



**Державна Фармакопея України – європейська якість
вітчизняних лікарських засобів**

**Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України**

**ВПЛИВ ЗАСТОСОВУВАНИХ АНАЛІТИЧНИХ
МЕТОДИК НА ОБ'ЄКТИВНІСТЬ ОЦІНКИ ЯКОСТІ
ЧОРНИЦІ ПАГОНІВ**

**Людмила Вронська, Марія Михалків, Анна Демид,
Ірина Івануса, Іванна Кернична**



Кількісні показники якості чорниці (ДФУ 2.2)



ЛИСТЯ

ПАГОНИ

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид

Вміст суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол

0.8%

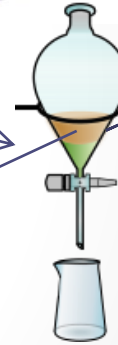
4%

Мета. Дослідження можливостей застосування різних аналітичних методик визначення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот для об'єктивної оцінки якості ЛРС чорниці пагонів.

Флавоноїди пагонів, листя і плодів чорниці

Аглікони	Листя	Пагони	Плоди
	кверцетин, кемпферол	кверцетин [6, 11], кемпферол [6, 11]	кверцетин [3-5, 10, 12], кемпферол [5], мірицетин [3-5],
Кверцетин [3-6, 9, 10, 11, 12]	3-рамнозид [1, 2, 7, 12, 13, 16], 3-глюкозид [1, 2, 7, 12-5], 3-арабінозид [1, 2, 7, 12, 15, 16], 3-О-глюкуронід [8, 12, 15], 3-О-β-галактозид [12, 13, 16], 3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилпгutarоїл)]-α-рамнозид [12-16], гексозид [12, 13], пентозид [13], 3-О-рутинозид [15, 16], галактозид [15], ксилозид [15, 16], 3-О-арабінофуранозид [15, 16], ацетилглюкозид [15]	3-рамнозид [14], 3-глюкозид [14], О-β-галактозид [14], 3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилпгutarоїл)]-α-рамнозид [14], гексозид [14], пентозид [14]	3-рамнозид [14], 3-глюкозид [14], О-β-галактозид [14], 3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилпгutarоїл)]-α-рамнозид [14], гексозид [14], пентозид [14]
Кемпферол [6, 11]	3-О-глюкуронід [8], пентозид [12, 15], 3-О-рамнозид [15, 16], 3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилпгutarоїл)]-α-рамнозид [16]		

- Friedrich H, Schönert J. *Planta Medica*. 1973;25(05):90-100.
- Häkkinen S, Auriola S. *J. Chromatography A*. 1998;829(1-2):91-100.
- Häkkinen SH, Törrönen AR. *Food Research Intern*. 2000;33(6):517-24.
- Häkkinen S, Heinson M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R. *Food Research Inter*. 1999;32(5):345-53.
- Pellissier F. *J. Chem. Ecology*. 1993;19(10):2105-14.
- Fraisse D, Carnat A, Lamaison J L. *Ann. Pharm. Fr*. 1996;54(6):280-3.
- Tian Y, Liimatainen J, Alanne A-L, Lindstedt A, Liu P, Sinkkonen J, et al. *Food Chem*. 2017;220:266-81.
- Taruscio TG, Barney DL, Exon J. *J. Agric. Food Chem*. 2004;52(10):3169-76.
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. *J. Agric. Food Chem*. 2004;52(14):4477-86.
- Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A. *Food Chem*. 2008;110(1):156-60.
- Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, Pirttilä AM, Tolonen A. *J. Agric. Food Chem*. 2009;57(20):9437-47.
- Martz F, Jaakola L, Julkunen-Tiitto R, Stark S. *J. Chemical Ecology*. 2010;36(9):1017-28.
- Bujor O-C, Le Bourvellec C, Volf I, Popa VI, Dufour C. *Food Chemistry*. 2016;213:58-68.
- Liu P, Lindstedt A, Markkinen N, Sinkkonen J, Suomela J-P, Yang B. *J. Agric. Food Chem*. 2014;62(49):12015-26.
- Ice CH, Wender SH. *J. Am. Chem. Soc*. 1953;75(1):50-2.
- Ieri F, Martini S, Innocenti M, Mulinacci N. *Phytochem. Anal*. 2013;24(5):467-75.



Визначення суми флавоноїдів

Спектрофотометрія після комплексоутворення **глікозидів флавоноїдів** з алюмінію хлоридом у спиртовому середовищі (метанол, етанол, водно-спритові суміші)

$$\lambda_{\max} = 410-415 \text{ нм}$$

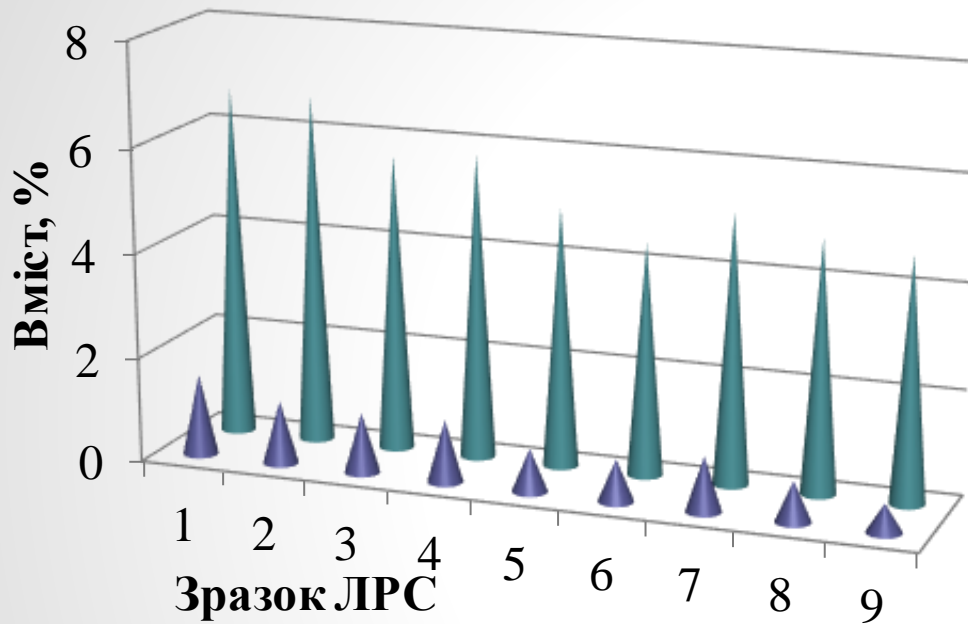
ВЕРХ агліконів

Спектрофотометрія після комплексоутворення **агліконів** з алюмінію хлоридом у етилацетатно-метанольному середовищі

$$\lambda_{\max} = 425 \text{ нм}$$



Результати визначення вмісту поліфенолів та флавоноїдів у чорниці пагонах



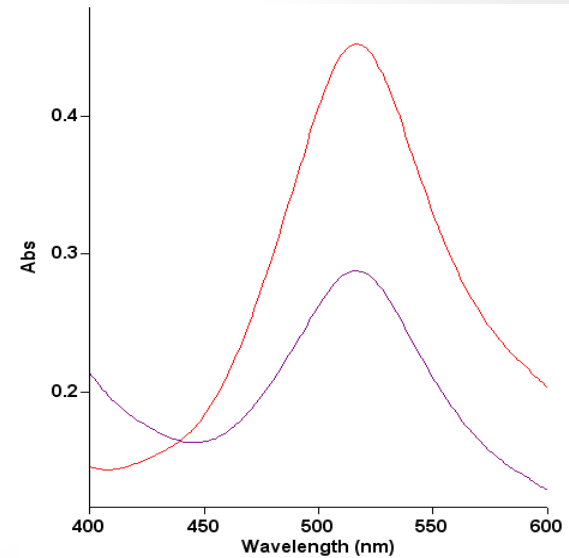
■ сума флавоноїдів
■ сума поліфенолів

Поліфеноли
 $r = 0.8840$

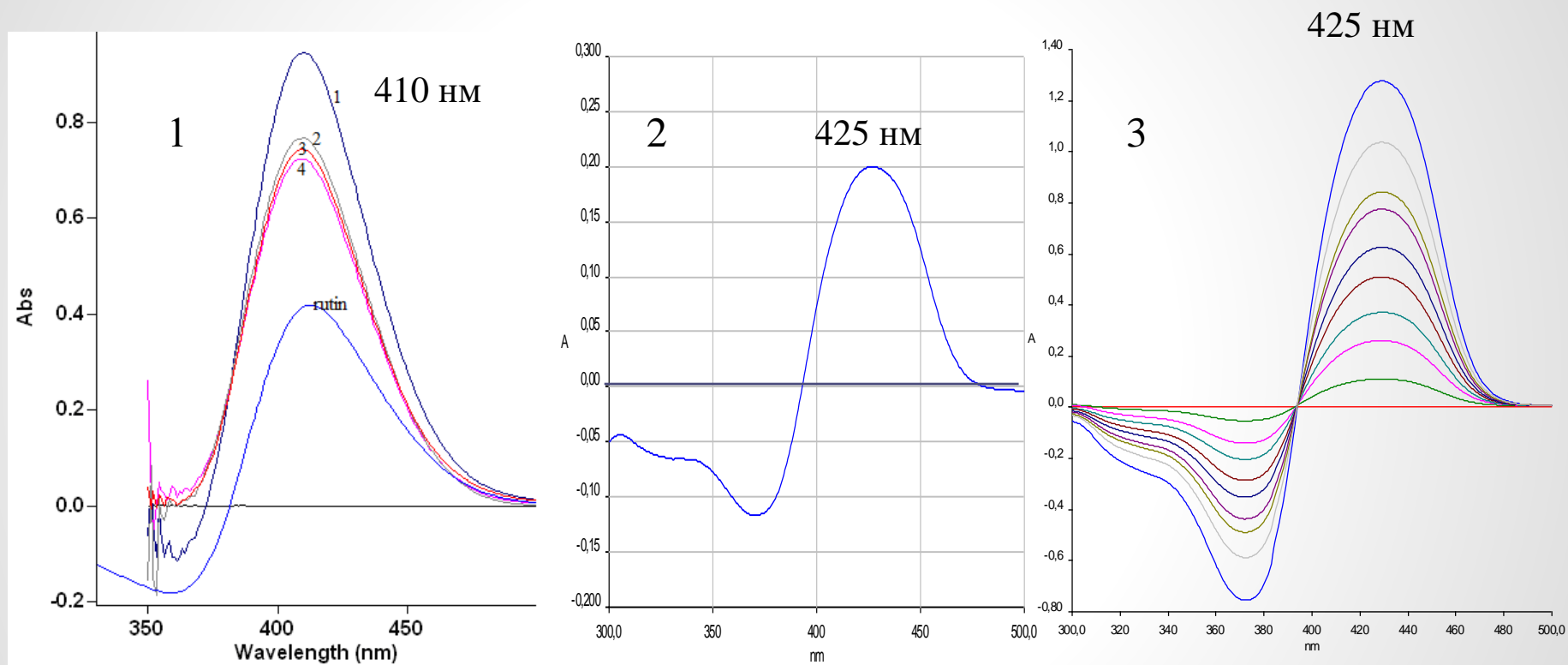
Флавоноїди
 $r = 0.8206$

Коефіцієнт кореляції (r)
відношень
АРА – сума БАР

Аналіз здатності
поглинання радикалів
ДФП



Спектрофотометричне визначення суми флавоноїдів як глікозидів (перерахунок на рутин) і як агліконів (перерахунок на гіперозид)



Електронні спектри поглинання, отримані при визначенні суми флавоноїдів в умовах вимірювання абсорбції комплексу алюмінію з: 1 – глікозидними формами флавоноїдів, 2 – агліконами флавоноїдів, 3 - кверцетином у діапазоні концентрацій 1,232-15,400 мкг/мл у вимірюваному розчині

Результати спектрофотометричного визначення вмісту флавоноїдів в ЛРС чорниці пагони

Регіон і рік заготівлі зразка / серія промислового зразка	Вміст флавоноїдів (у перерахунку на рутин), %	Вміст флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид), %
Тернопільська область, 2014 р.	1,20 ± 0,01	0,211 ± 0,006
Закарпатська область, 2015 р.	1,54 ± 0,02	0,274 ± 0,005
Івано-Франківська область, 2015 р.	1,18 ± 0,01	0,201 ± 0,006
зразок 1, Волинська область, 2015 р.	1,14 ± 0,01	0,204 ± 0,005
зразок 2, Волинська область, 2015 р.	1,65 ± 0,02	0,294 ± 0,007
зразок 1, Волинська область, 2016 р.	1,86 ± 0,02	0,339 ± 0,007
зразок 2, Волинська область, 2016 р.	1,75 ± 0,01	0,313 ± 0,006
Волинська область, 2017 р.	1,38 ± 0,01	0,247 ± 0,005
Волинська область, 2018 р.	1,44 ± 0,01	0,254 ± 0,004
серія 20811	0,80 ± 0,02	0,144 ± 0,004
серія 10412	1,04 ± 0,02	0,186 ± 0,005
серія 10113	0,82 ± 0,01	0,150 ± 0,005
серія 20513	0,77 ± 0,01	0,137 ± 0,004
серія 20614	0,54 ± 0,02	0,027 ± 0,001
серія 10116	0,85 ± 0,01	0,152 ± 0,004
серія 31016	0,71 ± 0,01	0,125 ± 0,003
серія 30818	0,82 ± 0,02	0,153 ± 0,005



Фотографії здрібненої сировини пагонів чорниці звичайної: 1 – зразок грубої фракції дикорослої сировини (Волинська обл., 2018 р.); 2 – зразок дрібної фракції дикорослої сировини (Волинська обл., 2018 р.); 3 – зразок грубої фракції сировини серії 31016.

Хроматографічне визначення агліконів флавоноїдів в ЛРС чорниці пагони

ВЕРХ-умови

Колонка: Kromasil 100 C18, 0.125 м x 4.6 мм 5 мкм (Supelco, USA)

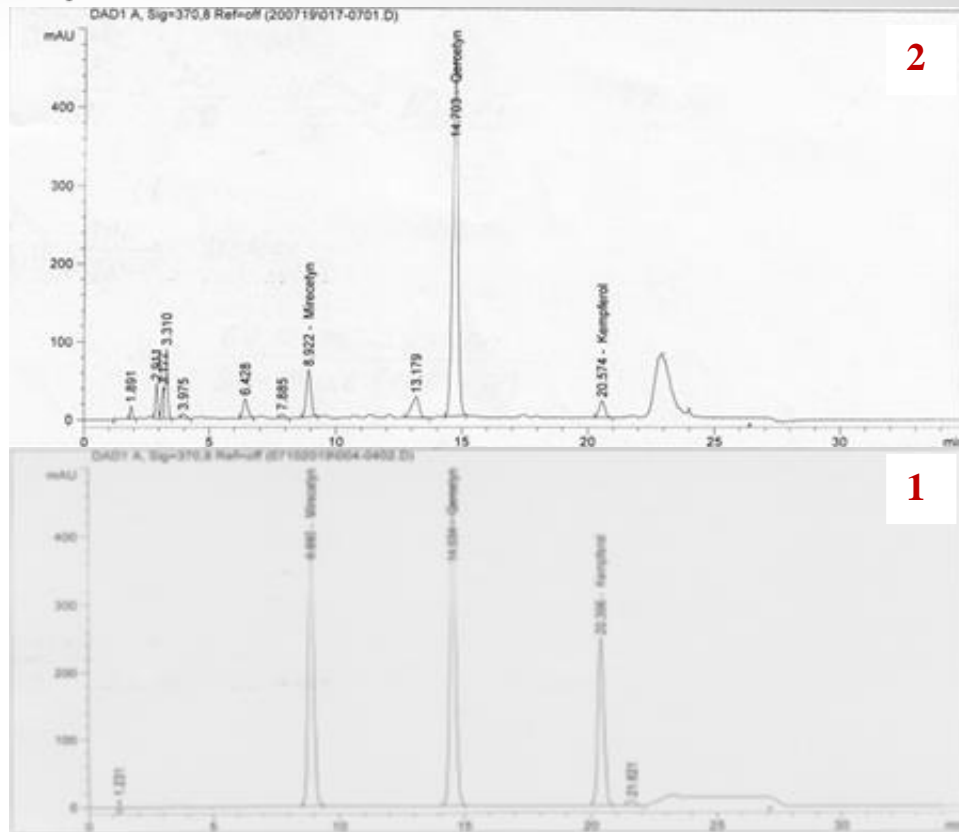
Рухома фаза А: - 0.3 г/л фосфорної кислоти розчин (рН 2.0).

Рухома фаза В: – метанол.

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв, градієнт фаза А: 0–1 хв: 60 % ; 1–20 хв: 60→45 %; 20–21 хв: 45→0 %; 21–25 хв: 0 %; 25–27 хв: 0→60 %; 27–35 хв: 60 %.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 370 нм.

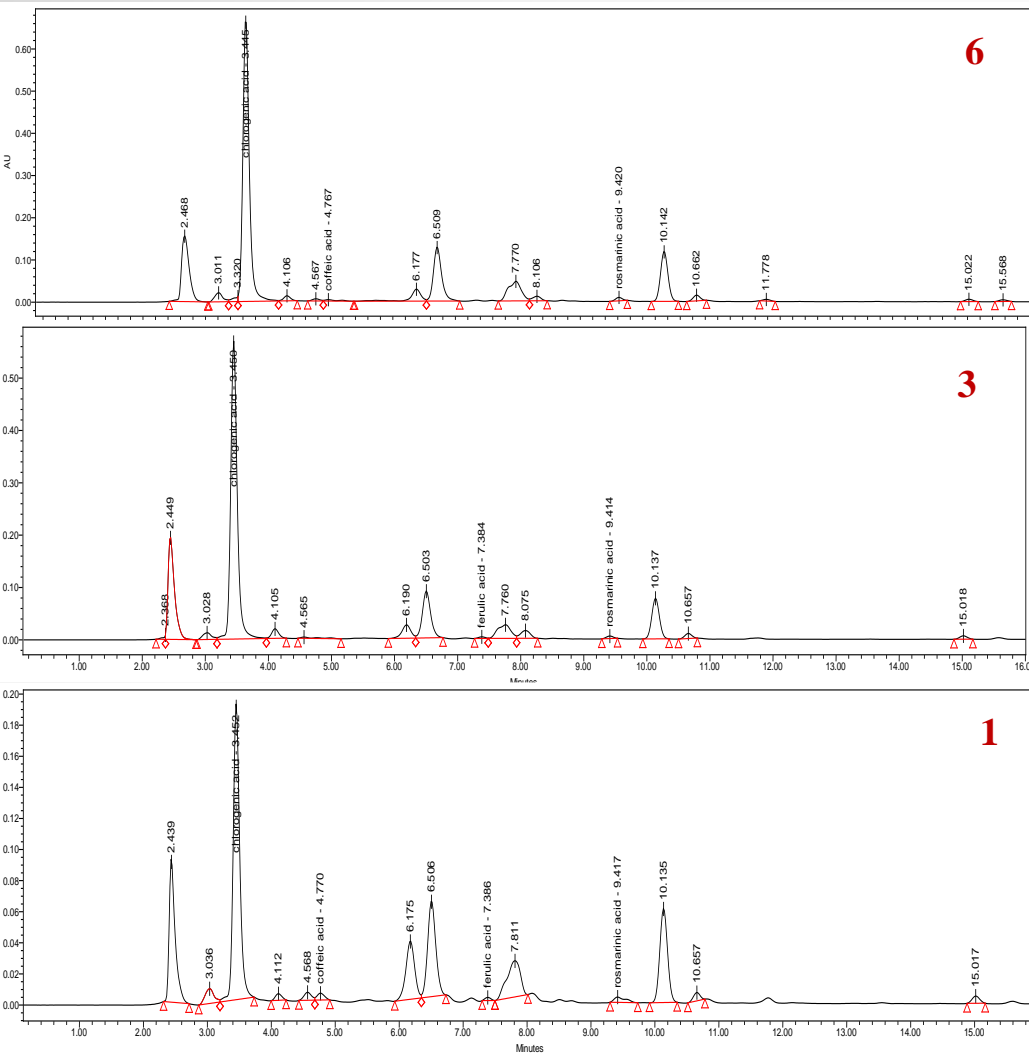
Інжекція: 20 мкл



Регіон і рік заготівлі зразка / серія промислового зразка	Сумарний вміст агліконів, %	Вміст агліконів (у перерахунку на гіперозид), %
зразок 1, Волинська область, 2016 р.	0,223 ± 0,003	0,342 ± 0,004
зразок 2, Волинська область, 2016 р	0,216 ± 0,002	0,325 ± 0,005
Волинська область, 2017 р.	0,163 ± 0,002	0,251 ± 0,004
Волинська область, 2018 р.	0,161 ± 0,003	0,247 ± 0,003
серія 30818	0,098 ± 0,002	0,149 ± 0,003

Хроматограми, отримані для розчину порівняння (1) і випробовуваного розчину чорниці пагонів (2) в умовах визначення агліконів флавоноїдів

ВЕРХ-дослідження гідроксикоричних кислот



ВЕРХ-умови

Колонка: XTerra C 18 (Waters),
октадецилсилікагель для хроматографії (5 мкм);
l = 250 мм, Ø 4,6 мм.

Рухома фаза А: фосфорна кислота –
ацетонітрил – вода (1:19:80)

Рухома фаза В: фосфорна кислота – метанол –
ацетонітрил (1:40:59)

Швидкість рухомої фази. 1.2 мл/хв, градієнт:
0-20 хв – фаза А: 100→55 % , 20-25 хв – фаза А:
55→0 % , 25-30 хв – фаза А: 0→100 % .

Детектування: спектрофотометрично за
довжини хвилі 330 нм.

Інжекція. 20 мкл

Типові хроматограми випробовуваних розчинів чорниці пагонів в умовах визначення гідроксикоричних кислот

Регіон і рік заготівлі зразка / серія промислового зразка	Сумарний вміст хлорогенової і кофеїнової кислот, %
серія 30818 (1)	0,546 ± 0,013
серія 31016 (2)	0,566 ± 0,012
Волинська область, 2018 р. (3)	1,991 ± 0,014
Закарпатська область, 2015 р. (4)	1,368 ± 0,013
Тернопільська область, 2014 р. (5)	1,434 ± 0,009
зразок 2, Волинська область, 2015 р. (6)	1,719 ± 0,011

Висновки

- ▶ Для об'єктивного контролю якості пагонів чорниці раціонально було б ввести додаткові кількісні показники якості, як альтернативні, – вміст флавоноїдів і вміст гідроксикоричних кислот
- ▶ Для визначення флавоноїдів необхідно використовувати спектрофотометричну методику із попереднім гідролізом, а перерахунок здійснювати на гіперозид
- ▶ Для визначення гідроксикоричних кислот застосувати ВЕРХ-методику і розраховувати вміст лише хлорогенової кислоти або рахувати суму гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову



Дякую за Вашу увагу!

**Ми не наважуємося зробити щось
не тому, що це складно;
навпаки все здається складним,
тому що ми не наважуємося це
зробити**

**СЕНЕКА Анней Луцій
давньоримський філософ, поет,
державний діяч і оратор**