

Ярных Татьяна Григорьевна, доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра технологии лекарств Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002

Чушенко Валентина Николаевна, кандидат фармацевтических наук, доцент, кафедра технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: chushenkov@rambler.ru

Пушок Снежана Николаевна, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: skiter.snezhana@mail.ru

УДК: 615.322: 615.072: 582.951.4
DOI: 10.15587/2313-8416.2015.56940

ОСОБЛИВОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ ТРОПАНОВИХ АЛКАЛОЇДІВ У ЛИСТІ ДУРМАНУ ЗВИЧАЙНОГО

© В. А. Міщенко, Ю. С. Прокопенко

Питання пошуку, дослідження фармакологічної активності та стандартизації лікарської рослинної сировини для вітчизняної фармацевтичної науки і практики є актуальним та своєчасним. З 2000 року одним з пунктів Плану дій із забезпечення інтеграції України до Європейського союзу є розробка Державної Фармакопеї України, що гармонізована з Європейською Фармакопеєю (ЄФ).

Мета: Здійснення порівняльного аналізу сировини за методиками визначення вмісту тропанових алкалоїдів, описаних у монографії ЄФ «*Stramonium leaf*» та фармакопейній статті ГФ XI «Листья дурмана».

Методи: Для здійснення експериментального дослідження були заготовлені зразки листя дурману у 2010–2012 рр. у різних областях України. Ідентифікацію тропанових алкалоїдів у сировині здійснювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) та за допомогою якісної реакції Віталі-Морена. За методикою ідентифікації за ЄФ для обробки пластин використовували реактив Драгендорфа з подальшим обприскуванням пластинки розчином натрію нітриту. Кількісне визначення вмісту суми алкалоїдів проводили методом алкаліметрії зі встановленням точки еквівалентності за допомогою індикатору.

Результати: Проаналізовано показники якості листя дурману та їх нормування, що визначаються монографією ЄФ «*Stramonium leaf*» та фармакопейною статтею ГФ XI «Листья дурмана», встановлено певні відмінності щодо регламентованих показників якості сировини. Здійснено порівняльний аналіз сировини за методиками визначення вмісту тропанових алкалоїдів, описаних у даних нормативних документах. При якісному визначенні алкалоїдів у сировині методом ТШХ після обробки пластин розчином натрію нітриту спостерігали забарвлення зон, що відповідали гіосціаміну, у червоно-коричневий колір. Зони, що відповідали скополаміну, характеризувались менш інтенсивним забарвленням. За результатами кількісного визначення було встановлено, що вміст суми алкалоїдів в усіх аналізованих зразках листя дурману звичайного знаходився у межах норм, регламентованих ЄФ та ГФ XI – не менше 0,25 % у перерахунку на атропін.

Висновки: Проаналізувавши методики кількісного визначення тропанових алкалоїдів у листі дурману, наведені у монографії ЄФ «*Stramonium leaf*» та фармакопейній статті ГФ XI «Листья дурмана», встановлено певні відмінності у їх пробопідготовці, проте обидві методики дозволяють визначити вміст суми алкалоїдів у зразках листя дурману звичайного. Отримані дані експериментального дослідження є актуальними та були використані при розробці монографії ДФУ «Дурману листя»

Ключові слова: стандартизація, монографія, лікарська рослинна сировина, дурман звичайний, алкалоїди групи тропану

The questions of the search, pharmacological activity and standardization of natural extracts are appropriate and important for national pharmaceutical science and practice. Since 2000, one of the key points of the Action Plan to ensure the integration of Ukraine into the European Union is development of the State Pharmacopoeia of Ukraine harmonized with the European Pharmacopoeia (PhEur).

Aim: A comparative analysis of herbal material according to the methods for tropane group alkaloids determination, as described in the PhEur and in the 11th Edition of USSR Pharmacopoeia Monographs «*Stramonium leaf*».

Methods: *Datura leaves samples have been harvested during 2010–2012 in different regions of Ukraine for experimental research. Identification of tropane group alkaloids was carried out by the method of thin-layer chromatography (TLC) and by Vitali-Morin colour reaction. According to the PhEur method, firstly Dragendorff reagent and then Sodium nitrite solutions were used for the TLC plates spraying. Alkaloids assay was carried out by alkalimetry method with indicator determination of equivalence point.*

Results: *Datura leaves qualitative features, defined by PhEur and the 11th Edition of USSR Pharmacopoeia Monographs «Stramonium leaf», as well as their rationing have been analyzed. Certain differences concerning regulated quality parameters of herbal material have been determined. A comparative analysis of the natural extracts by described in the given normative documents methods for determination of tropane group alkaloids content has been done. After spraying the TLC plates with Sodium nitrite solution, red-brown zones corresponding Hyoscyamine were determined. Hyoscyamine zones were characterized by less intense color. As a result of quantitative determination it was determined that the alkaloids content in analyzed Datura leaves samples was within the limits regulated by the PhEur and the 11th Edition of USSR Pharmacopoeia – more than 0,25 % calculated as atropine.*

Conclusion: *Having analyzed the assay methods, described in the PhEur and the 11th Edition of USSR Pharmacopoeia Monographs «Stramonium leaf», applied for the determination of tropane group alkaloids in Datura leaves, certain differences in tests preparation were determined. Nevertheless, both of the methods allow determination of tropane group alkaloids content in Datura leaves samples. The obtained experimental data are relevant and were considered when developing the State Pharmacopoeia of Ukraine Monograph «Stramonium leaf»*

Keywords: *standardization, monograph, natural extracts, Datura stramonium, tropane group of alkaloids*

1. Вступ

Зростаюча потреба у фітотерапевтичних лікарських засобах приводить до збільшення обсягів заготівлі лікарської рослинної сировини, що поступово може привести до зменшення природних запасів рослинних ресурсів та його нераціонального використання. Тому для вітчизняної фармацевтичної науки і практики питання пошуку, дослідження фармакологічної активності та стандартизації лікарської рослинної сировини є актуальним та своєчасним. На сьогоднішній день одним з найважливіших завдань є створення єдиної державної законодавчої бази з контролю якості лікарської рослинної сировини. З 2000 року одним з пунктів Плану дій із забезпечення інтеграції України до Європейського союзу є розробка Державної Фармакопеї України, що гармонізована з Європейською Фармакопеею [1].

2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

Актуальним завданням сучасної фармацевтичної науки є розробка та введення монографій на лікарську рослинну сировину відповідно до вимог Європейської Фармакопеї [2]. На сьогоднішній день рослини родини пасльонових активно досліджуються та застосовуються як у народній, так і офіційній медицині. У фармацевтичній галузі країн світу представники пасльонових є офіційними та застосовуються рослини родів *Atropa* – беладона лікарська (*Atropa belladonna* L.), *Datura* – дурман звичайний (*Datura stramonium* L.), *Hyoscyamus* – блекота чорна (*Hyoscyamus niger* L.), *Capsicum* – перець однорічний (*Capsicum annuum* L.), *Solanum* – пасльон солодкогіркий (*Solanum dulcamara* L.). В залежності від дози, рослини, що містять тропанові алкалоїди, здатні по-різному впливати на центральну нервову систему людини [3]. Враховуючи вищенаведене, встановлення об'єктивних параметрів стандартизації рослин родини пасльонових, зокрема, дурману звичайного, що дозволяють контролювати якість даної сировини,

є вельми актуальним завданням як у теоретичному, так і у практичному плані.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми

Відомо, що рід Дурман родини Пасльонових нараховує близько 13 видів, розповсюджених у помірних та степових зонах [1–3]. Як лікарську рослину сировину традиційно використовують дурман звичайний (*Datura stramonium* L.). Офіційною сировиною в Україні та інших країнах є листя дурману [4–6]. Якість листя дурману регламентується вимогами фармакопейної статті ГФ XI «Листья дурмана» та монографією ЄФ «*Stramonium leaf*», які мають певні відмінності щодо показників якості сировини, методик їх визначення та нормування [4, 7].

4. Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, якій присвячена стаття

У статті представлені результати порівняльного аналізу лікарської рослинної сировини листя дурману звичайного за вмістом тропанових алкалоїдів з використанням методик, описаних у монографії ЄФ «*Stramonium leaf*» та статті ГФ XI «Листья дурмана».

5. Формулювання цілей статті

Метою нашої роботи було здійснення порівняльного аналізу сировини за методиками визначення вмісту тропанових алкалоїдів, описаних у монографії ЄФ «*Stramonium leaf*» та фармакопейній статті ГФ XI «Листья дурмана».

6. Виклад основного матеріалу дослідження з обґрунтуванням отриманих результатів

Для здійснення поставленого завдання були заготовлені зразки листя дурману у 2010–2012 рр. у різних областях України.

У монографії ЄФ та фармакопейній статті ГФ XI описаний один вид сировини – *Datura stramonium* L. При цьому спостерігаються відмінності при

регламентованій заготівлі ЛРС: у відповідності до вимог ЄФ, збирають листя дурману або верхівки пагонів рослини, які можуть містити суміш із листя з квітками або зрідка з плодами. Стаття ГФ XI регламентує заготівлю листя дурману у період від початку цвітіння до закінчення плодоносіння.

За вимогами ГФ XI, ідентифікацію листя дурману проводять лише за макро- та мікроскопічними ознаками, проте у примітці до статті в якості рекомендації вказано, що при вмісті алкалоїдів більше ніж 0,25 % для приготування препаратів листя дурману слід брати у меншій кількості [7]. Тобто ідентифікація алкалоїдів у сировині взагалі не регламентується.

У монографії ЄФ «Stramonium leaf» ідентифікацію алкалоїдів в сировині проводять методом ТШХ та за допомогою якісної реакції за нижченаведеними методиками [4].

Для здійснення ідентифікації за реакцією Віталі-Морена алкалоїди екстрагували з листя дурману звичайного розчином сірчаної кислоти, потім додавали розчин аміаку до лужної реакції та екстрагували хлороформом. Сухий залишок після випарювання хлороформу обробляли нітратною кислотою, в результаті чого відбувалось азотитрування фенільного фрагменту тропової кислоти. Отриманий розчин випарювали до суху, в результаті чого утворювався жовтий осад, що складався з 4'-нітроатропін нітрату та 4'-нітро-атропаміну. Після додавання луку (калію гідроксиду розчин) ці сполуки утворювали фіолетові аніонні комплекси.

При якісному визначенні алкалоїдів у сировині методом ТШХ випробовуваний розчин готують шляхом екстракції спочатку сірчаною кислотою, потім, після додавання аміаку концентрованого, – шляхом екстракції ефіром, вільним від пероксидів. Отримані шари ефіру висушують над натрію сульфатом безводним, фільтрують, випарюють до суху на водяній бані. Одержаний залишок розчиняють у 0,5 мл метанолу. Хроматографують у системі розчинників: розчин аміаку концентрований – вода – ацетон (3:7:90).

Розчин порівняння готують з розчинів стандартних речовин атропіну та скополаміну [4]. При чому їх кількісне співвідношення у розчині порівняння відповідає кількісному співвідношенню алкалоїдів у листі дурману звичайного. Такий підхід дозволяє не тільки проводити ідентифікацію алкалоїдів у сировині, а ще визначити ті види сировини, що морфологічно та анатомічно схожі з листям дурману звичайного, проте відрізняються більшим вмістом атропіну чи скополаміну [8]. Це узгоджується з тим, що у монографії вказується гранично низький вміст алкалоїдів та не дозволяється використовувати сировину із завищеним вмістом цих біологічно активних сполук [5, 8].

За методикою ідентифікації за ЄФ для обробки пластин використовували реактив Драгендорфа з подальшим обприскуванням пластинки розчином натрію нітрату. Для цього, після проходження системою розчинників відстані 10 см від лінії старту, пластинку висушували при температурі від 100 до 105 °C протягом 15 хв, охолоджували та обробляли

реактивом Драгендорфа P2. Після цього пластинку знову висушували та обробляли розчином натрію нітрату до зникнення жовтого забарвлення пластинки. Пластинку переглядали через 15 хв після обробки (рис. 1).

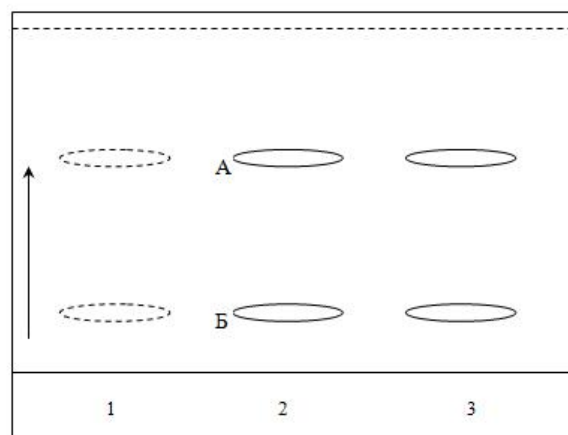


Рис. 1. Схема хроматограми випробовуваних розчинів з листя дурману після обробки пластинки розчином натрію нітрату

При проведенні даного випробування на всіх досліджуваних зразках сировини було встановлено, що на хроматограмах спостерігалась наявність плям на рівні зон розчинів порівняння: скополаміну (А) та гіосціаміну (Б). Після обробки пластин розчином натрію нітрату спостерігали забарвлення зон, що відповідали гіосціаміну, у червоно-коричневий колір. Зони, що відповідали скополаміну, характеризувались менш інтенсивним забарвленням. На підставі інтенсивності забарвлення плям, що розташовані на рівні атропіну, можна встановити завищену кількість даного алкалоїду, яка не повинна спостерігатись у сировині.

Згідно з методикою ідентифікації алкалоїдів за ЄФ також визначаються належні умови та терміни зберігання листя дурману звичайного, що впливають на якість сировини, які встановлюється шляхом контролю появи додаткових плям на хроматограмі випробовуваного розчину. Для цього на хроматограму наносять випробовуваний розчин та розчин порівняння у співвідношенні 10 мкл (рис. 1, 1) та 20 мкл (рис. 1, 3) відповідно. Це дозволяє визначити найменший небажаний вміст для супутніх алкалоїдів та інших продуктів, що могли утворитись у результаті порушення умов зберігання сировини [9–11].

Аналогічна методика ідентифікації описана у монографії ЄФ «Belladonna leaf» [8]. Згідно до літературних джерел, експериментальним шляхом було встановлено, що у старих листях беладони та листях беладони, що були висушені неналежним способом, визначаються такі продукти розпаду, як тропанол та апоатропін. Ці сполуки визначаються на хроматограмі при нанесенні випробовуваного розчину у кількості від 10 мкл. У методиці зазначається про можливість появи додаткових зон у середній частині хроматограми при нанесенні 20 мкл випробовуваного роз-

чину (апоатропін) або біля лінії старту на хроматограмі 10 мкл випробовуваного розчину (тропанол).

Оскільки вимоги до розробки методів контролю якості лікарської рослинної сировини передбачають якісне та кількісне визначення основних діючих речовин, одним з етапів нашого дослідження було визначення кількісного вмісту діючих речовин (алкалоїдів) у листі дурману звичайного.

В обох фармакопеях регламентований вміст суми алкалоїдів у перерахунку на гіосціамін становить 0,25 %. Кількісне визначення суми алкалоїдів у листі дурману згідно з вимогами ЄФ та ГФ XI проводять методом алкаліметрії із встановленням точки еквівалентності за допомогою індикатору. Методики кількісного визначення алкалоїдів у листі дурману за ЄФ та ГФ XI схожі, проте відрізняються між собою пробопідготовкою.

За методикою ЄФ для виділення алкалоїдів сировину спочатку зволожують сумішшю аміаку та діетилового ефіру та залишають для мацерації на 4 год. Після цього сировину переносять у перколятор та кількісно перколюють алкалоїди сумішшю хлороформу та діетилового ефіру у співвідношенні 1:3 відповідно. Повноту екстракції перевіряють шляхом обробки сухого залишку аликвоти реактивом Несслера. При кількісному визначенні за методикою ГФ XI алкалоїди екстрагують з сировини сумішшю діетило-

вого ефіру та розчину аміаку при струшуванні протягом 1 год. Ефірну витяжку швидко відфільтровують, промивають водою та відбирають аликвоту ефіру у ділильну лійку для подальшого екстрагування алкалоїдів розчином хлористоводневої кислоти. Повноту екстракції алкалоїдів за ГФ XI встановлюють за допомогою реактиву Майєра. За методикою ЄФ отриманий перколят також піддають обробці сірчаною кислотою, але після концентрування ефірної витяжки.

Далі методики практично не мають відмінностей: кислотні витяжки підлужують розчином аміаку та основи алкалоїдів, що утворились в результаті цього, екстрагують хлороформом. Хлороформ після висушування над натрію сульфатом безводним упарюють, залишок розчиняють у аликвоті кислоти. За методикою ЄФ сухий залишок розчиняють у 0,01 М розчині сірчаної кислоти, згідно до методики ГФ XI, сухий залишок розчиняють у 0,02 М хлористоводневої кислоти. Далі розчини титрують 0,02 М розчином натрію гідроксиду.

Аналізуючи одержані результати, можна зробити висновок, що вміст суми алкалоїдів в усіх аналізованих зразках листя дурману звичайного знаходиться у межах норм, регламентованих монографією ЄФ «*Stramonium leaf*» та статті ГФ XI «Дурмана листя», який складає не менше 0,25 % у перерахунку на атропін (рис. 2).

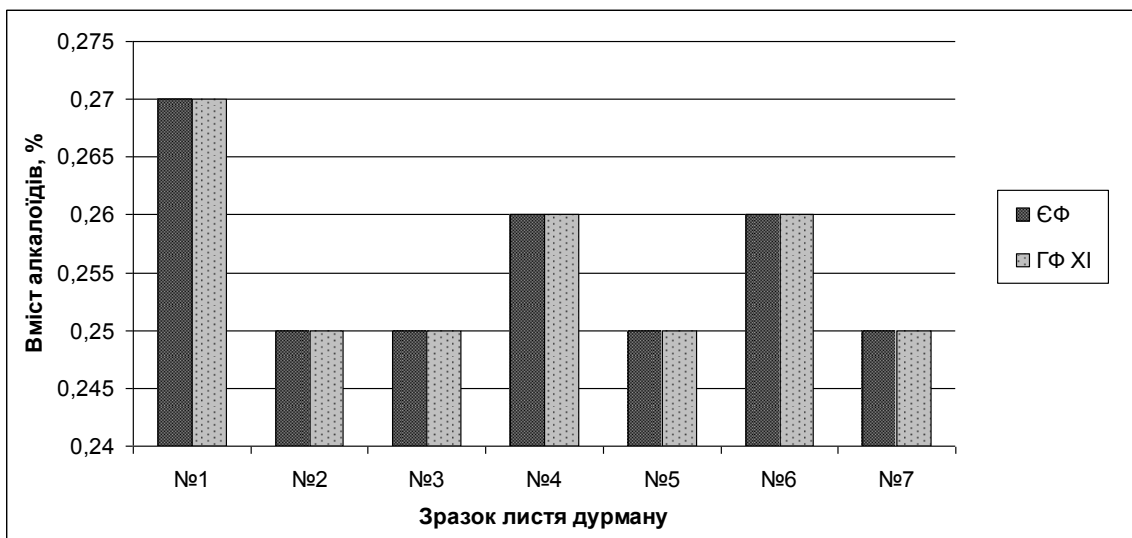


Рис. 2. Результати кількісного визначення вмісту суми алкалоїдів у зразках листя дурману звичайного

7. Висновки

Таким чином, методика ідентифікації алкалоїдів у листі дурману методом ТШХ дозволяє не тільки ідентифікувати сировину, а ще й здійснити контроль недопустимих видів сировини та належних умов зберігання сировини. Проаналізувавши методики кількісного визначення тропанових алкалоїдів у листі дурману, встановлено певні відмінності у їх пробопідготовці, проте обидві методики дозволяють визначити вміст суми алкалоїдів у зразках листя дурману звичайного. За результатами порівняльного аналізу кількісного визначення алкалоїдів встановлено, що всі зразки листя дурману відповідали встановленим нормування. Най-

більшим був вміст алкалоїдів у зразку № 1 і склав 0,27 %, вміст алкалоїдів у зразках № 4 та № 6 був встановлений на рівні 0,26 %, найменшим вмістом характеризувались зразки № 2, № 3, № 5 та № 7 (0,25 %).

Отримані експериментальні дані з якісного та кількісного визначення алкалоїдів в листі дурману звичайного використані при розробці монографії ДФУ «Дурману листя».

Література

1. Котов, А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину [Текст] / А. Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2012. – № 1. – С. 4–10.

2. Котов, А. Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України [Текст] / А. Г. Котов // Фармаком. – 2009. – № 1. – С. 5–19.
3. Siderits, R. Complete Herbal [Text] / R. Siderits. – London: The English Physitian, 2004. – 255 p.
4. Державна Фармакопея України [Текст]. – Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр»; 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.
5. European Pharmacopoeia. 7th ed. [Text]. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2009. – 5092 p.
6. Schollkraut G. Deutsches Arzneibuch [Text] / G. Schollkraut. – Stuttgart: Govi-Verlag GmbH, 1992. – 286 p.
7. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье [Текст]. – МЗ СССР; 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
8. Котова, Е. Е. Питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Белладони листя» [Текст] / Е. Е. Котова, А. Г. Котов, Н. І. Тихоненко // Фармаком. – 2008. – № 1. – С. 8–15.
9. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations [Text]. – European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg Cedex, France, 2007. – 22 p.
10. Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin [Text]. – European Medicines Agency, Evaluation of Medicines for Human Use. – London: EMEA, 2006. – 11 p.
11. Гризодуб, А. И. Проблемы введения монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную Фармакопею Украины [Текст] / А. И. Гризодуб, Г. В. Георгиевский, Т. М. Тихоненко, В. П. Георгиевский // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 3–17.

References

1. Kotov, A. G. (2012). Rules of presentation and procedure of development of monographs for herbal drugs. Management, Economics and Quality Assurance in Pharmacy, 1, 4–10.
2. Kotov, A. G. (2009). Study of development and introduction of monographs on herbal drugs into the State Pharmacopoeia of Ukraine. Pharmacom, 1, 5–19.
3. Siderits, R. (2004). Complete Herbal. London: The English Physitian, 255.
4. The State Pharmacopoeia of Ukraine. Ukrainian scientific Pharmacopoeial center for quality of medicines. 1st Ed. (2001). Kharkiv: RIREG, 556.
5. European Pharmacopoeia 7th ed. (2009). Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 5092.
6. Schollkraut, G. (1992). Deutsches Arzneibuch. Stuttgart: Govi-Verlag GmbH, 286.
7. The State Pharmacopoeia of USSR. Issue 2. General methods of analysis. Herbal products. USSR Ministry of Health. 11th Ed. completed (1989). Moscow: Medicine, 400.
8. Kotova, E. E., Kotov, A. G., Tikhonenko, N. I. (2008). Matters of introduction into SPU of the monograph «Belladonna leaf». Pharmacom, 1, 8–15.
9. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations (2007). European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg Cedex, France, 22.
10. Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin (2006). European Medicines Agency, Evaluation of Medicines for Human Use. London: EMEA, 11.
11. Grisodub, A. I., Georgiyevsky, G. V., Tikhonenko, T. M., Georgiyevsky, V. P. (2004). Matters of introduction of monographs on herbal drugs in the State Pharmacopoeia of Ukraine. Pharmacom, 4, 3–17.

*Рекомендовано до публікації д-р фарм. наук Владимірова І. М.
Дата надходження рукопису 12.11.2015*

Мищенко Володимир Анатолійович, кандидат фармацевтичних наук, старший викладач, кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: mivlan68@gmail.com

Прокопенко Юлія Сергіївна, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: yuliya.prok@gmail.com