

УДК 582.998.16:581.46:54.061/.062:547.587

DOI: 10.15587/2313-8416.2016.67614

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ПИЖМА КВІТКАХ

© М. Ю. Золотайкіна, Т. М. Гонтова, Е. Е. Котова, А. Г. Котов, С. М. Губарь

Tanacetum vulgare L. – широко розповсюджена на території України рослина, яка має значну сировинну базу. Відсутність національної нормативної документації на цей вид сировини вказує на актуальність досліджень у цьому напрямку та розробку сучасних методів ідентифікації фенольних сполук, як основної групи біологічно активних речовин (БАР).

Мета. Розробка методики ідентифікації фенольних сполук у квітках пижма звичайного, гармонізованої з вимогами Європейської фармакопеї (ЄФ).

Методи. Для досягнення поставленої мети використовували уніфіковану ТШХ-методику, яка описана у монографіях Державної фармакопеї України (ДФУ) для ідентифікації фенольних сполук в різних видах ЛРС. Проводили визначення валідаційних характеристик методики для досліджуваного виду сировини.

Результати. Розроблено методику ідентифікації фенольних сполук методом ТШХ у сировині пижма квітки з урахування сучасних підходів ЄФ до стандартизації ЛРС. Валідацію методики ідентифікації проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, робастність і прецизійність. Ця методика запропонована для включення у монографію «Пижма звичайного квітки» до ДФУ.

Висновки. Вперше розроблено методику ідентифікації суми фенольних речовин у квітках пижма звичайного методом ТШХ. У результаті валідації методики ідентифікації фенольних сполук за валідаційними характеристиками (специфічність, робастність і прецизійність) були обрані наступні умови хроматографування: ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці, об'єм нанесення як досліджуваних зразків так і стандартних зразків 10 мкл, рухома фаза: мурашина кислота безводна-вода-метилетилкетон-етилацетат у співвідношенні (10:10:30:50), виявлення – обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі та макрогону в метанолі та перегляд при 365 нм. Методику визначення якісного складу фенольних сполук пижма запропоновано для включення у проект монографії «Пижма звичайного квітки»

Ключові слова: лікарська рослина сировина, стандартизація, пижма квітки, флавоноїди, метод тонкошарової хроматографії

Tanacetum vulgare L. is widespread herb in Ukraine, having a substantial resource base. The absence of national normative documentation for this type of herbal material points to the relevance of research in this area and development of modern methods for identification of phenolic compounds as a main group of biologically active substances.

Aim. Development of harmonized with European Pharmacopoeia (PhEur) requirements method for identification of phenolic compounds in Tansy flowers.

Methods. For the purpose mentioned above, a standardized TLC-method described in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) monographs for identification of phenolic compounds in different types of herbal material was used. Validation parameters of the method for the studied herb were determined.

Results. A TLC method for identification of phenolic compounds in Tansy flowers considering modern PhEur approaches to standardization of herbs was developed. Validation of the identification method was carried out for the following validation parameters: specificity, robustness, and precision. This method was offered for implementation to the SPhU monograph «Tansy flowers».

Conclusion. TLC method for identification of phenolic compounds in Tansy flowers was developed for the first time. As a result of validation of the given method for identification of phenolic compounds, by validation parameters (specificity, robustness, and precision), following chromatography conditions were selected: Silica gel coated Aluminum-backed TLC plates, application volume for both test samples and reference samples was 10 μ l, mobile phase: formic acid concentrated – water – methyl ethyl ketone – ethyl acetate (10:10:30:50 V/V/V/V), detection – spraying with solutions of aminoethyl diphenylborinate in methanol and macrogol in methanol and view under 365 nm UV. The method for quantitative determination of phenolic compounds in Tansy flowers was offered for implementation in «Tansy flowers» draft monograph

Keywords: herbal material, standardization, Tansy flowers, flavonoids, thin-layer chromatography method

1. Вступ

Tanacetum vulgare L. – широко розповсюджена на території України рослина, яка має значну сировинну базу. На вітчизняному фармацевтичному ринку України представлені препарати – «Пижма квітки» у пачках і фіточай «Грація № 20

(Очищующий)» виробництва ПрАТ «Ліктрави», м. Житомир; косметичний засіб «Угрин» (ВАТ "Хімфармзавод "Червона зірка", м. Харків), дієтичні добавки «Фіточай № 5 противоглислий» («Naturalis», м. Житомир), «Пижма» таблетки (ТОВ «Фірма «Даніка»).

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

У літературних першоджерелах діючи речовини сировини пижма звичайного представлені декількома класами біологічно активних речовин (БАР), серед яких переважають фенольні сполуки, а саме: флавоноїди – лютеолін, лютеолін-7-глікозид, акацетин, кверцетин, цинарозид, космосейн, тіллаїнін, рутин; гідроксикоричні кислоти – хлорогенова та кофейна; також містить ефірну олію, до складу якої входить туйон, камфора, борнеол тощо; алкалоїди, гіркоти, органічні кислоти [1–3]. Це обумовлює широкий спектр фармакологічної активності даної лікарської рослинної сировини (ЛРС) такої як, антигельмінтна, жовчогінна, протизапальна, жарознижуюча, сечогінна, гіпертензивна, знеболююча [4]. Відсутність національної нормативної документації на цей вид сировини вказує на актуальність досліджень у цьому напрямку та розробку сучасних методів ідентифікації фенольних сполук, як основної групи БАР.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій

Проведено критичний аналіз існуючої документації на сировину пижма звичайного [5–7]. Якість квіток пижма звичайного на сьогоднішній день регламентується Державною фармакопеею ЄСРР XI (ДФ XI), що була розроблена 25 років тому та сучасними фармакопеями – Державною фармакопеею Російської Федерації (ДФ РФ XII) і Державною фармакопеею Республіки Білорусь (ДФ РБ). Крім того, дана сировина описана в Британській гомеопатичній Фармакопеї (ВНР). Проте монографія на пижма квітки у Державній фармакопеї України відсутня.

4. Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми

Ідентифікація квіток пижма звичайного у монографії «Квітки пижма», відповідно до ДФ XI проводиться, за макро- та мікроскопічними ознаками. Розділ «Макроскопія» регламентує опис лише кошків, трубчастих квіток, чашечки, верхівкового листя та стеблових частин генеративного пагону не регламентуються, але є складовими сировини. У зв'язку з цим, нами проведені дослідження у цьому напрямку, що будуть запропоновані у проекті монографії «Пижма звичайного квітки» для ДФУ [10]. Обов'язковою вимогою ДФУ до ЛРС є ідентифікація основних БАР за допомогою сучасних аналітичних методів, таких як ТШХ, ГХ, ВЕРХ [8, 9]. БАР у сировині пижма не визначаються за допомогою жодного фізико-хімічного методу. Для проведення ідентифікації нами обрано експрес метод – ТШХ аналіз, тому що він є достовірним, доступним та економічно виправданим.

Отже, очевидна актуальність розробки методики ідентифікації фенольних сполук у квітках пижма звичайного за допомогою ТШХ аналізу.

5. Формулювання мети (задач) статті

Розробка методики ідентифікації фенольних сполук у квітках пижма звичайного методом ТШХ, гармонізованої з вимогами ЄФ до ЛРС.

6. Виклад основного матеріалу дослідження (методів і об'єктів) з обґрунтуванням отриманих результатів

Для дослідження використовували 7 зразків сировини пижма звичайного, зібраних у різних регіонах України у 2014 році, а саме: Харківської (1), Сумської (2), Львівської (3), Полтавської (4), Донецької (5), Чернігівської (6) та Луганської (7) областей. Усі зразки заготовляли самостійно, збирали у липні місяці під час масового цвітіння, висушували та зберігали відповідно до правил заготівлі ЛРС.

Розробка методики ідентифікації фенольних сполук методом ТШХ. Для досягнення поставленої мети використовували уніфіковану ТШХ-методику, яка описана в монографіях ДФУ для ідентифікації фенольних сполук в різних видах ЛРС [11]. Наша робота складалася з наступних етапів: встановлення основної групи БАР за літературними джерелами, що є специфічними для пижма квіток; вибір стандартних зразків; вибір умов хроматографування. Валідацію методики ідентифікації проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, робастність і прецизійність. Вивчення робастності проводили визначенням впливу типу пластинки, насиченості камери, об'єму нанесення та впливу проявника. Специфічність методики вивчали, порівнюючи хроматографічний профіль випробовуваних розчинів сировини із зонами стандартних зразків. Прецизійність методики вивчали, порівнюючи хроматографічні профілі випробовуваних зразків сировини, одержані на різних пластинках, різними аналітиками, в різні дні.

Результати проведеного літературного аналізу показали, що для сировини пижма характерними є такі класи сполук як флавоноїди та гідроксикоричні кислоти. Тому було вирішено проводити ідентифікацію саме за цими класами сполук. Згідно аналізу результатів наукових робіт, представлених у професійних фахових виданнях, встановлені специфічні речовини, за якими доречно проводити ідентифікацію, а саме лютеолін, лютеолін-7-глікозид, хлорогенова та кофейна кислоти [12].

При розробці методики нами були використані ТШХ-пластинки з шаром силікагелю (5-40 мкм) із різними підложками, а саме скляною і алюмінієвою. Результати оцінювали, з точки зору відтворюваності хроматографічного профілю, отриманого на різних пластинках. Для подальших досліджень було обрано ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці. У процесі розробки використовували різні об'єми нанесення – 10 мкл, 20 мкл та 50 мкл. В результаті експерименту було підібрано необхідні об'єми нанесення випробовуваного розчину і розчинів порівняння, які склали 10 мкл, що дозволяють отримати репрезентативні та відтворювані хроматограми. При виборі рухомої фази і відповідних умов

детектування для ідентифікації флавоноїдів і гідроксикоричних кислот у сировині пижма, нами були використані наступні умови.

Перші умови. Рухома фаза: оцтова кислота льодяна-вода-бутанол у співвідношенні (17:17:66), виявлення – обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі та мак-

роголу в метанолі та перегляд при 365 нм. Дані умови описані в монографії ДФУ «Римської ромашки квітки» при ідентифікації в сировині флавоноїдних сполук (лютеоліну, апігеніну, лютеолін-7-глюкозиду та ін.). Хроматограми випробовуваних розчинів різних зразків пижма квіток, одержані в умовах зазначеної методики, наведено на рис. 1.

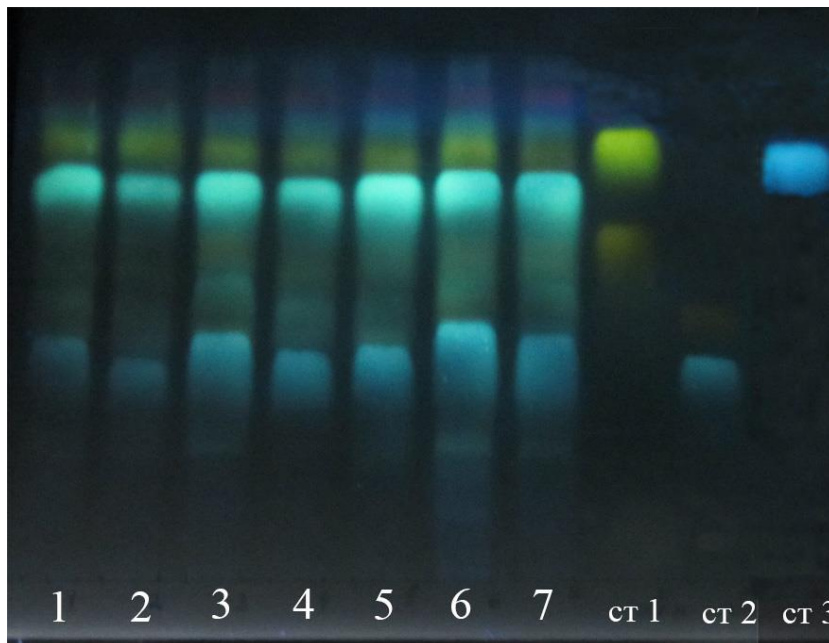


Рис. 1. Хроматограми метанольних екстрактів пижма квіток, заготовлених у різних областях України, та стандартних зразків 1-3: 1 –Харківська обл.; 2 – Сумська обл.; 3 – Львівська обл.; 4 – Полтавська обл.; 5 – Луганська обл.; 6 – Чернігівська обл.; 7 – Донецька обл.; ст. 1 – стандартні зразки лютеоліну (верхня зона) та лютеоліну-7-глюкозиду (нижня зона); ст. 2 – стандартні зразки рутину та хлорогенової кислоти; ст. 3 – стандартний зразок кофейної кислоти

Другі умови. Рухома фаза: мурашина кислота безводна-вода-метилетилкетон-етилацетат у співвідношенні (10:10:30:50), виявлення – аналогічно першим умовам. Дані умови є уніфікованими і використовуються в декількох монографіях ДФУ («Берези

листя», «Бузини квітки», «Глоду листя та квітки», «Глоду плоди», «Липи квітки» та ін.). Хроматограми випробовуваних розчинів різних зразків пижма квіток, одержані в умовах зазначеної методики, наведено на рис. 2.

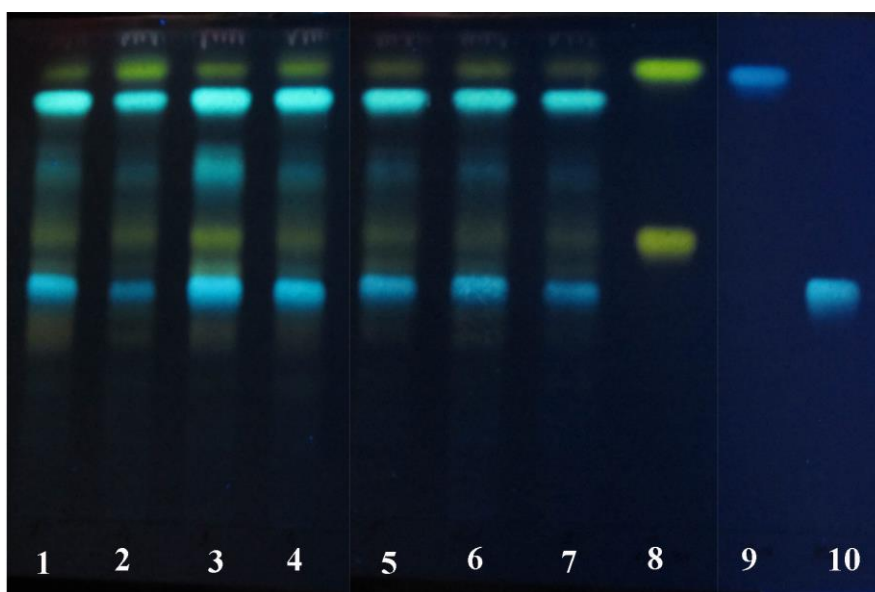


Рис. 2. Хроматограми метанольних екстрактів пижма квіток, заготовлених у різних областях України, та стандартних зразків: 1 – Харківська обл.; 2 – Сумська обл.; 3 – Львівська обл.; 4 – Полтавська обл.; 5 – Луганська обл.; 6 – Чернігівська обл.; 7 – Донецька обл.; ст. 1 – стандартний зразок лютеоліну (верхня зона) та лютеоліну-7-глюкозиду (нижня зона); ст. 2 – стандартний зразок кофейної кислоти; ст. 3 – стандартний зразок хлорогенової кислоти

Як видно із наведених даних рис. 1, 2, хроматографічні профілі випробовуваних розчинів, одержані в різних умовах, дуже близькі, вибір був зупинений на 2 умовах, оскільки вони є уніфікованими. Ідентичні результати були отримані також при вивченні прецизійності методики – хроматографічні профілі випробовуваних розчинів не змінювалися при отриманні на різних серіях пластинок, різними аналітиками, в різні дні.

У результаті проведеного дослідження 7 серій квіток пижма виявлено 6 основних характерних зон на хроматографічному профілі випробовуваних розчинів, одержаних із сировини, з яких ідентифіковано 3 зони у порівнянні із зонами стандартних зразків. Всі досліджувані зразки сировини містили лютеолін, лютеолін-7-глікозид та хлорогенову кислоту. Наявність кофейної кислоти не відмічалася у жодному зразку.

У результаті вивчення хроматографічного профілю екстрактів сировини було встановлено, що серед флавоноїдних сполук переважають представники флавонів. Такий факт свідчить про перспективність розробки методики кількісного визначення суми флавоноїдів із перерахунком на лютеолін, що буде проведено у наших подальших дослідженнях.

7. Висновки

Вперше розроблено методику ідентифікації суми фенольних речовин у квітках пижма звичайного методом ТШХ.

У результаті валідації методики ідентифікації фенольних сполук за валідаційними характеристиками (специфічність, робастність і прецизійність) були обрані наступні умови хроматографування: ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці, об'єм нанесення як досліджуваних зразків так і стандартних зразків 10 мкл, рухома фаза: мурашина кислота безводна-вода-метилетилкетон-етилацетат у співвідношенні (10:10:30:50), виявлення – обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі та макроголу в метанолі та перегляд при 365 нм.

Методику визначення якісного складу фенольних сполук пижма запропоновано для включення у проект монографії «Пижма звичайного квітки».

Література

1. Хворост, П. П. Желчегонные вещества пижмы обыкновенной [Текст] / П. П. Хворост, Г. В. Оболенцева, Н. Ф. Комиссаренко. – К.: Наук. думка, 1984. – 137 с.
2. Яковлева, А. И. Биологически активные вещества пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., произрастающей в центральной Якутии [Текст] / А. И. Яковлева, В. В. Семенова // Химия растительного сырья. – 2010. – № 3. – С. 147–152.
3. Kurkin, V. A. The flavonoids as the criteria of the identity and quality of the medicinal plants and phytopharmaceuticals [Text] / V. A. Kurkin, E. V. Avdeeva, A. V. Kurkina et al. // Drug Discovery & Therapy. – 2013. – P. 170.
4. Путьрский, И. Универсальная энциклопедия лекарственных растений [Текст] / И. Путьрский, В. Прохоров. – Мн.: Книжный дом; Махаон, 2000. – 656 с.

5. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2 [Текст]. – Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья. – М.: Победа, 2008. – С. 399–400.

6. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издания. Ч. 1 [Текст]. – М.: Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.

7. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2 [Текст]. – Общии методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – 11-ое изд. – М.: Медицина, 1990. – С. 247–249.

8. Котов, А. Г. Фармакопейные аспекты стандартизации качества лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе [Текст]: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / А. Г. Котов. – Харьков, 2013. – 40 с.

9. Котов, А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослину сировину [Текст] / А. Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2011. – № 6 (20). – С. 16–22.

10. Золотайкіна, М. Ю. Морфолого-анатомічні ознаки надземних органів пижма звичайного [Текст] / М. Ю. Золотайкіна, Л. М. Сіра, Т. М. Гонтова // Фармацевтичний часопис. – 2016. – № 1. – С. 23–29.

11. Котова, Е. Е. Систематизація фармакопейних вимог до методів контролю якості лікарської рослини сировини. Уніфіковані ТШХ-методику ідентифікації [Текст] / Е. Е. Котова, А. Г. Котов // Фармаком. – 2015. – № 1. – С. 41–47.

12. Куркина, А. В. Исследование флавоноидного состава цветков пижмы обыкновенной [Текст] / А. В. Куркина // Химия природных соединений. – 2011. – № 4. – С. 209–212.

References

1. Hovorost, P. P., Obolenceva, G. V., Komissarenko, N. F. (1984). *Zhelchegonnye veshhestva pizhmy obyknovnoy*. Kyiv: Nauk. dumka, 137.
2. Yakovleva, A. I., Semenova, V. V. (2010). *Biologicheski aktivnye veshhestva pizhmy obyknovnoy Tanacetum vulgare* L., proizrastajushhej v central'noj Jakutii. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 3, 147–152.
3. Kurkin, V. A., Avdeeva, E. V., Kurkina, A. V. et al. (2013). The flavonoids as the criteria of the identity and quality of the medicinal plants and phytopharmaceuticals. *Drug Discovery & Therapy*, 170.
4. Putyrskij, I., Prohorov, V. (2000). *Universal'naja jenciklopedija lekarstvennyh rastenij*. Minsk: Knizhnyj dom; Mahaon, 656.
5. Gosudarstvennaja farmakopeja Respubliki Belarus'. Vol. 2 (2008). *Kontrol' kachestva vspomogatel'nyh veshhestv i lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja*. Moscow: Pobeda, 399–400.
6. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XII izdanija. *Cher. 1* (2008). Moscow: Izdatel'stvo «Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya», 704.
7. Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR. Issue 2 (1990). *Obshhin metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e*. Moscow: Medicina, 247–249.
8. Kotov, A. G. (2013). *Farmakopejnye aspekty standartizacii kachestva lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja i preparatov na ego osnove*. Kharkiv, 40.
9. Kotov, A. G. (2011). *Pravyla vykladannja ta porjadok rozrobky monografij na likars'ku roslinnu syrovynu. Upravlinnja, ekonomika ta zabezpechennja jakosti v farmacii*, 6 (20), 16–22.
10. Zolotajkina, M. Ju., Sira, L. M., Gontova, T. M. (2016). *Morfologo-anatomichni oznaky nadzemnyh organiv pyzhma zvyčajnogo*. *Farmaceutychnyj chasopys*, 1, 23–29.