

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

кафедра хімії природних сполук і нутриціології

«Сучасні підходи до створення фітопрепаратів»

Лекція 2

СУЧАСНІ МЕТОДИКИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В АНАЛІЗІ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ТА ФІТОПРЕПАРАТІВ



ХАРКІВ-2019

УМОВИ, ЩО ЗАБЕЗПЕЧИЛИ НЕОБХІДНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ УНІФІКОВАНИХ МЕТОДИК

- У 2015 році вступила в дію Державна Фармакопея України 2 видання (ДФУ 2.0), що складається з 3-х томів.
- 3-ій том ДФУ 2.0 містить 172 монографії на лікарську рослинну сировину (ЛРС) і лікарські рослинні засоби, із них 149 - монографії на ЛРС.
- При розробці даних монографій використовувався алгоритм, описаний в «Порядку розробки монографій на ЛРС», де однією з вимог задекларовано використання уніфікованих методик при кількісному і якісному контролі біологічно активних речовин (БАР) в ЛРС.
- Дане питання стає особливо актуальним в світлі того, що на сучасному етапі проводиться розробка національних монографій на ті види ЛРС, які описані в ГФ XI, Гостах, Остах і не описані в Європейській Фармакопеї (ЄФ).

УМОВИ, ЩО ЗАБЕЗПЕЧИЛИ НЕОБХІДНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ УНІФІКОВАНИХ МЕТОДИК

- Методики ГФ XI вже достатньо застаріли, вони введені в дію в 1990 році прошлого століття і до теперішнього часу не переглядалися.
- Вони зазвичай не відтворюються і тому не можуть бути використані як основа при розробці монографій для ДФУ.
- Аналіз чинних національних АНД на ЛРС, яка, наприклад, стандартизується за вмістом флавоноїдів, виявив широкий спектр методик кількісного визначення, в яких описані зовсім різні умови. Крім незручності, викликані приготуванням величезної кількості реактивів, використання таких методик як основи при розробці монографій ДФУ, передбачає колосальну роботу по проведенню валідаційних досліджень кожної з них.
- Уніфіковані методики є фармакопейними, засновані на багаторічних всесвітніх дослідженнях та їх введення до монографії не потребує повного об'єму валідаційних вимог ДФУ.

МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ В ЛРС, МОНОГРАФІЇ НА ЯКУ ВКЛЮЧЕНІ ДО ДФУ 2.0.

Кількість монографі й	Спосіб стандартизації ЛРС
35	За вмістом ефірної олії (2.8.12)
11	За показником набухання (2.8.4)
8	За вмістом екстрактивних речовин та показником гіркоти
19	За вмістом флавоноїдів при визначенні СФ-методом
11	За вмістом танінів при визначенні СФ-методом (2.8.14)
8	За вмістом о-дигідроксикоричних кислот при визначенні СФ-методом
6	За вмістом гідроксиантраценових похідних при визначенні СФ-методом
32	За кількісним вмістом БАР при визначенні методом ВЕРХ
7	За кількісним вмістом БАР при визначенні методом титрування
11	За кількісним вмістом БАР при визначенні іншими методами (наприк. алкалоїди методом СФ, гіперіцини методом СФ, антоціани методом СФ, проціанідини методом СФ і т.і.)

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

- У 55 монографіях (що складає біля 37%) використовуються спектрофотометричні (СФ) методики визначення кількісного вмісту БАР, причому у 36 монографіях в методиках при розрахунку використовується метод питомого показника поглинання (МППП).
- ЄФ при використанні СФ-методу для кількісного визначення БАР використовує як попереднє виділення визначуваного класу сполук сировини, так і подальше проведення реакції виділених речовин із специфічним для них реактивом, що приводить до отримання забарвлених розчинів, які визначають СФ-методом за певної аналітичної довжини хвилі.
- В результаті апробації СФ-методик ЄФ для більше ніж 30 видів ЛРС відмічено, що навіть при використанні МППП, максимумами поглинання спектрів випробовуваних розчинів сировини не відрізняються значущо (± 2 нм) від довжини хвилі, для якої в методиці дано значення ППП стандарту. Тобто, СФ-методики ДФУ/ЄФ є специфічними, навіть при використанні МППП.
- У разі невідповідності максимумів поглинання (різниця більше ± 2 нм, але не більше ± 5 нм) враховують рекомендовані ДФУ вимоги до невизначеності результатів у разі однобічного нормування діючої речовини ($V=20\%$, $\Delta AS= 2\%$), тобто результати кількісного визначення у регламентованому максимумі і фактичному максимумі мають відрізнятися не більше ніж 2%.

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

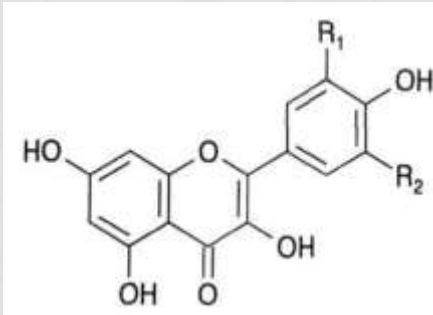
Флавоноїди

В ЄФ/ДФУ 2.0 в **19 монографіях** для визначення флавоноїдів в ЛРС використовуються дві спектрофотометричні (СФ) методики.

- Перша методика заснована на реакції комплексоутворення виділених в результаті кислотного гідролізу і екстракції етилацетатом агліконів з алюмінію хлоридом у середовищі метанол-етилацетат-оцтова кислота і розрахунком вмісту флавоноїдів у перерахунку на ППП гіперозиду.
- Умови визначення забезпечують близькість максимумів поглинання і ППП окремих агліконів флавонолів (наприклад найбільш поширених в ЛРС – кемпферола і кверцетину), тоді як ППП флавононів при цьому є істотно нижчими (наприклад для лутеоліна в зазначених умовах він складає 1/5 ППП кверцетину).
- У ДФУ 2.0 дана методика використовується в 12 монографіях на ЛРС, в якій флавоноїдні речовини представлені, в основному, глікозидами флавонолів, тому перерахунок на гіперозид цілком виправданий: приклади монографій «Берези листя», «Глоду плоди» (національна), «Звіробою трава» (національна) та інші.

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Формули найбільш відомих агліконів флавонолів та їх глікозидів.



R ₁	R ₂	Аглікон
H	H	Кемпферол
OCH ₃	H	Ізорамнетин
ОН	Н	Кверцетин

Глікозиди

Ізокверцитрозид

Кверцитрин

Гіперозид

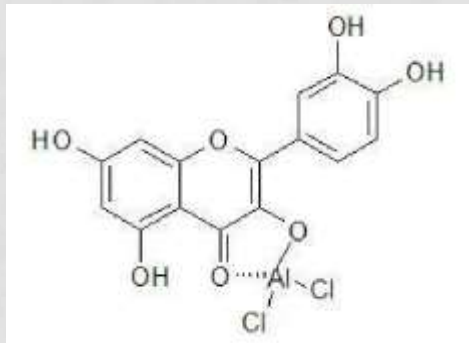
Рутин

3-О глюкозид кверцетину

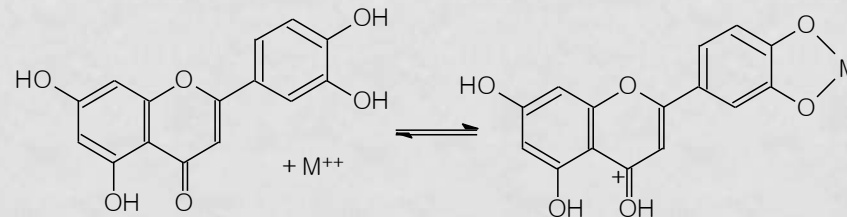
3-О рамнозид кверцетину

3-О галактозид кверцетину

3-О-рутинозид кверцетину



Комплекс кверцетин а з алюмінія хлоридом



Комплекс лютеоліна з алюмінія хлоридом

Флавоноли утворюють стабільні комплекси с $AlCl_3$, які не руйнуються в кислому середовищі. Висока їх стабільність пояснюється квазіароматичною структурою.

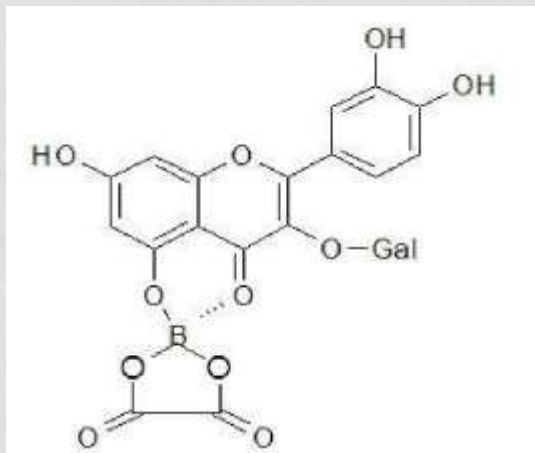
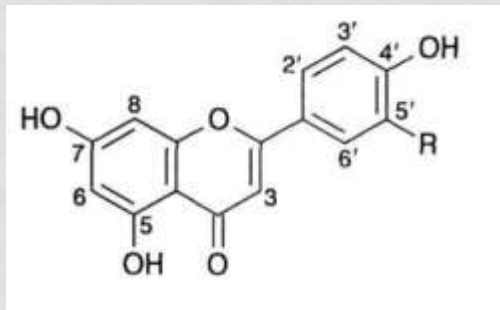
Лютеолін як представник флавонів, містить слабу комплексоутворюючу 5-ОН-4-карбоніл систему та слабу комплексоутворюючу 3'-4'-дигідрокси систему, утворює менш стабільний комплекс с $AlCl_3$ з менш вираженими спектральними характеристиками.

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

- **Друга методика** заснована на спектрофотометричному визначенні глікозидів флавоноїдів (як флавонолів, так і флавонів) після реакції із сумішшю борна - щавлева кислота в середовищі мурашина - оцтова кислот.
- 5-оксифлаволи і 5-оксифлавоноли, тобто ті, що мають ОН-групу, яка знаходиться в орто-положенні до карбоксильної групи, з борною кислотою за наявності щавлевої кислоти утворюють комплекс яскраво-жовтого кольору.
- Обчислення вмісту флавоноїдів проводять у перерахунку на ППП гіперозиду за довжини хвилі 410 нм, на ППП вітексина за довжини хвилі 628 нм, на ППП віолантина за довжини хвилі 405 нм або з використанням стандарту лютеоліна за довжини хвилі 410 нм.
- Тобто, при виборі стандарту, в перерахунку на який визначають вміст флавоноїдів, враховують як присутність даної речовини в досліджуваній сировині, так і відповідність максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину і розчину вибраного стандарту.

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Структурні формули флавонів, перерахунок на які використовується в монографіях ДФУ.



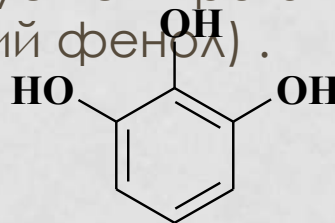
Аглікони	R	Глікозиди флавонів	Тривіальна назва
Апігенин	H	8 С-глюкозид апігенину	Вітексин
		6,8-диглюкопиранозид апігенину	Віолантин
Лютеолін	ОН	7 О – глюкозид лютеоліну	Цинарозид

Комплекс гіперозиди/лютеоліна (без замісника в 3-положенні) з борною /щавлевою кислотою

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Таніни.

- В ДФУ 2.0 в 11 монографіях використовується загальна СФ-методика визначення вмісту танінів, описана в розділі 2.8 «Методи фармакогнозії».
- Таніни визначають після адсорбції виділених з сировини поліфенолів порошком шкіри.
- В основі методики визначення поліфенолів лежить широко відома реакція з реактивом Фоліна (у модифікації реактив Фоліна-Чиокалтеу), який складається з солей фосфорновольфрамної і фосфомолібденової кислот. Ці солі при взаємодії з фенолами відновлюються з утворенням нижчих оксидів металів ($WO_2 \cdot nWO_3$ та $MoO_2 \cdot nMoO_3$), комплекси яких забарвлені в синій колір.
- Як стандарт використовується пірогалол, який є простішим поліфенолом (3-атомний фенол).



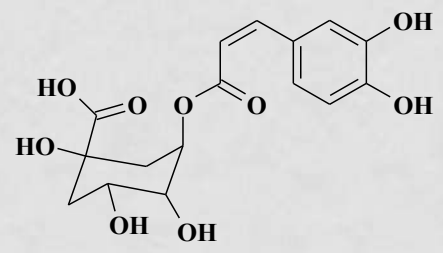
УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Гідроксикоричні кислоти.

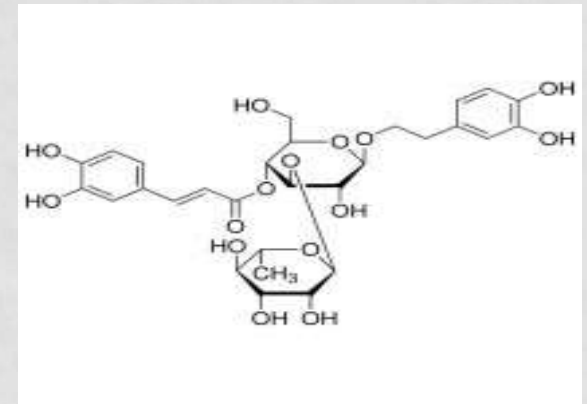
- В ДФУ в 8 монографіях використовується загальна СФ-методика визначення вмісту суми о-дигідроксикоричних кислот.
- Методика заснована на реакції з реактивом Арнова (розчин нітриту/молібдату натрію), який у кислому середовищі з орто-дигідроксифенолами (у даному випадку фрагмент молекули гідроксикоричних кислот) утворює комплекси (НО-фенол) жовтого кольору, який у лужному середовищі змінюється на оранжево-червоний.
- Максимуми поглинання (довжина хвилі вимірювання) отриманих забарвлених розчинів залежить від співвідношення різних похідних кислот в конкретній сировині та від максимуму поглинання комплексу стандарту в перерахунок на який проводять розрахунок вмісту.

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

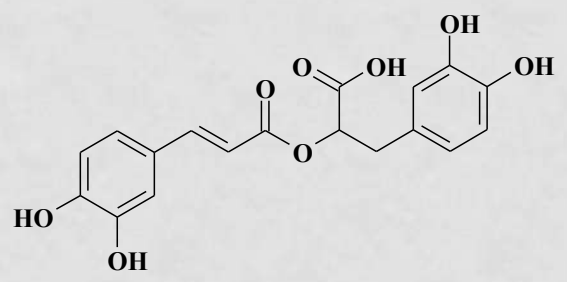
Монографії “Ясена листя” та “Кропиви листя”(перерахунок на Хлорогенову кислоту)



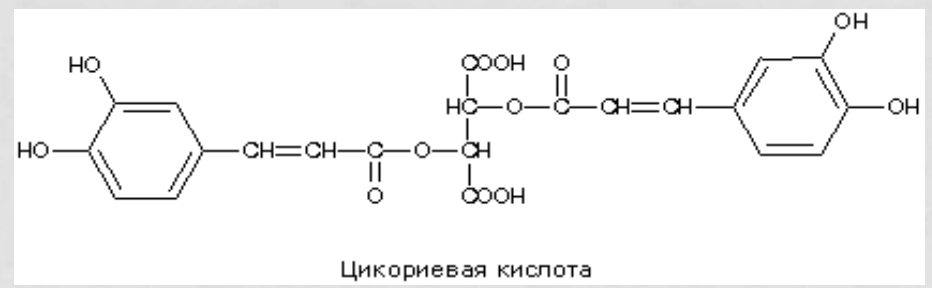
Монографії “Мяточник”, “Подорожник ланцетолистий”, “Подорожника великого листя”N (перерахунок на Актеозид)



Монографії “Розмарину листя”, “Нирковий чай” (перерахунок на Розмаринову кислоту)



Монографія “Ехінацеї пурпурової корені”N (перерахунок на Цикорієву кислоту)



УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

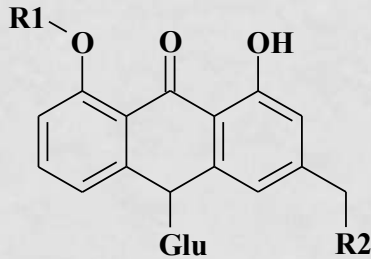
Гідроксиантраценові похідні.

- В ДФУ в 6 монографіях використовується загальна СФ-методика визначення вмісту суми гідроксиантраценових похідних.
- Методика полягає в наступному: антраценпохідні з сировини екстрагують водним розчином; далі реакцією з $FeCl_3$ окислюють можливі антрони і діантрони до антрахінону, подальший гідроліз переводить антраглікозиди в аглікони, які екстрагують ефіром, а залишок після упарювання ефіру розчиняють в розчині магнію ацетату, при цьому утворюються забарвлені хелатні сполуки.
- Оптичну густину забарвлених розчинів вимірюють за довжини хвилі 515 нм, яка є уніфікованою.

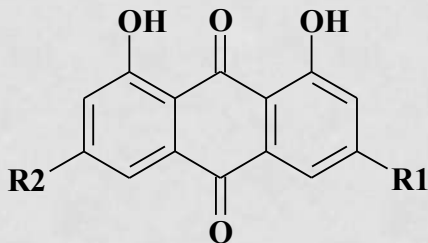
УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Монографія “Каскара”
(перерахунок на каскарозид А

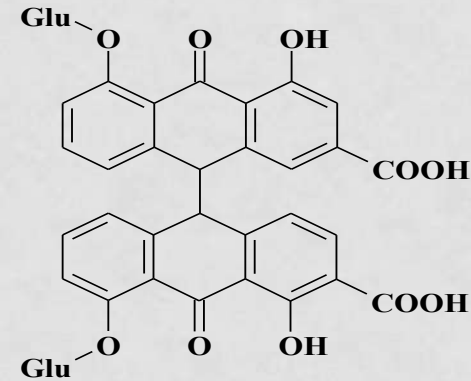
-
R1- β D-глюкоза, R2- OH)



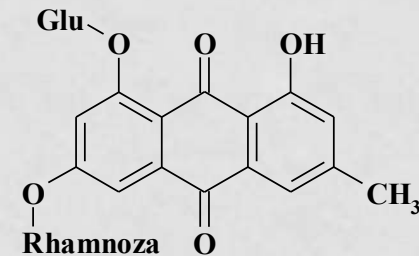
Монографія “Ревінь”
(перерахунок на Реїн –
R1-COOH, R2-H)



Монографії “Касії листя”, “Касії
вузьколистої плоди”, “Касії гостролистої
плоди”(перерахунок на Сенозид В)



Монографія “Крушини кора”
(перерахунок на Глюкофрангулін А)



УНІФІКОВАНІ ТШХ-МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

- В ЄФ/ДФУ дослідження рослинної сировини методом ТШХ є обов'язковим. Із 149 монографій, включених до ДФУ 2.0, лише у 5 монографіях відсутній тест ідентифікації сировини методом ТШХ.
- У решті монографій наведені ТШХ-методики ідентифікації з описом хроматографічного профілю розчинів ЛРС по відношенню до зон речовин-свідків.
- Найчастіше в монографіях використовується щонайменше 2 свідка. Це дозволяє коректно описувати положення зон на хроматограмах випробовуваних розчинів відносно зон свідків, а також контролювати придатність хроматографічної системи.
- Доцільно використання стандартизованих екстрактів при проведенні ідентифікації сировини. В 10 введених монографіях використовуються фармакопейні стандартні зразки екстрактів (напр. *Ехінацеї пурпурової екстракт для ідентифікації*, *Ехінацеї блідої екстракт*, *Дуба екстракт*, *Валеріани екстракт для ідентифікації* тощо).

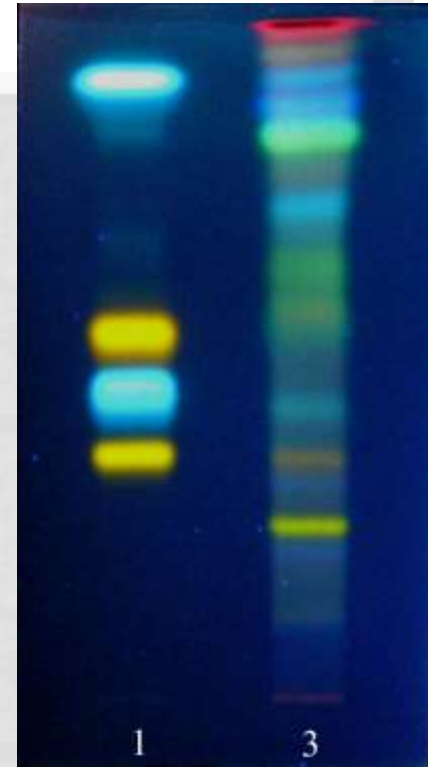
ПРИКЛАДИ ВИКОРИСТАННЯ ФСЗ ДФУ РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ

- **ФСЗ ДФУ Валеріани екстракт** – ідентифікація С національної монографії «Валеріани корені» (замінює використання коштовних речовин-порівняння валеренової та ацетоксивалеренової кислот)
- **ФСЗ ДФУ Ортосифона екстракт** – ідентифікація С національної частини монографії «Нирковий чай» (замінює використання коштовної речовини-порівняння синенсетина)
- **ФСЗ ДФУ Ехінацеї пурпурової екстракт** та **Ехінацеї блідої екстракт** – ідентифікація С та Е, тест «Інші види ехінацеї» національної монографії «Ехінацеї пурпурової корені» (замінює використання коштовних речовин-порівняння ехінакозида, цинарина і N-ізобутілдодекатетраєнаміда)
- **ФСЗ ДФУ Золототисячника екстракт** – ідентифікація С національної частини монографії «Золототисячник» (замінює використання коштовної речовини-порівняння свертиамарина)

УНІФІКОВАНІ ТШХ-МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю флавоноїдних сполук та фенолкарбонових кислот.

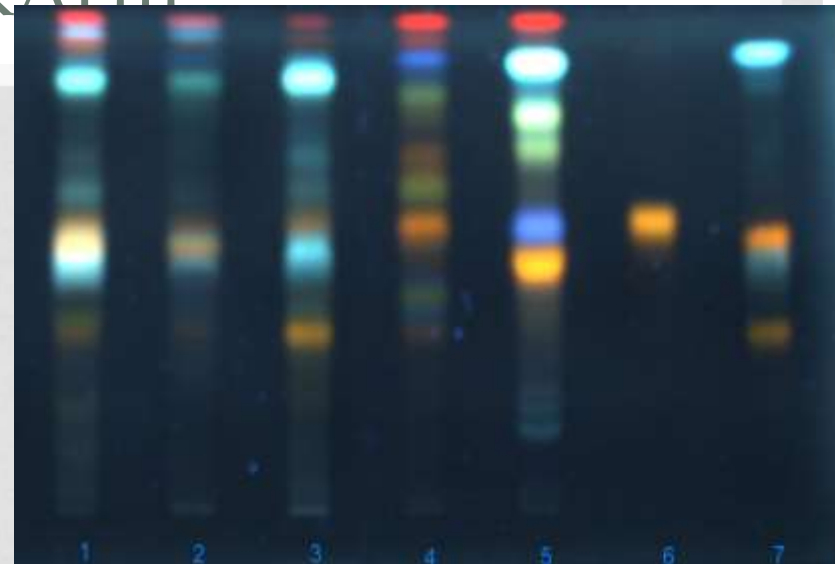
- Проводять з використанням стандартних речовин: гіперозиду, рутину, кверцетину, кофейної та хлорогенової кислот у різних комбінаціях).
- Найчастіше використовуються **три** варіанта хроматографічних умов.
- **Перший варіант: Рухома фаза:** мурашина кислота безводна-оцтова кислота льодяна-вода-етилацетат у співвідношенні (11:11:27:100), **виявлення** – обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі/етилацетаті та макроголу в метанолі/етилацетаті, перегляд при 365 нм.
- Використовується в наступних монографіях: «Алтеї листя», «Алтеї трава», «Артишоку листя», «Бовівника трилистого листя» (національна частина), «Зірчастий аніс», «Сафлору квітки», «Фіалка триколірна (квітучі надземні частини)».
- Майже таке ж співвідношення даної рухомої фази (7.5:7.5:17.5:67.5) використовується у монографіях «Гінго листя», «М'яточник чорний», «Плакун», «Хвоща стебла».
- Таким чином, дані умови хроматографування використовується при проведенні ідентифікації в **11** монографіях ДФУ на різні види ЛРС.



1-розчин порівняння рутину, хлорогенової кислоти, гіперозиду і кофейної кислоти, 2-розчин алтеї трави

УНІФІКОВАНІ ТШХ-МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

- **Другий варіант: Рухома фаза:** мурашина кислота безводна – вода – метилетилкетон – етилацетат у співвідношенні (10:10:30:50), **виявлення:** обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі/етилацетаті та макроголу в метанолі/етилацетаті та перегляд при 365 нм.
- Використовується в наступних монографіях ДФУ: «Арніки квітки», «Берези листя», «Бузини квітки», «Глоду листя та квітки», «Глоду плоди», «Дивини квітки», «Ехінацеї пурпурової трава», «Золотушник», «Золотушник європейський», «Липи квітки», «Пасифлора».

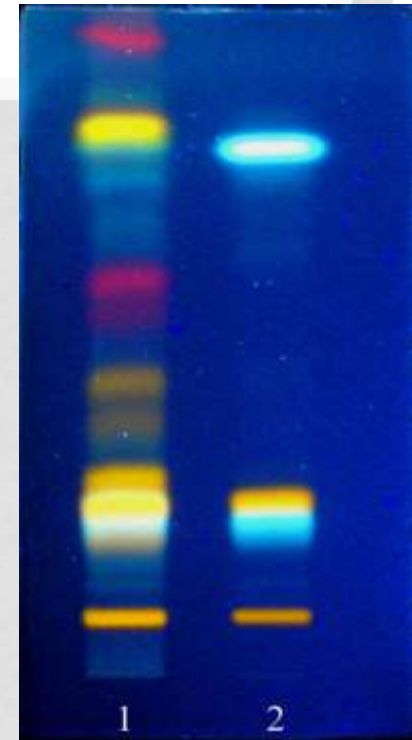


- 1-розчин глоду листя та квіток,
- 2- розчин глоду плодів,
- 3- розчин бузини квіток,
- 4- розчин липи квіток,
- 5- розчин материнки трави,
- 6- розчин порівняння лютеолін-7-глюкозиду ,
- 7-розчин порівняння рутину, хлорогенової кислоти, гіперозиду і кофейної кислоти

УНІФІКОВАНІ ТШХ-МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

- **Третій варіант: Рухома фаза:** мурашина кислота безводна – вода - етилацетат у співвідношенні (10:10:80),
виявлення: обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі/етилацетаті та макрогону в метанолі/етилацетаті та перегляд при 365 нм.
- Використовується в монографіях ДФУ: «Гречки трава», «Кульбаби лікарської корені», «Кульбаби лікарської трава з коренями», «Нагідок квітки», «Парило», «Ясеня листя», а також в монографіях DAC для ідентифікації більш як 10 видів сировини (наприклад сушениці квіток, омели, меліси листя, розторопші трави та плодів, мальви листя, чорної смородини листя та ін.).
- Ті ж самі умови визначення, тільки з дещо іншими співвідношеннями компонентів рухомої фази використовуються ще в декількох монографіях ДФУ та DAC: (6:9:90)- у монографії ДФУ «Звіробій»; (8:8:84)-у монографії ДФУ «Приворотень»; (6:6:88) - у монографіях DAC «Волоського горіху листя» та «Троянди пелюстки».

Спостерігається вузький спектр умов хроматографування для ідентифікації флавоноїдів та фенолкарбонових кислот в дуже великій кількості ЛРС (більш 55 видів).



1-розчин звіробою трави
2-розчин порівняння рутину, хлорогенової кислоти, гіперозиду і кофейної кислоти,

УНІФІКОВАНІ ТШХ-МЕТОДИКИ

ІДЕНТИФІКАЦІЇ

Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю сесквитерпенових сполук.

- Часто проводять в наступних хроматографічних умовах:
рухома фаза: етилацетат-толуол у співвідношенні (5:95),
виявлення: обприскування розчином анісового альдегіду та перегляд при денному світлі після нагріву при 100-1050С.
- Використовується в монографіях ДФУ: «Деревій», «Коріандр», «Лаванди квітки», «М'яти перцевої листя», «Розмарину листя», «Ромашки квітки», «Шавлії листя», «Шавлії лікарської листя N», «Шавлії трилопатевої листя», «Яловець», а також в монографіях ДАС для ідентифікації женьшеню китайського, фенхелю гіркого.
- В якості речовин свідків при цьому часто використовується цинеол, тимол, борнеол, борнілацетат, ліналол, гвайазулен та ін.).



1-розчин порівняння борнілацетату, α -бісабололу і гвайазулену
2-4- розчини ефірної олії ромашки квіток

УНІФІКОВАНІ ТШХ-МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

Ідентифікація сировини, що містить гідроксиантраценові похідні.

- В ЄФ/ДФУ в 7 монографіях використовуються ТШХ-методики визначення гідроксиантраценових похідних.
- В монографіях «Касії вузьколистої плоди», «Касії гостролистої плоди», «Касії листя» використовується повністю уніфікована ТШХ-методика: приготування випробовуваного розчину; розчин порівняння- ФСЗ касії екстракту, рухома фаза (оцтова кислота льодяна - вода - етилацетат - пропанол (1:30:40:40). Методика розрахована на ідентифікацію сенозидів.
- В монографіях «Каскара», «Крушини кора» (ДФУ), «Алое барбадоське», «Алое капське» (ЄФ) для ідентифікації антронів також використовується загальна уніфікована ТШХ-методика: розчин порівняння - барбалоїн, рухома фаза (вода – метанол– етилацетат (13:17:100), розчини для проявлення. Різниця методик (а саме додаткове виявлення розчином нітротетразолієвого синього) тільки в цілях дослідження – це або ідентифікація, або ідентифікація сумісно із визначенням інших видів сировини.



1-випробовуваний
розчин касії листя
2,3- розчини ФСЗ
ДФУ касії екстракту

ВИСНОВКИ

- При розробці національних методик як кількісного визначення вмісту БАР, так і методик ідентифікації методом ТШХ в ЛРС, на яку розробляються монографія ДФУ, необхідно, по можливості, використовувати уніфіковані методики.
- Якщо неможливо використання уніфікованих методик, теперішній рівень розвитку національної стандартизації ЛРС вимагає розробку специфічних СФ-методик, навіть при використанні МППП. Для цього використовують попередні методи очищення визначуваних речовин, селективні реактиви і тому подібне.
- При розробці методик ідентифікації ЛРС методом ТШХ рекомендовано використання стандартизованої процедури, що включає застосування уніфікованих рухомих фаз, речовин-свідків, проявників, що забезпечує необхідну відтворюваність результатів аналізу.
- Використання уніфікованих методик при розробці проектів монографій на ЛРС суттєво скорочує обсяг валідаційних досліджень.