий проведения реакций представлено в таблице 2.

В таблице 2 нами подобраны условия проведения оксимирования пиностробина в этаноле. Таким образом, оптимальными условиями синтеза являются температура 60°C, продолжительность процесса 72 часа, избыточное количество реагента гидроксиламина солянокислого.

Таблица 2 – Зависимость выхода оксима пиностробина от условий синтеза при 60 °С (количество пиностробина – 30 г)

Объем этанола, мл	Гидроксиламин солянокислый, г	Натрия гидрокарбонат, г	Продолжительность синтеза, ч	Выход оксима пиностробина, %
500	11,55	15,01	24	56
500	11,55	15,00	48	72
300	15,01	15,02	24	83
250	15,00	15,01	72	98

Таблица 3. - Метрологическая характеристика определения этилацетата в модельной смеси

№ п/п	Использовано этилацетата, %	Найдено этилацетата, %	Метрологическая характеристика
1	0,05	0,049	X=0,047 S=0,017 S <sub>x</sub> =0,0064 Δx=0,016 A=± 0,6 %
2	0,05	0,045	
3	0,05	0,047	
4	0,05	0,047	
5	0,05	0,048	
6	0,05	0,046	
7	0,05	0,046	



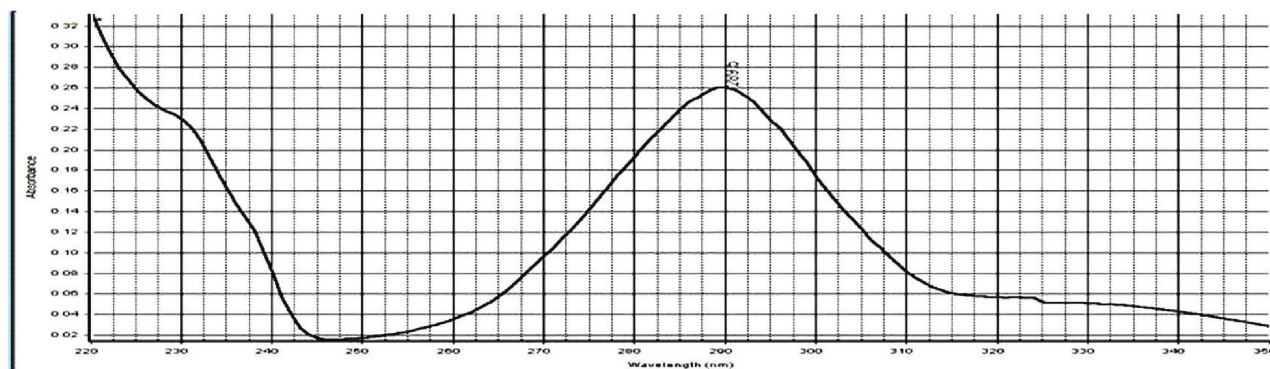


Рис. 1. УФ – спектр поглощения субстанции оксима пиностробина

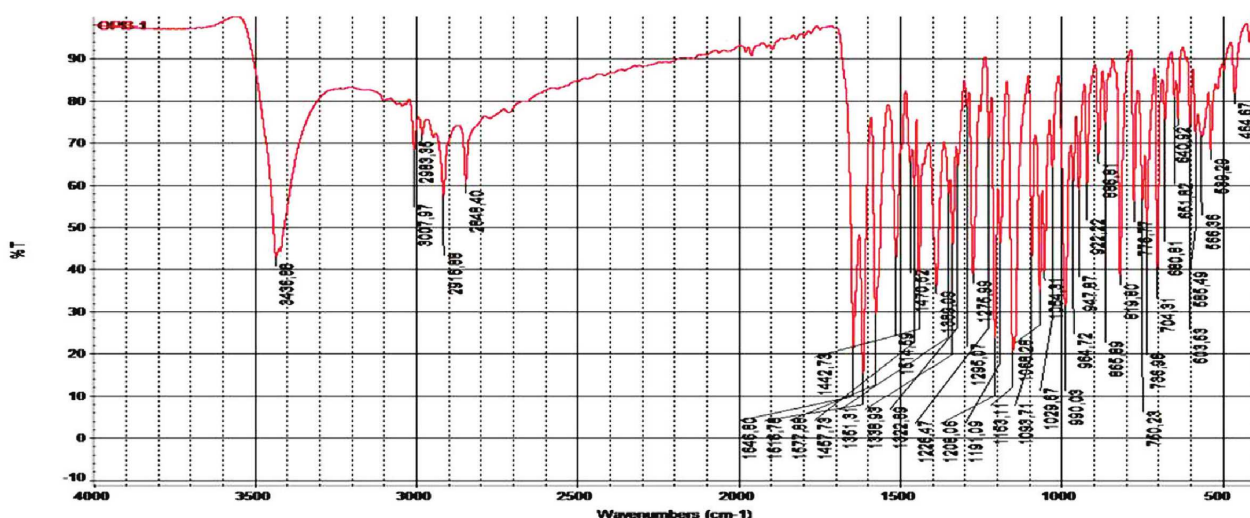


Рис. 2 - ИК – спектр субстанции оксима пиностробина

## Стандартизация субстанции оксима пиностробина

Для идентификации оксима пиностробина нами предложены спектроскопия в инфракрасной и ультрафиолетовой областях спектра, а также качественная реакция на подтверждение структуры флавонона.

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции в этиловом спирте 96 % в области от 200 нм до 360 нм должен иметь максимум поглощения при длинах волн 280±2 нм (рис. 1).

Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см<sup>-1</sup>, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3436 (N-OH), 3007, 2983, 2916, 2848, 1646, 1616, 1577, 1442, 1351, 1338, 1295, 1226, 1191, 1153, 1093, 1029, 886, 704, 651, 640, 539, 464 (рис. 2).

**Растворимость.** Оксим пиностробина растворяется в этилацетате, спирте этиловом, ацетоне, нерастворим в воде (ГФ РК, том 1,

метод 1, с. 17).

Для идентификации субстанции оксима пиностробина проведена цветная реакция с цианидиновой пробой, используемой в качестве подтверждения скелета флавонона. Розовато-красное окрашивание наблюдается в кислой среде при растворении образцов оксима пиностробина в спирте этиловом 95% и добавлении порошка магния металлического.

Физическую константу температуры плавления оксима пиностробина определяли микрометодом. Значение ее находилось в пределах от 182°C до 184°C.

Для определения показателя остаточное количество органического растворителя нами разработана методика с использованием газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Содержание остаточного количества органического растворителя определяли по методу «внутреннего стандарта» по четыреххлористому углероду.

Для нахождения коэффициента пересчета готовили раствор модельной смеси анализируемых компонентов в растворе

внутреннего стандарта. Количество этилацетата в оксима пиностробина может быть лимитировано значением не более 0,05 %.

Результаты статистической обработки опытных образцов методом ГЖХ на определение остаточного количества органического растворителя представлены в таблице 3.

Таким образом, нами разработана методика количественного определения оксима пиностробина, которая одновременно используется для анализа посторонних примесей.

*Методика определения.* 5 мг (точная навеска) оксима пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл ацетонитрила, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки и перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (Раствор А).

По 20 мкл полученного фильтрата хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм в условиях,

- колонка размером 4,6 x 150 мм, заполненная “Zorbax SB-C<sub>18</sub>» с размером частиц 5 мкм;

- подвижная фаза: ацетонитрил - вода очищенная - кислота уксусная ледяная (50:49:1), дегазированная любым удобным способом;

- скорость подвижной фазы - 1,0 мл/мин;  
- детектирование при длине волны 289 нм;  
- температура колонки - 20°C;

Для раствора А длительность анализа должна превышать время удерживания оксима пиностробина не менее чем в 2 раза.

Содержание оксима пиностробина (X), в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1}{\sum S_i} \cdot 100$$

где:  $S_1$  – площадь пика оксима пиностробина на хроматограмме, полученной для раствора А;

$\sum S_i$  – сумма всех площадей пиков, кроме площади пика растворителя на хроматограмме, полученной для раствора А.

Содержание оксима пиностробина должно быть не менее 97,0 %.

Полученные результаты пяти серий

опытных образцов оксима пиностробина составили значение от 99 % до 100 %.

## **Разработка спецификации качества субстанции оксима пиностробина**

С учетом физико-химических свойств и в соответствии с требованиями нормативных документов, разработана спецификация качества оксима пиностробина. Определены условия хранения субстанции оксима пиностробина, которая по результатам исследования равнялась 2 годам, при условии хранения в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C.

Таким образом, нами разработаны параметры технологического процесса и контрольные точки производства густого экстракта почек тополя бальзамического для выделения пиностробина. Подобраны оптимальные условия хроматографического разделения густого экстракта с целью выделения пиностробина. Проведен подбор условий для модификации оксимированного производного на основе субстанции пиностробина, проведена стандартизация субстанции оксима пиностробина и разработан нормативный документ на оксим пиностробина.

## **Литература:**

1 Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Браславский В.Б. Флавоноиды почек *Populus balsamifera* L. // *Химия природных соединений*. -1990. -№2. -С.272–273.

2 Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. Исследование химического состава *Populus balsamifera* L. методом ВЭЖХ // *Растительные ресурсы*. - 1993. Т. 29, вып. 3. - С.85–90.

3 Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. - Москва, 1993. – 272 с.

4 Поляков В.В., Адекенов С.М. Биологически активные соединения растений рода *Populus* L. и препараты на их основе. Алматы: Ғылым. - 1999. – С.160.

5 Кульмагамбетова Э.А. Флавоноиды *Artemisia*, *Populus*, *Salsola*, их химическая модификация и биологическая активность : дис... канд. хим. наук : 02.00.10 / Эльмира Амангельдиевна Кульмагамбетова. – Караганда, 2001. – С.157.

6 Донбаева Э.К. Химическая модификация метоксилированных флавоноидов, их строение и биологическая активность: дис... канд. хим. наук: 02.00.10 / Э.К. Донбаева. - Караганда, 2008. – С.131.

7 Поляков В. В. Масло тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) и производные мирицетина, обладающие биологической активностью: дис... докт. хим. наук: 02.00.10 / В.В. Поляков. – Караганда, 1999. – С.280.

8 Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б., Просенко А.Е. Фенольные биоантиоксиданты. – Новосибирск: СЦ РАМН, - 2003. – С.328.

9 Сейтеббетов Т.С., Адекенов С.М., Даленов Е.Д. Антиоксиданты и иницированная хемилюминесценция. – Акмола: 1996. – С.100.

10 Растительные ресурсы СССР. Л., - 1986. – С.336.

11 Браславский В.Б., Куркин В.А., Жданов И.П. Антимикробная активность экстрактов и эфирных масел почек некоторых видов *Rorarius* L. // Растительные ресурсы. - 1991. Т. 27, - С.77–81.

12 Куркин В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений: итоги и перспективы исследований в области создания фитопрепаратов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Барнаул, - 2007, кн. 2. - С. 236–239.

13 Куркин В.А. и др. Перспективы использования растительного сырья, содержащего флавоноиды, в качестве антимикробных и противовоспалительных лекарственных средств // Человек и лекарство: Тез. докл. М., -1995.- С. 238.

14 Жанымханова П.Ж., Куанбаев А. А., Мукушева Г. К., Адекенова А.С., Адекенов С.М. Разработка технологических параметров получения и контроль качества густого экстракта почек тополя бальзамического // Научно-практический журнал «Фармацевтический бюллетень». - 2012. - №4-6. - С. 60-63.