

УДК 615.11

**МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПРИ СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ****Марахова А.И.***ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, e-mail: agentcat85@mail.ru*

В статье представлены обобщающие данные по методологии разработки методик количественного спектрофотометрического и потенциометрического анализа при стандартизации лекарственного растительного сырья. Рассмотрены проблемы, возникающие при анализе суммарных лекарственных растительных препаратов с позиции принципов сквозной стандартизации и присутствия соединений, составляющих метаболом растения. Представлены возможные алгоритмы выбора методик количественного анализа органических кислот в варианте доминирования алифатических или фенолкарбоновых кислот; дубильных веществ в присутствии/отсутствии значимых количеств флавоноидов и фенолкарбоновых кислот; особенности спектрофотометрического анализа флавоноидов. Идея алгоритма – рассмотреть лекарственное растительное сырье с позиции биологически активных веществ, содержащихся в нем. Возможность стандартизации лекарственного растительного сырья рассматривается с позиции одной из групп биологически активных веществ, которые условно названы целевыми.

Ключевые слова: стандартизация, спектрофотометрия, потенциометрия, метаболом, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества

**METHODOLOGICAL ASPECTS OF DEVELOPMENT OF TECHNIQUES
OF QUANTITATIVE ANALYSIS IN THE STANDARDIZATION OF MEDICINAL PLANTS****Marakhova A.I.***Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, e-mail: agentcat85@mail.ru*

The paper summarizes data on the development methodology of quantitative spectrophotometric and potentiometric analysis of the standardization of medicinal plant raw materials. The problems arising in the analysis of the total medicinal plant preparations from the standpoint of the principles of standardization and through the presence of compounds that make up the plant metabolome. The algorithms selection methods of quantitative analysis of organic acids in the form of domination aliphatic or phenol carbonic acids; tannins in the presence / absence of significant amounts of flavonoids and phenol carbonic acids; especially spectrophotometric analysis of flavonoids. The idea of the algorithm – to consider herbal drugs from the perspective of biologically active substances contained in it. The possibility of standardization medicinal plants is considered from the point of one of the groups of biologically active substances which are conditionally called targeted.

Keywords: standardization, spectrophotometry, potentiometry, metabolome, flavonoids, phenol carboxylic acids, tannins

В 2002 г. лекарственные средства включены в список продукции, подлежащей обязательной сертификации в соответствии с Постановлением № 36 от 24.05.2002 г. «Об утверждении и введении в действие Правил проведения сертификации». Таким образом, все лекарственные средства, произведенные промышленным способом, в том числе и лекарственное растительное сырье (ЛРС), должны подвергаться сертификации, что подразумевает проведение контроля качества [4]. В литературе представлены разнообразные данные по методикам анализа растительных биологически активных веществ (БАВ) [1, 2, 5, 6, 7, 9, 10], однако они носят разрозненный характер [8].

Тем не менее повышение безопасности и качества лекарственных средств является, согласно принятым проектам развития отечественной фармации на период до 2020 года, одной из основных групп реализуемых мероприятий. Достижение постав-

ленных целей зависит от действенности требований, закладываемых в нормативную документацию, и использования рациональных методик контроля качества.

Одним из существенных недостатков настоящей нормативной документации является то, что большое количество ЛРС не стандартизируются по действующим веществам или в контроль качества заложен только один параметр стандартизации при многообразии лекарственных форм, получаемых из сырья. В фармакопейных статьях, утвержденных для включения в ГФ XIII, наметилась тенденция к исправлению сложившейся ситуации: для одного вида ЛРС предлагаются несколько параметров стандартизации в зависимости от путей использования сырья [13].

Согласно общепризнанной концепции сквозной стандартизации растительного сырья и его препаратов, разработанной профессором И.А. Самылиной и ее учениками,

основным актуальным направлением современной систематизации в стандартизации является разработка универсальных методик, позволяющих контролировать содержание действующей группы БАВ и в сырье, и в его лекарственных формах [10, 11].

Постановление Правительства в Федеральной целевой программе «Развитие медицинской промышленности в 1998–2000 годах и на период до 2005 года», заложило требования гармонизации нормативно-правовой документации в области производства и реализации медицинской продукции с аналогичной документацией стран – членов Европейского союза [4]. Однако перенос требований нормативной документации зарубежных фармакопей не целесообразен, прежде всего, из-за различий в национальных традициях применения лекарственного растительного сырья и различий в химическом составе как действующих, так и сопутствующих соединений. Подтверждением необходимости учитывать особенности химического состава ЛРС является интерес международного фармакопейного комитета к этой проблеме [4]. Так, 3–8 октября 2013 г. в Дублине прошел Юбилейный 100-летний Конгресс FIP, в рамках которого состоялось Совещание мировых фармакопей, посвященное стандартизации ЛРС. На совещании внимание было акцентировано на том, что химический состав растения сильно зависит от высоты, региона и страны произрастания. При разработке методики количественного определения необходимо помнить об особенностях суммарных препаратов. Отличием суммарных препаратов, каковыми являются лекарственные препараты, фармакологический эффект которых обусловлен комплексом известных БАВ, количественное содержание которых известно, а также суммарные лекарственные растительные препараты содержат комплекс известных и неизвестных БАВ, присутствующих в неизвестных концентрациях.

Основными требованиями к методикам анализа в практической фармации являются прежде всего точность, экспрессивность и экономичность. Необходимо учитывать, что при проведении серийного анализа необходимо максимально сократить время его проведения и использование дорогостоящего оборудования и реактивов. В фармакогностическом анализе в большинстве случаев необходимо определить сумму соединений, обуславливающих фармакологический эффект суммарных препаратов.

Поэтому для этих целей актуальными являются такие современные и универсальные методы, как потенциометрия и спектрофотометрия [8, 12].

В связи с вышеизложенным, целью исследования явилась разработка алгоритма унификации методик титриметрического и спектрофотометрического анализа ЛРС и обоснование параметра стандартизации.

Результаты исследования и их обсуждение

При использовании титриметрических методов анализа БАВ определяют сумму эквивалентов действующих веществ определенных химических групп, т.е. условные концентрации биологически активных веществ, определенные в пересчете на стандарт.

Стандартом для установления эквивалента действующего вещества может быть индивидуальное соединение с определенной известной степенью чистоты (97–99%), представитель БАВ, входящее в состав ЛРС или лекарственного растительного препарата (ЛРП) и вступающее в реакцию с титрантом по реакции, подчиняющейся требованиям к взаимодействиям, которые могут быть использованы для количественного определения [9].

В методе спектрофотометрии пользуются понятием условных концентраций БАВ. Метод условных концентраций заключается в том, что аналитический сигнал (высота или площадь пика, оптическая плотность и т.д.) всех анализируемых компонентов пересчитывается на аналитический сигнал вещества, принятого за единый стандарт, который затем пересчитывается на эквивалентную ему концентрацию единого стандарта.

Стандартом для установления условной концентрации БАВ должно быть индивидуальное соединение высокой степени чистоты (99,97%), реально присутствующее в анализе и/или имеющее сходные или идентичные спектральные характеристики с анализируемыми соединениями (соединением).

Для осуществления поставленной цели были рассмотрены классы БАВ, в анализе которых наиболее часто используется фотометрия и титриметрия. Идея алгоритма – рассмотреть ЛРС с позиции БАВ, содержащихся в нем и являющихся целевыми. В таком случае БАВ служат предметом количественного анализа, по которым рассматривается возможность стандартизации ЛРС.

Ошибки в определении целевой группы БАВ вызваны чаще всего наличием «мешающих» сопутствующих соединений, при-

сутствующих в значимых количествах, т.е. количествах того же порядка, что и содержание целевой группы БАВ.

Целевая группа – органические кислоты

Если ЛРС содержит преимущественно алифатические кислоты, то дальнейшей стратегией должно стать определение значения рН водного извлечения. В том случае, когда реакция среды водного извлечения меньше 5,6, то следует обратить внимание на интенсивность окраски извлечения и способности к пенообразованию. При слабой окраске и хорошем пенообразовании (плоды шиповника, рябины, калины) возможно алкалиметрическое титрование с использованием смеси индикаторов (по методике ГФ для плодов шиповника), можно использовать и потенциметрическое детектирование окончания титрования.

В случае получения интенсивно окрашенных и/или если пена отсутствует или неустойчива, преимущество принадлежит потенциметрии (плоды черной смородины, трава мяты перечной, Melissa, шалфей). Для видов ЛРС, рН водных извлечений которых больше 5,6–5,7, то есть в присутствии небольших количеств свободных органических кислот, рационально применять обратное окислительно-восстановительное титрование с потенциметрическим детектированием конечной точки титрования (диоскорея, донник, крапива). В этом случае стандартизацию по сумме свободных органических кислот проводить не рационально по двум причинам: во-первых, их мало; во-вторых, добавление избытка щелочи приводит к гидролизу сложных эфиров, поэтому реально этим методом определяются не только свободные, но и связанные со спиртами кислоты.

Если в ЛРС содержится большое количество фенолкарбоновых кислот (ФКК), то приоритетным методом их количественного определения является спектрофотометрия. Основная ошибка, которая возникает при анализе ФКК – это завышенный результат из-за неспецифичности длины волны поглощения – 255–295 нм. В этой же области проявляют оптическую активность флавононы (275–290 нм), флавоны (240–270 нм), флавонолы (240–270 нм), фенолоспирты (270–285 нм).

Избежать влияния фенолоспиртов возможно добавлением щелочного буфера, в этом случае максимум их поглощения сместится в сторону больших длин волн на 40–60 нм. Если в сырье в значимых количествах присутствуют флавоноиды, то

определение суммы ФКК возможно либо путем варьирования рН добавлением буферного раствора, либо отделением флавоноидов на этапе экстракции.

На основании разницы в константах кислотности фенолкарбоновых кислот и флавоноидов возможно их разделение с помощью буферных растворов или, наоборот, совместное определение (цветки пижмы и препараты). В случае совместного определения (обычно в щелочных буферах) определяемый показатель будет «содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на...».

Если флавоноиды ФКК содержатся в небольших количествах, то их влиянием можно пренебречь. Также практически не оказывают влияние на количественное определение ФКК антоцианы (плоды малины).

Еще один вариант – содержание в ЛРС ФКК и алифатических кислот в ЛРС в равной степени. В этом случае титриметрически можно установить лишь сумму этих кислот, поскольку их константы кислотности отличаются незначительно (на порядок и больше) (мята перечная, Melissa, чабрец, душица, бессмертник и др.). Для индикации конца титрования можно использовать как потенциметрию, так и смесь индикаторов (методика ГФ). Предпочтение отдается потенциметрии как более универсальному и точному методу.

Целевая группа – дубильные вещества

Если ЛРС содержит значимые количества ФКК, то следует обратить внимание на значение начального окислительно-восстановительного (ОВ) потенциала водного извлечения. Водное извлечение рационально получать в связи с тем, что в него плохо переходят большинство ФКК.

Если начальный потенциал больше 700 мВ, то скачок титрования будет слабо выражен, поэтому рациональнее проводить титрование с индигосульфокислотой в качестве индикатора (ОФС «Определение дубильных веществ»). Стандартизация таких ЛРС по содержанию дубильных веществ не может быть рекомендована в связи с их низким содержанием.

В случае если исходный ОВ потенциал меньше 700 мВ, то можно применять потенциметрическое титрование. В этом случае можно получить 1 или 2 скачка титрования (гидролизуемые или гидролизуемые и конденсированные дубильные вещества). Для появления 2 скачков титрования необходимо, чтобы содержание гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ

было сопоставимо (корневища змеевика). Можно определить и сумму конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ сложением двух полученных величин.

В ЛРС, содержащем незначительные количества ФКК, можно использовать спектрофотометрический анализ дубильных веществ, например, после гидролиза, определив содержание кислоты галловой. Определяемый показатель – «содержание суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую». Если гидролиз не проводится, то можно определить содержание свободной кислоты галловой и сумму дубильных веществ в пересчете на танин.

Поглощение флавоноидов в коротковолновой области перекрывается с таковым у дубильных веществ, поэтому для ЛРС, содержащего значительные количества флавоноидов, наилучший выход – окислительно-восстановительное титрование дубильных веществ. Детектором конечной точки титрования может быть как индикатор, так и потенциометр, если исходный ОВ потенциал меньше 700 мВ.

Если в ЛРС содержатся незначительные количества флавоноидов и ФКК, возможно использовать как спектрофотометрию (определение свободной галловой кислоты, суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую, суммы дубильных веществ в пересчете на танин), так и титриметрию с индигосульфокислотой и потенциометрию. Потенциометрический метод является более предпочтительным, но только в случае содержания дубильных веществ.

Целевая группа – флавоноиды

Для флавоноидов наиболее точные результаты можно получить, применяя дифференциальную фотометрию. Чаще всего используют окрашенный комплекс с алюминием хлоридом. Чтобы реакция шла в соотношении 1:1, необходимо добавлять кислоту уксусную или хлористоводородную, для разрушения комплекса по кольцу. В при наличии в нем двух соседствующих гидроксильных групп.

При анализе необходимо учитывать содержание кислот и полисахаридов в растении. Если pH извлечения имеет значение больше 6,5 (листья крапивы), то даже добавление кислоты не устранил диссоциацию флавоноидов и быстрый гидролиз алюминия хлорида, в результате чего образуется осадок и спектрофотометрическое определение становится недоступным. Выходом из этой ситуации может стать добавление ацетатного буфера.

При значительном содержании полисахаридов в определяемом образце (например, в водных извлечениях и препаратах на разбавленном спирте) необходима очистка крепким спиртом полисахаридов в виде осадка.

Также следует учитывать влияние ФКК, если они присутствуют в значимых количествах.

Заключение

Вопросы стандартизации и контроля качества ЛРС и лекарственных растительных препаратов, производимых в России, продолжают оставаться весьма актуальными, так как сохраняется тенденция увеличения отечественных лекарственных средств растительного происхождения. При разработке методик контроля качества суммарных лекарственных растительных препаратов необходимо следовать принципам сквозной стандартизации, а также учитывать качественный и количественный состав метаболома растения и национальные традиции применения ЛРС.

Список литературы

1. Авдеева Е.В. Изучение некоторых фенольных и три-терпеновых соединений, используемых в стандартизации лекарственных растений: дисс. канд. фарм. наук. – Самара, 1996. – 159 с.
2. Васильев Г.В. Фенолкарбоновые кислоты // Химия природных соединений. – 2008. – № 5 – С. 512–513.
3. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., вып. 1,2 – М.: Медицина. – 1987, 1990 – 336 с. – 400 с.
4. Гризодуб А.И. Особенности фармакопейных подходов к количественному определению лекарственного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов // Фармаком. – 2012. – № 3. – С. 7–30.
5. Гринько Е.Н. Требования Российской и Европейской Фармакопеи к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном // Фармация. – 2010. – № 5. – С. 49–53.
6. Куркина, А.В. Актуальные вопросы химической стандартизации лекарственных растений, содержащих флавоноиды // Фармация. – 2012. – №7. – С. 44–48.
7. Куркин В.А. Фенилпропаноиды некоторых лекарственных растений и перспективы создания препаратов на их основе: автореф. дис. д-ра фарм. наук. – Москва, 1991. – 45 с.
8. Марахова А.И. Применение физико-химических методов в анализе настоев из сырья лекарственных растений семейства Яснотковых: автореф. дис. канд. фарм. наук. – Пермь, 2009.
9. Марахова А.И. Потенциометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: монография / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, А.В. Кузнецов, Я.М. Станишевский. – М.: Издательство РУДН-М, 2015. – 130 с.
10. Самылина И.А. Исследования по разработке фармакопейного метода определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном // Фармация. – 2009. – № 6. – С. 3–6.
11. Самылина И.А. Разработка методов сквозной стандартизации количественного определения суммы флавоноидов в листе малины и в сухом экстракте листа малины // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 5. – С. 4–5.
12. Mabry T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas // Springer Verlag: Berlin – Heidelberg. – New York. – 1970. – 354 p.
13. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obshchih-farmakopeynyh-statey>.