

УДК 615.074

АЛГОРИТМ ВЫБОРА ВЕЩЕСТВ-МАРКЕРОВ ПРИ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

А.Н. Кузьменко, И.И. Краснюк (мл.), А.В. Пирогов*

(Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;*

e-mail: kuzmenko.mma@mail.ru)

Для изучения химического состава и стандартизации лекарственного растительного сырья и растительных сборов предложены два взаимодополняющих хроматографических метода - ионо-эксклюзионная и газо-жидкостная хроматография. Предложены алгоритм для выбора одного из двух методов, учитывающий компонентный состав растительных сборов, а также классификация веществ-маркеров по степени их встречаемости в конкретных видах лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: газо-жидкостная хроматография, ионо-эксклюзионная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, стандартизация растительного лекарственного сырья и растительных сборов, вещества-маркеры.

При изучении частных фармстатей, имеющих в Государственной Фармакопее XI, установлено, что число видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), для которых в частных статьях нормируются показатели действующих и/или экстрактивных веществ составляет 82,5%. В 15,1% частных фармстатей определяют только число экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом разной концентрации (например, цветки ноготков, трава пустырника, корневища с корнями валерианы, т.е. те виды лекарственного растительного сырья, для стандартизации которых мы предлагаем использовать современные хроматографические методы). В 17,4% частных фармстатей не предполагается определения ни действующих, ни экстрактивных веществ (среди них цветки бузины черной, липы, листья мать-и-мачехи, крапивы, корень девясила, для этих видов сырья мы также предлагаем хроматографические методы). В 2000 г. ОСТ 91500.05.001-00 подтвердил обязательность проведения качественных реакций или хроматографических проб при стандартизации ЛРС. В 2006 г. в рекомендации по разработке нормативной документации на лекарственное растительное сырье был включен ряд уточнений и ужесточений требований. Для определения подлинности ЛРС могут быть использованы тонкослойная хроматография, газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и другие методы анализа [1]. Все это делает задачу совершенствования хроматографических методик в приложении их

к анализу и стандартизации лекарственного растительного сырья чрезвычайно актуальной.

Экспериментальная часть

Экстракты растительного сырья получали методом ремацерации. Экстрагент (пятикратный объем) разделяли на порции. Общее время настаивания – семь суток. Сначала растительное сырье экстрагировали четверо суток трехкратным объемом экстрагента, после прессования экстракцию проводили однократным объемом экстрагента в течение двух суток, а затем в течение одних суток – оставшимся однократным объемом экстрагента.

Пробоподготовка

Флакон с полученным экстрактом помещали без нагрева на 10 мин в ультразвуковую ванну-мешалку «Сапфир». Затем отбирали 10 мл экстракта в специальную пластиковую колбу и помещали на 2 мин в центрифугу «Ohaus Split 16000 rpm» (16000 об/мин). Отбирали микродозатором 1 мл экстракта с поверхности для предотвращения попадания частиц сырья и помещали в барабан инжектора хромато-масс-спектрометра.

Работу проводили на газовом хроматографе «Agilent Technologies 6850 Series II» с масс-селективным детектором «Agilent Technologies 5973 Network». Условия хроматографирования: колонка «Agilent Technologies HP-5MS» длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, температура колонки 30–240°C; скорость подъема температуры 5 град/мин;

конечный изотермический участок 10 мин; температура испарителя 200°C; температура инжектора 30°C; скорость газа-носителя(гелий) 1мл/мин.

При использовании метода ионо-экслюзионной хроматографии (ИЭХ) работу проводили на приборе «Цвет 3006» с кондуктометрическим детектором на сорбенте «Aminex Q-15S» с 5 мМ раствором бензойной кислоты в качестве элюента, кроме тех случаев, когда требовалось лучшее разделение кислот, имеющих близкие времена удерживания, такие, например, как щавелевая кислота и неорганические кислоты (янтарная и фумаровая).

В случае щавелевой и неорганических кислот настои и отвары растений исследовали на приборе «Kontron» на сорбенте Aminex A5 при использовании УФ-детектора ($\lambda = 210$ нм). Следует отметить, что на сорбенте Aminex Q-15S невозможно разделить щавелевую и неорганические кислоты, в то время, как они в значительных количествах присутствуют практически во всех лекарственных растениях. Эта задача решалась при параллельном измерении на приборе «Kontron», так как время удерживания неорганических и щавелевой кислот составляет соответственно 2,3 и 7,5 мин ($F = 0,8$ мл/мин). Неорганические ионы не удерживаются на колонке.

Результаты и их обсуждение

В ходе изучения более 40 видов лекарственного растительного сырья методом ГЖХ [2–6] мы с определенностью установили, что все вещества-маркеры можно разделить на три группы – уникальные, специфические и неспецифические. Уникальные вещества-маркеры идентифицируются, как правило, лишь в одном виде лекарственных растений, по крайней мере, из тех, что используются в медицинской практике. Специфические маркеры можно найти в незначительном числе растений. Вещества, относящиеся к неспецифическим маркерам, характерны для многих растений, идентифицируются часто, и по наличию лишь одного из них никогда нельзя судить о подлинности сырья.

К первой группе относится небольшое число химических веществ, в частности (2Z)-2(гекса-2,4-диин-1-илиден)-1,6-диоксапиро[4,4]нон-3-ен (ромашка аптечная), кумарин и гидрокумарин (донник лекарственный), изовалериановая кислота (валериана лекарственная), бициклические сесквитерпены кадианового типа (календула лекарственная). Ко второй группе можно отнести ледол и палюстрол (багульник болотный), ментол и родственные ему вещества (мята перечная), β -элемен, шиобунон, азарон и азариловый

альдегид (аир болотный), анетол (анис обыкновенный), гераниол ацетат и β -цитраль (мелисса лекарственная), 3,7-диметил-2,6-октадиен-1-ол, линалоол и тимол (тимьян обыкновенный), производные фурана (ягодное сырье растений из семейства брусничные *Vacciniaceae*). Третья группа веществ наиболее многочисленна, в нее входят в основном терпены и терпеноиды, хотя есть и весьма часто встречающиеся вещества, относящиеся к другим классам (фитол, гексагидрофарензил ацетон, сквален и др.). К числу терпенов и терпеноидов относятся такие вещества как эвкалиптол, пинен, терпинеол, кариофиллен, фелландрен, спатуленол, гермакрен и многие другие.

Классификация обнаруженных в растительном сырье химических веществ (рис. 1) является первоочередной задачей при стандартизации и позволяет решить вопрос, можно ли ограничиться методом ГЖХ, или необходимо использовать ИЭХ в качестве дополняющего хроматографического метода.

При стандартизации сырья, в составе которого идентифицируются уникальные вещества-маркеры, установлено, что данные вещества практически всегда позволяют установить подлинность сырья практически вне зависимости от того, в каких концентрациях они присутствуют в составе растения. Сама высокая специфичность веществ-маркеров гарантирует их идентификацию на хроматограмме, т.е. проблем с селективностью метода в таких случаях не возникает. Пример лекарственного растения с высоким содержанием маркера (3,35–4,43%) – ромашка аптечная, в составе которой идентифицируется (2Z)-2(гекса-2,4-диин-1-илиден)-1,6-диоксапиро[4,4]нон-3-ен (рис. 2).

Примером лекарственного растения, в составе которого содержание уникального вещества-маркера может быть незначительным, является календула лекарственная, в составе которой содержание бициклических сесквитерпенов кадианового типа варьирует от 0,56 до 5,75% (т.е. относительное содержание вещества-маркера может быть менее 1%). Тем не менее даже низкое содержание вещества-маркера не мешает подтверждению подлинности растительного сырья. В качестве примера рассмотрим типичную хроматограмму для растительного сбора «Сбор мочегонный» (рис. 3). Δ -кадинен и α -кадинол с успехом идентифицируются на хроматограмме, несмотря на свое невысокое содержание (0,65 и 0,58% соответственно).

При стандартизации сырья, в составе которого идентифицируются вещества-маркеры, относящиеся ко второй группе, определенную роль играет

Уникальные вещества-маркеры	1,6-Диоксаспиро[4.4]нон-3-ен, 2-(2,4-гексативинилиден) Кумарин, гидрокумарин Изовалериановая кислота Бициклические сесквитерпены кадинанового типа
Специфические вещества-маркеры	Ментол, ментон, пулегон, пиперитон Ледол, палюстрол 3,7-Диметил-2,6-октадиен-1-ол, линалоол
Неспецифические вещества-маркеры	α -Пинен, эвкалиптол, α -терпинеол, фелландрен β -Фелландрен, п-цимен, β -оцимен, кариофиллен, гермакрен Д, спатуленол Эвкалиптол, камфора

Рис. 1. Пример классификации веществ-маркеров для дальнейшего выбора хроматографического метода

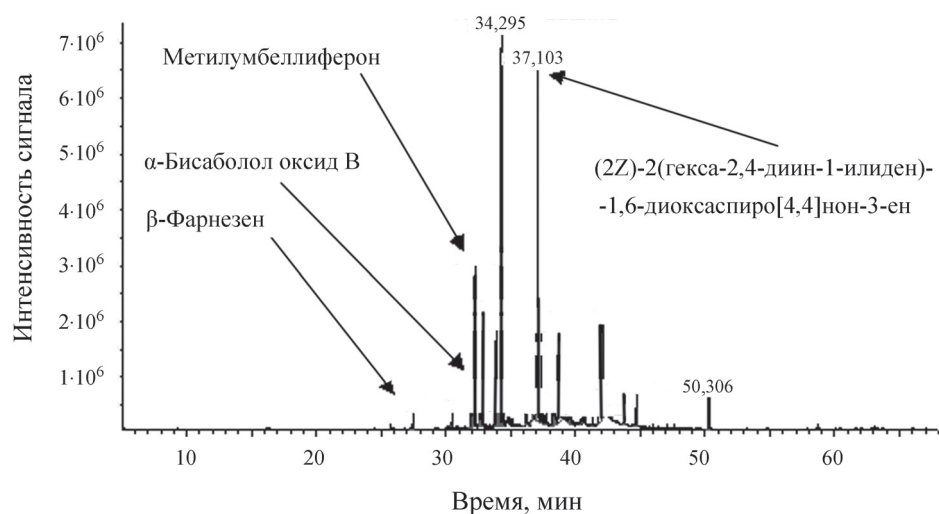


Рис. 2. Типичная хроматограмма экстракта сырья ромашки аптечной. Газовый хроматограф «Agilent Technologies 6850 Series II» с масс-селективным детектором «Agilent Technologies 5973 Network». Градиент температуры – 35°C 3 мин, 35–220°C по 5°/мин, 220°C – 10 мин, 220–240°C по 2°/мин, 240°C – 5 мин, 35°C – 5 мин. Температура детектора 200°C

относительное содержание изучаемого сырья в сборе. Так, идентификация сырья мяты перечной в сборах оказывается возможной при содержании данного вида сырья в сборе не менее 5%. Для сырья багульника этот показатель колеблется в диапазоне 5–7%, для сырья тимьяна обыкновенного его относительное содержание должно быть 7–9%. В целом, чувствительность метода ГЖХ обычно позволяет

стандартизировать лекарственные сборы и по количественному содержанию такого вида сырья.

Алгоритм выбора хроматографического метода для стандартизации лекарственного растительного сырья схематически представлен на рис. 4. При наличии в составе сырья хотя бы одного известного уникального вещества-маркера вполне достаточно воспользоваться методом ГЖХ для стандартиза-

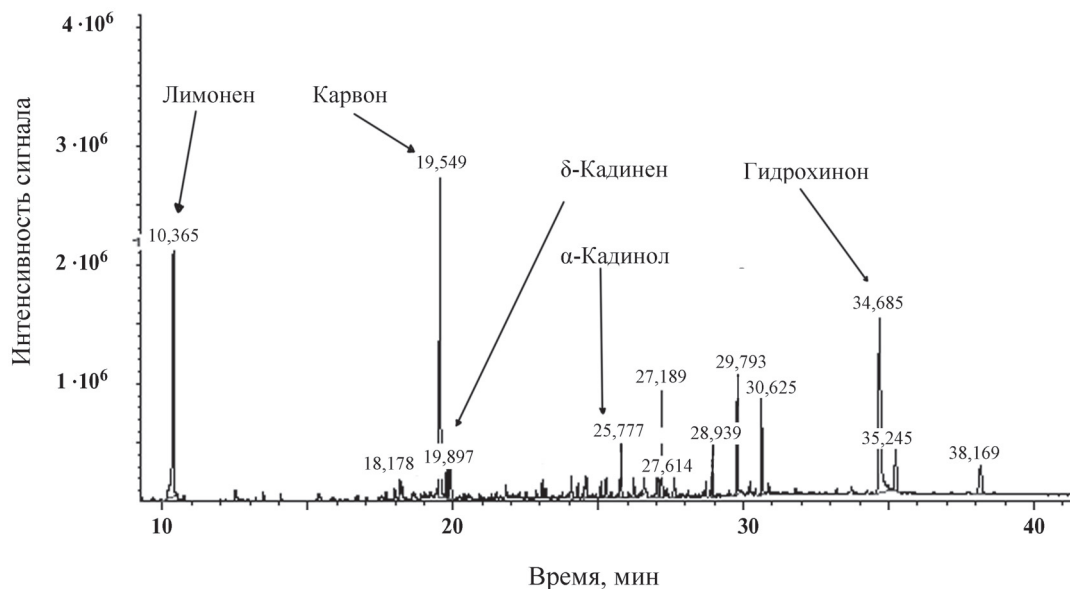


Рис. 3. Типичная хроматограмма экстракта растительного сбора «Сбор мочегонный» (толокнянки листьев 40%, ноготков цветков 20%, укропа плодов 20%, элеутерококка корневищ и корней и мяты перечной листьев по 10%). Хроматографические условия приведены на рис. 2

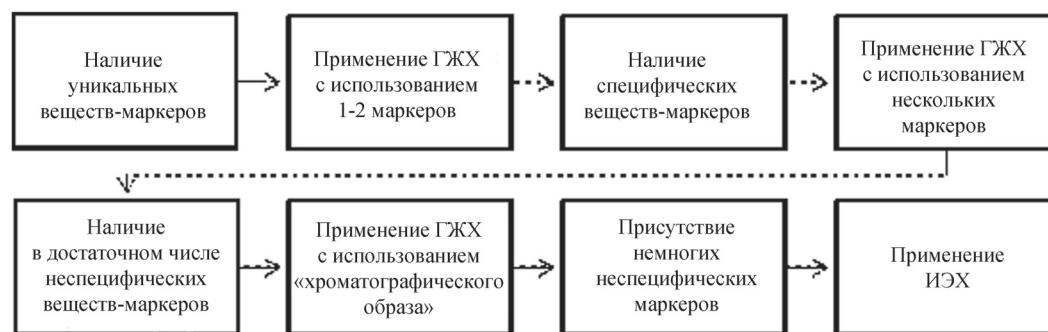


Рис. 4. Алгоритм выбора хроматографического метода для стандартизации лекарственного растительного сырья

ции как данного конкретного вида сырья, так и содержащих его растительных сборов. В том случае, когда мы имеем дело с растительным сырьем, содержащим специфические вещества-маркеры, то обычно применяется метод ГЖХ с привлечением нескольких веществ-маркеров в качестве «реперных» соединений, если же в данном виде сырья присутствуют в достаточном числе (5-6 или более) неспецифические вещества-маркеры, то следует применять метод ГЖХ с использованием «хроматографического образа» (кластер нескольких пиков, соответствующих ряду неспецифических соединений). В качестве примера приведем типичную хроматограмму для сырья эвкалипта прутовидного (рис. 5). Несмотря на низкую селективность из-за большого числа определяемых летучих веществ,

наличие α -пинена, эвкалиптола, α -фелландрена, α -терпинеола, кариофиллена и глобулола в совокупности позволяет подтверждать подлинность данного вида лекарственного растительного сырья, несмотря на то, что каждое из этих веществ само по себе является неспецифическим.

Если в составе лекарственного растительного сырья обнаружено лишь небольшое число неспецифических веществ-маркеров (2-3), то в качестве дополняющего хроматографического метода рекомендуется использовать ИЭХ. При стандартизации лекарственного растительного сырья этим вариантом ВЭЖХ в качестве веществ-маркеров используются карбоновые кислоты, особенно такие специфические, как фумаровая, янтарная, изовалериановая и винная и аскорбиновая [7].

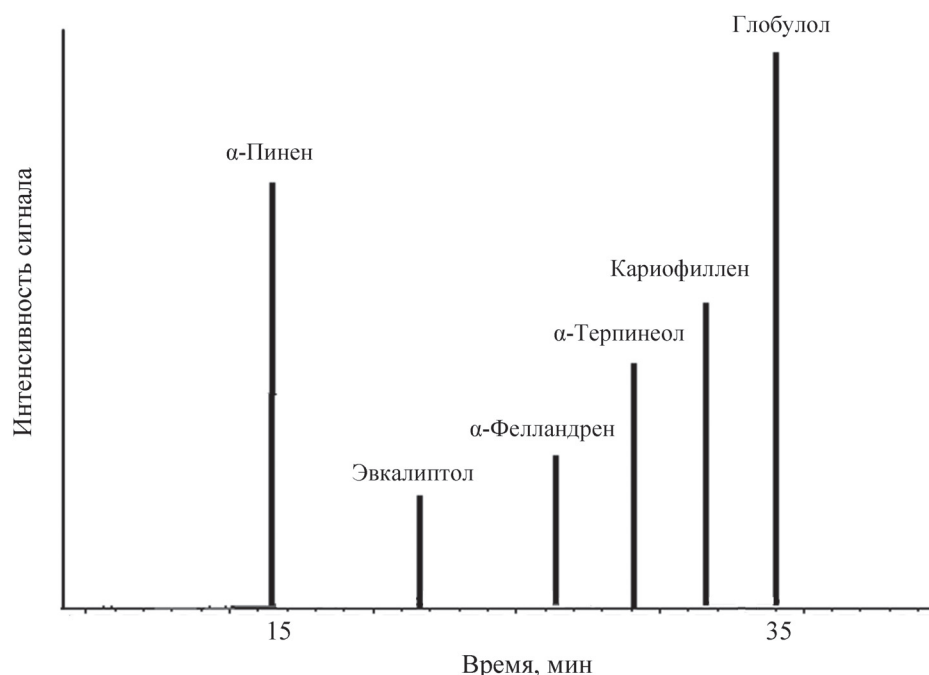


Рис. 5. Типичная хроматограмма экстракта сырья эвкалипта прутовидного. Хроматографические условия приведены на рис. 2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. М., 2009. С. 26.
2. Кузьменко А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. 50. № 3. С. 212.
3. Кузьменко А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. 50. № 4. С. 278.
4. Кузьменко А.Н., Пащикова Е.Б., Пирогов А.В., Разживин Р.В., Решетняк В.Ю. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. 51. № 2. С. 132.
5. Кузьменко А.Н., Доброхотов Д.А., Разживин Р.В., Нестерова О.В., Решетняк В.Ю., Попков В.А. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 10. С. 3.
6. Доброхотов Д.А., Кузьменко А.Н., Нестерова О.В., Решетняк В.Ю., Попков В.А., Пащикова Е.Б., Пирогов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. 52. № 2. С. 149.
7. Кузьменко А.Н., Решетняк В.Ю., Попков В.А., Пащикова Е.Б., Пирогов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. 52. № 5. С. 394.

Поступила в редакцию 30.03.14

THE ALGORITHM OF MARKER SUBSTANCES CHOICE FOR THE RAW PLANT MATERIAL GAS-CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION

A.N. Kuzmenko, I.I. Krasnyuk (Jr.), A.V. Pirogov

(I. M. Sechenov First Moscow State Medicine University, M.V. Lomonosov Moscow State University)

Two chromatographic methods- gas-liquid chromatography with mass-selective detector and ion- exclusion chromatography offers for the standartisation of the raw plant material and herb mixtures. The method of choice of these two methods offers. The classification of marker substances in the raw plant material describes.

Key words: gas-liquid chromatography with mass-selective detector, ion- exclusion chromatography, officinal herbs, standartisation of the raw plant material and herb mixtures.

Сведения об авторах: Кузьменко Алексей Николаевич – профессор Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, докт. фарм. наук (kuzmenko.mma@mail.ru); Краснюк Иван Иванович (мл.) – профессор Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, докт. фарм. наук Пирогов Андрей Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии МГУ, докт. хим. наук (pirogov@analyt.chem.msu.ru).