

Совершенствование методов стандартизации лекарственных средств на основе чемерицы Лобеля корневищ с корнями

Н. П. Антонова, И. М. Моргунов, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер,
О. В. Евдокимова, А. В. Бекетова, М. Н. Лякина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Установление подлинности лекарственного растительного сырья чемерицы Лобеля (*Veratrum Lobelianum* Bernh.), а также фармацевтической субстанции и лекарственного препарата из этого сырья по одной и той же группе биологически активных веществ с помощью одного и того же метода анализа соответствует принципу «сквозной» стандартизации. **Цель работы:** разработка унифицированного способа идентификации стероидных алкалоидов в лекарственных средствах «Вода чемеричная», «Чемерицы настойка» и лекарственном растительном сырье чемерицы Лобеля корневища с корнями. **Материалы и методы:** образцы лекарственных средств «Чемерицы настойка» и «Чемеричная вода», лекарственного растительного сырья Чемерицы Лобеля корневища с корнями. Исследования проводились методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии с использованием пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). **Результаты:** разработана унифицированная методика установления подлинности лекарственных средств на основе чемерицы Лобеля корневищ с корнями (лекарственное растительное сырье, фармацевтическая субстанция и лекарственный препарат) методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии по стероидным алкалоидам. На основе проведенных исследований будет подготовлено изменение к ФС.2.5.0104.18 «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» по разделу «Подлинность», указанная методика предлагается для включения в проекты фармакопейных статей «Чемерицы Лобеля корневищ с корнями настойка» и «Чемерицы Лобеля корневищ с корнями настойка, раствор для наружного применения». **Выводы:** разработанная методика позволяет устанавливать подлинность в ряду от лекарственного растительного сырья до лекарственных средств на его основе по одной и той же группе биологически активных веществ. **Ключевые слова:** стероидные алкалоиды; ВЭТСХ; чемерицы Лобеля корневища с корнями; лекарственные средства; фармакопейные статьи

Для цитирования: Антонова НП, Моргунов ИМ, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Евдокимова ОВ, Бекетова АВ, Лякина МН. Совершенствование методов стандартизации лекарственных средств на основе чемерицы Лобеля корневищ с корнями. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(1):44–48. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-44-48>

* **Контактное лицо:** Лякина Марина Николаевна; Ljakina@expmed.ru

Improvement of Methods of Standardisation of Medicinal Products Made from *Veratrum Lobelianum* Rhizomes with Roots

N. P. Antonova, I. M. Morgunov, S. S. Prokhvatilova, E. P. Shefer,
O. V. Evdokimova, A. V. Beketova, M. N. Lyakina*

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. Identification of hellebore (*Veratrum Lobelianum* Bernh.) herbal substance, as well as hellebore-based herbal preparation and herbal medicinal product by the same group of biologically active substances using the same test method is in line with the so-called “consistent standardisation” principle. **The aim of the study** was to develop a harmonised approach to identification of steroidal alkaloids in hellebore products (hellebore water, hellebore tincture) and hellebore herbal substance (hellebore rhizomes with roots). **Materials and methods:** samples of hellebore water, hellebore tincture, and hellebore rhizomes with roots were analysed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) using an HPTLC plate. **Results:** the authors developed a harmonised identification procedure for products made from hellebore rhizomes with roots (herbal substance, herbal preparation, and herbal medicinal product) based on HPTLC detection of steroidal alkaloids. The results of the study will be used to prepare amendments to the Identification part of monograph FS.2.5.0104.18 “Hellebore rhizomes with roots”. The developed test procedure is proposed for inclusion into draft monographs “Hellebore rhizomes with roots, tincture” and “Hellebore rhizomes with roots, tincture, solution for external use”. **Conclusions:** the developed test procedure can be used as an identification test for a range of products from the hellebore herbal substance to hellebore-based herbal medicinal products, which is based on the detection of the same group of biologically active substances. **Key words:** steroidal alkaloids; HPTLC; hellebore rhizomes with roots; medicines; pharmacopoeial monographs

For citation: Antonova NP, Morgunov IM, Prokhvatilova SS, Shefer EP, Evdokimova OV, Beketova AV, Lyakina MN. Improvement of methods of standardisation of medicinal products made from *Veratrum lobelianum* rhizomes with roots. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(1):44–48. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-44-48>

* **Corresponding author:** Marina N. Lyakina; Ljakina@expmed.ru

Лекарственные препараты на основе чемерицы Лобеля (*Veratrum Lobelianum* Bernh., сем. лилейных — *Liliaceae*) корневищ с корнями относятся к противопаразитарным (противопедикулезным) средствам растительного происхождения. Фармацевтическая субстанция «Чемерицы настойка», а также лекарственный препарат на ее основе, известный под торговым названием «Чемеричная вода», разрешен к медицинскому применению и используется наружно для уничтожения эктопаразитов. Лекарственный препарат отечественных производителей включен в Государственный реестр лекарственных средств¹.

Все части лекарственного растения содержат алкалоиды, преимущественно стероидной структуры: корни — до 2,4%, корневища — до 1,3%. Из корневищ с корнями чемерицы Лобеля выделены иервератровые алкалоиды, большинство которых ядовито: иеврин, рубииерин, изорубииерин, термин, гермидин, герменин, вератрамин; цевератровые алкалоиды: протOVERATРИН, протOVERATРИНЫ А и В [1–3].

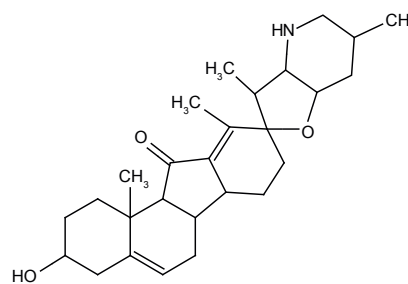
Алкалоиды чемерицы Лобеля обладают антипролиферативным и противовоспалительным действием, влияют на сердечно-сосудистую, нервную и желудочно-кишечную системы. Механизм токсического действия алкалоидов чемерицы связан с увеличением проницаемости натриевых каналов клеток, что оказывает возбуждающее действие, которое быстро сменяется функциональным истощением, брадикардией, гипотензией и апноэ. Механизм противопаразитарного действия обусловлен нейротоксическим действием алкалоидов чемерицы на половозрелые особи насекомых [4, 5].

В соответствии с принципом сквозной стандартизации установление подлинности лекарственного растительного сырья, фармацевтической субстанции и лекарственного препарата следует проводить по одной и той же группе или группам биологически активных веществ, предпочтительно с использованием одного и того же метода [6]. В раздел «Подлинность» фармакопейной статьи «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» включены гистохимическая реакция с серной кислотой концентрированной и хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ) для определения стероидных алкалоидов². ФС 42-2142-94 «Настойка чемерицы» и ФС 42-1588-97 «Вода чемеричная» предусматривают оценку подлинности только с помощью цветных химических реакций на алкалоиды, для чего проводят анализ с хлороформным извлечением из субстанции или лекарственного препарата концентрированными серной и хлористоводородной кислотами. Указанные реакции являются специфическими для обнаружения данной группы

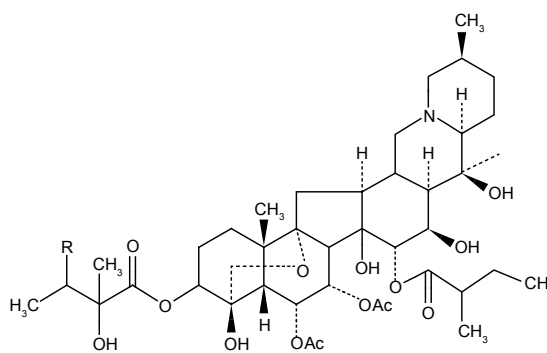
биологически активных веществ³. В литературе также приводится ТСХ-методика, позволяющая определять присутствие стероидных алкалоидов чемерицы в лекарственных средствах [1]. Значительная молекулярная масса и малая термическая стабильность алкалоидов чемерицы ограничивают использование для их идентификации других методов хроматографического анализа [2].

Учитывая вышесказанное, представляется целесообразным усовершенствовать методы стандартизации указанных лекарственных средств, в частности используемых для установления подлинности, и включить в фармакопейные стандарты на субстанцию и лекарственный препарат на основе чемерицы Лобеля корневищ с корнями унифицированную методику испытания с помощью метода высокоэффективной хроматографии в тонких слоях сорбента, характеризующуюся специфичностью и селективностью.

Цель работы — разработка методики идентификации стероидных алкалоидов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии в лекарственном препарате «Чемеричная вода» и субстанции «Настойка чемерицы» на основе возможной унификации методики, используемой для оценки качества лекарственного растительного сырья чемерицы Лобеля корневища с корнями в соответствии с принципом «сквозной стандартизации».



иервин



протOVERATРИН А: R = H;
протOVERATРИН В: R = OH

¹ <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>

² ФС.2.5.0104.18. Чемерицы Лобеля корневища с корнями. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. IV. М.: 2018.

³ Судебно-химическое определение вератрина в трупном материале. Информационное письмо Главного судмедэксперта МЗ СССР. М.: 1987.

Генри ТА. Химия растительных алкалоидов. М.: Госхимиздат; 1956.

ТСХ-методика, приведенная в разделе «Подлинность» ФС.2.5.0104.18 «Чемерицы Лобеля корневища с корнями», имеет ряд недостатков:

- отсутствует стадия очистки получаемого спиртового извлечения с помощью рекстракции или другим подходящим способом;

- локализацию зон адсорбции на хроматограмме проводят просматриванием в УФ-свете, что не является специфичным для данного класса биологически активных веществ.

Стероидные алкалоиды являются умеренно полярными соединениями, поэтому для их выделения следует использовать неполярные органические растворители: хлороформ или эфир с добавлением щелочи [1]. В связи с этим в ТСХ-методику определения подлинности лекарственного растительного сырья, фармацевтической субстанции и лекарственного препарата на основе чемерицы Лобеля⁴ нами было предложено добавить стадию предварительной очистки, осуществляемой экстракцией стероидных алкалоидов эфиром, содержащим аммиака раствор 25%.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лекарственный препарат «Чемеричная вода», ООО «Тулская фармацевтическая фабрика», серия 71018 (срок годности до 10.2020); фармацевтическая субстанция «Чемерицы настойка», ЗАО «Ярославская фармацевтическая фабрика», серия 300119 (срок годности до 02.2024); лекарственное растительное сырье «Чемерицы Лобеля корневища с корнями», производитель ООО «Хорст», серия 032020 (срок годности до 03.2022); лекарственное растительное сырье «Чемерицы Лобеля корневища с корнями («Антиалкогольный кукольник»)), производитель «Данила Травник», без серии (срок годности до 02.2022).

Для исследований использовали ВЭТСХ-пластинку (пластинка для высокоэффективной тонкослойной хроматографии) со слоем силикагеля: Merck NP TLC Silica Gel 60 NX85224933 1.05633.0001; УФ-кабинет для ТСХ с системой документирования данных SAMAG® TLC Visualizer 2.

Для детектирования алкалоидов был использован более специфический реактив — раствор Драгендорфа модифицированный⁵ с последующим просмотром зон адсорбции в УФ-кабинете и при дневном свете для ТСХ с системой документирования данных SAMAG® TLC Visualizer 2.

Методика анализа

Приготовление испытуемого раствора 1. Около 1,0 г чемерицы Лобеля корневища с корнями, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл,

прибавляют 10 мл спирта 96% и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. Раствор охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр «черная лента». Фильтрат помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25% и экстрагируют эфиром два раза по 15 мл. Эфирные извлечения объединяют и фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 100 мл через предварительно смоченный эфиром бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного. Фильтр промывают 10 мл эфира. Эфир отгоняют на ротаторном испарителе при температуре не выше 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 2,0 мл спирта 96%.

Приготовление испытуемого раствора 2. 25 мл «Чемерицы настойки» помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 25 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25% и экстрагируют эфиром два раза по 15 мл. Далее поступают аналогично приготовлению испытуемого раствора 1.

Приготовление испытуемого раствора 3. 25 мл «Чемеричной воды» помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 25 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25% и экстрагируют эфиром два раза по 15 мл. Далее поступают аналогично приготовлению испытуемого раствора 1.

На линию старта ВЭТСХ-пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 10 мкл испытуемого раствора 1 и испытуемого раствора 3, 5 мкл испытуемого раствора 2. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку просматривают при УФ-свете при длине волны 365 нм (рис. 1), затем обрабатывают реактивом Драгендорфа модифицированным и просматривают при дневном свете (рис. 2) в УФ-кабинете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты (рис. 1) свидетельствуют о схожести хроматографических профилей исследуемых образцов. На хроматограммах испытуемых растворов 1, 2 и 3, соответствующих фармацевтической субстанции, лекарственному препарату и лекарственному растительному сырью, в средней трети пластинки обнаруживаются три зоны адсорбции от оранжевого до красно-оранжевого цвета (стероидные алкалоиды) (рис. 2). На хроматограммах испытуемого раствора,

⁴ ФС.2.5.0104.18. Чемерицы Лобеля корневища с корнями. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. IV. М.; 2018.

⁵ ОФС.1.3.0001.15. Реактивы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

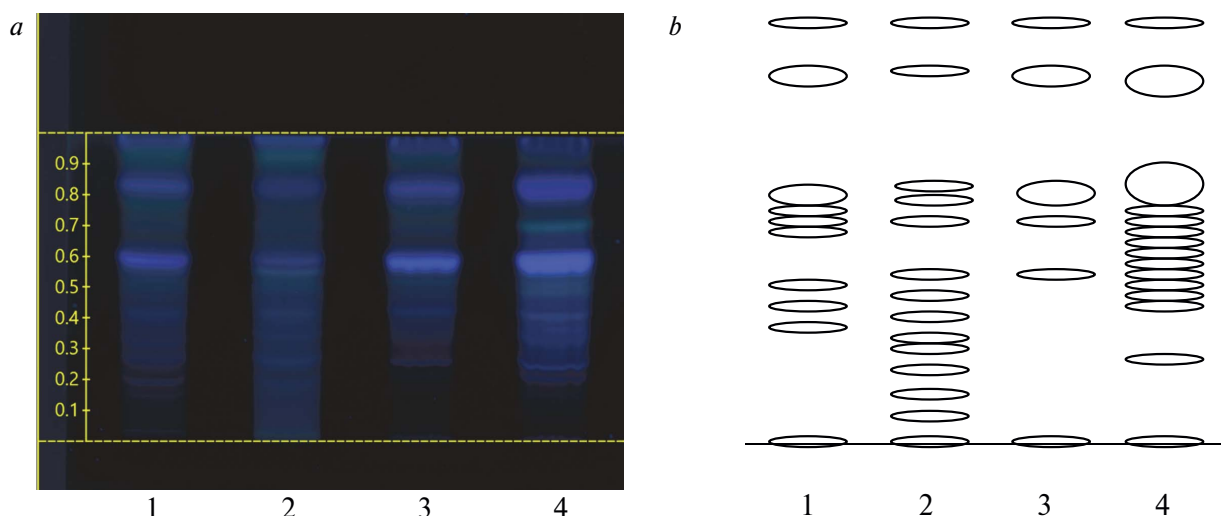


Рис. 1. Фотография (а) и схема (б) хроматограммы в УФ-свете: 1 — фармацевтическая субстанция «Чемерицы настойка»; 2 — лекарственный препарат «Чемеричная вода»; 3 — извлечение из лекарственного растительного сырья чемерицы Лобеля корневища с корнями (производитель ООО «Хорст»); 4 — извлечение из лекарственного растительного сырья Чемерицы Лобеля корневища с корнями (производитель «Данила Травник»)

Fig. 1. Photo (a) and scheme (b) of the chromatogram in UV light: 1—“Hellebore tincture” herbal substance; 2—“Hellebore water” herbal medicinal product; 3—extract of hellebore rhizomes with roots (herbal substance by Horst, OOO); 4—extract of hellebore rhizomes with roots (herbal substance by “Danila Travnik”)

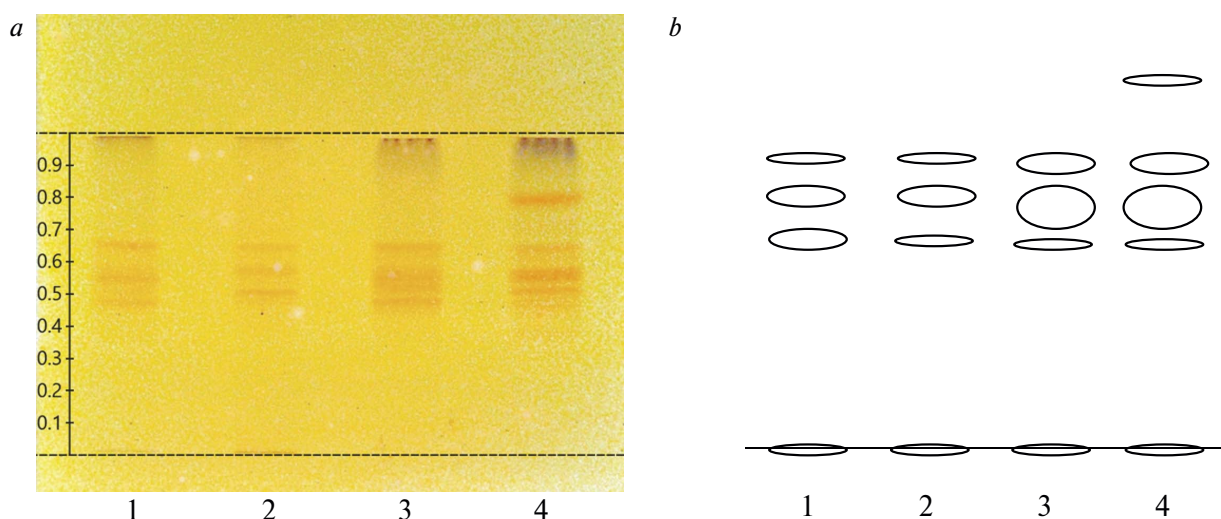


Рис. 2. Фотография (а) и схема (б) хроматограммы после обработки реактивом Драгендорфа модифицированным: 1 — фармацевтическая субстанция «Чемерицы настойка»; 2 — лекарственный препарат «Чемеричная вода»; 3 — извлечение из лекарственного растительного сырья Чемерицы Лобеля корневища с корнями (производитель ООО «Хорст»); 4 — извлечение из лекарственного растительного сырья Чемерицы Лобеля корневища с корнями (производитель «Данила Травник»)

Fig. 2. Photo (a) and scheme (b) of the chromatogram after treatment with modified Dragendorff's reagent: 1—“Hellebore tincture” herbal substance; 2—“Hellebore water” herbal medicinal product; 3—extract of hellebore rhizomes with roots (herbal substance by Horst, OOO); 4—extract of hellebore rhizomes with roots (herbal substance by “Danila Travnik”)

полученного из лекарственного растительного сырья, обнаруживаются большие по размеру и интенсивности окраски зоны адсорбции, чем на хроматограммах других образцов, а также отчетливо видны дополнительные одна или две зоны адсорбции красно-оранжевого цвета.

В соответствии с полученными результатами унифицированная нормативная часть для испытания лекарственного растительного

сырья, фармацевтической субстанции и лекарственного препарата методом ВЭТСХ может быть предложена в следующей редакции: «На хроматограмме испытуемого раствора в средней трети пластинки должны обнаруживаться не менее трех зон адсорбции от оранжевого до красно-оранжевого цвета (стероидные алкалоиды); допускается обнаружение других зон адсорбции». Указанная редакция нормативной части испытания должна

быть включена в соответствующие фармакопейные стандарты: фармакопейные статьи или их проекты на исследованные лекарственные средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена унифицированная методика установления подлинности лекарственных средств на основе чемерицы Лобеля корневищ с корнями (лекарственное растительное сырье, фармацевтическая субстанция и лекарственный препарат) методом ВЭТСХ по стероидным алкалоидам.

Вклад авторов. *Н. П. Антонова* — планирование эксперимента и подбор оптимальных условий хроматографирования; *И. М. Моргунов* — изучение хроматографического поведения биологически активных веществ объектов исследования в выбранных условиях и проведение экспериментальных исследований; *С. С. Прохвятилова* — обобщение результатов исследования и интерпретация результатов, формулировка выводов; *Е. П. Шефер* — обобщение результатов исследования и интерпретация результатов; *О. В. Евдокимова* — планирование эксперимента и постановка задач исследования; *А. В. Бекетова* — сбор и обобщение литературных данных, подготовка рабочей версии научной публикации; *М. Н. Лякина* — редактирование и переработка рукописи.

Authors' contributions. *Natalia P. Antonova*—planning of the experiment and selection of the optimal chromatographic conditions; *Igor M. Morgunov*—study of the chromatographic behavior of biologically active substances in the test samples under the selected conditions, conducting experimental studies; *Svetlana S. Prokhvatilova*—summarising and interpretation of the study results, formulation of conclusions; *Elena P. Shefer*—

На основе проведенных исследований подготовлены изменения для включения в раздел «Подлинность» ФС.2.5.0104.18 «Чемерицы Лобеля корневища с корнями (*Veratri Lobeliani rhizomata cum radicibus*)».

Разработанная методика предложена для включения в проекты фармакопейных статей «Чемерицы Лобеля корневищ с корнями настойка» и «Чемерицы Лобеля корневищ с корнями настойка, раствор для наружного применения» с целью последующего размещения в Государственной фармакопее Российской Федерации.

summarising and interpretation of the study results; *Olga V. Evdokimova*—planning of the experiment and setting the study objectives; *Anastasia V. Beketova*—collection and review of literature data, drafting the paper; *Marina N. Lyakina*—editing and revision of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Коломиец НЭ, Полуэктова ТВ, Малышев АЮ. Совершенствование характеристики подлинности корневищ с корнями чемерицы. *Фармация*. 2016;63(3):6–8. [Kolomiets NE, Poluektova TV, Malyshev AYU. Improvement of the characteristics of identity of hellebore (*Veratrum lobelianum* Bernh) rhizomes and roots. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2016;63(3):6–8. (In Russ.)]
2. Орлова ТН, Григорьев АМ, Крупина НА. Случай из практики. Отравление алкалоидами чемерицы (постер). *Судебная медицина*. 2016;2(2):119–20. [Orlova TN, Grigoriev AM, Krupina NA. A case from practice. Poisoning with false alkaloids (poster). *Sudebnaya meditsina = Russian Journal of Forensic Medicine*. 2016;2(2):119–20. (In Russ.)]
3. Shakirov R. New C-nor, D-homosteroid alkaloid germinine from *Veratrum lobelianum*. *Chem Nat Compd*. 1997;33(4):479–80. <https://doi.org/10.1007/BF02282370>
4. Мишина ТП, Лукьянова ИЮ, Бидерман ФМ, Афанасьева ИВ. Отравление чемерицей. *Скорая медицинская помощь*. 2013;14(3):48–51. [Mishina TP, Lukyanova IYu, Biederman FM, Afanaseva IV. Poisoning hellebore. *Skoraya meditsinskaya pomoshch = Emergency Medical Care*. 2013;14(3):48–51. (In Russ.)]
5. Christov V, Mikhova B, Ivanova A, Serly J, Molnar J, Selenge D, et al. Steroidal alkaloids of *Veratrum lobelianum* Bernh. and *Veratrum nigrum* L. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2010;65(3–4):195–200. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-405>
6. Самылина ИА. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств. В кн.: *Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты. Материалы I Международного научного конгресса*. М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ; 1994. С. 254. [Samylina IA. Problems of standardization of medicinal plants and herbal medicines. In: *Traditional medicine and nutrition: theoretical and practical aspects. Materials of the 1st International Scientific Congress*. Moscow: Institut traditsionnykh metodov lecheniya MZ RF; 1994. P. 254. (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Антонова Наталья Петровна, канд. биол. наук. *Natalia P. Antonova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

Моргунов Игорь Михайлович. *Igor M. Morgunov*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3907-3456>

Прохвятилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук. *Svetlana S. Prokhvatilova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук. *Elena P. Shefer*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

Евдокимова Ольга Владимировна, д-р фарм. наук, доцент. *Olga V. Evdokimova*, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2191-1033>

Бекетова Анастасия Викторовна, канд. фарм. наук. *Anastasia V. Beketova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6975-516X>

Лякина Марина Николаевна, д-р фарм. наук, старший научный сотрудник. *Marina N. Lyakina*, Dr. Sci. (Pharm.), Senior Researcher. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8220-1054>

Статья поступила 14.07.2020

После доработки 15.01.2021

Принята к печати 20.02.2021

Article was received 14 July 2020

Revised 15 January 2021

Accepted for publication 20 February 2021