

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ

О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ

(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Дослідження методом газової хроматографії
трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт
у складі субстанції»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи Ф1А
напряму підготовки (спеціальності)

226 «Фармація, промислова фармація»

(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання

Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»

«Фармація»

(назва освітньої програми)

Мотруніч Валерія Олександрівна

(прізвище та ініціали)

Керівник: **к.б.н Мелешко Р.А.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: **проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2025-2026 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ, ВЛАСТИВОСТІ САЛІЦИЛАТІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови	10
1.2. Біологічна активність	16
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ САЛІЦИЛАТІВ.....	20
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	20
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
 ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
SUMMARY	40
ДОДАТОК 1.....	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

°C – градуси Цельсія

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

MOR – μ -opioid receptor

ВСТУП

Актуальність теми. Склад, у якому одночасно міститься ментол, метилсаліцилат та бензиловий спирт, характерний для місцевих знеболювальних та протизапальних засобів (мазей, гелів або розчинів).

Метилсаліцилат: чинить виражену протизапальну та анальгезуючу дію, пригнічуючи синтез простагландинів.

Ментол: подразнює холодкові рецептори шкіри, викликаючи відчуття прохолоди. Це відволікає від болю та покращує місцевий кровообіг.

Бензиловий спирт: у сумішах часто виступає як антисептик, розчинник або допоміжний консервант, має легкий місцевоанестезуючий ефект.

Така комбінація найчастіше зустрічається у складі лікарських засобів для лікування болю в м'язах, суглобах, при розтягненнях та запальних процесах м'яких тканин. Наприклад, засіб - спиртовий розчин Меновазин (класичний склад включає ментол, бензокаїн та прокаїн), різні спортивні розтирання.

Особливості фармацевтичного аналізу трьох компонентів:

Аналіз *метилсаліцилату* проводиться згідно з офіційними фармакопейними монографіями, які встановлюють стандарти його якості та методи контролю:

- Європейська фармакопея (Ph. Eur.): Основна монографія "Methylis salicylas" (номер 0230). Стандарти цієї фармакопеї є юридично обов'язковими у 39 європейських країнах.

- Державна фармакопея України (ДФУ): використовується монографія «Метилсаліцилат», яка гармонізована з Європейською фармакопеею.

- Фармакопея США (USP) та Британська фармакопея (BP): містять відповідні статті «Methyl Salicylate».

Основні методи аналізу згідно з монографією:

1. Ідентифікація:

1. Реакція з розчином хлориду заліза (III) – фіолетове забарвлення.

2. Реакція гідролізу з розчином гідроксиду натрію: при нагріванні утворюється кристалічний осад саліцилової кислоти, після фільтрації та сушіння повинен мати температуру плавлення від 156 °C до 161 °C.

2. Кількісне визначення: Метод зворотного титрування: навішування сапоніфікують надлишком розчину гідроксиду натрію, надлишок лугу титрують сірчаною або соляною кислотою.

2. Вміст речовини від 99,0 % до 100,5 %.

2. Показники чистоти: Відносна густина: 1,180–1,186. Показник заломлення: 1535-1538. Кислотність: контроль вмісту вільної саліцилової кислоти

Аналіз *ментолу* проводитиметься згідно з офіційними фармакопейними монографіями, які зазвичай поділяються на два види залежно від форми речовини: *рацемічний ментол та лівоментол*.

Державна фармакопея України (ДФУ): монографії «Ментол рацемічний» та «Лівоментол», які містяться у 2-му томі ДФУ 2.0 та гармонізовані з Європейською фармакопеєю.

Європейська фармакопея (Ph. Eur.): Монографії «Mentholum racemicum» (0619) та «Levomentholum» (0623).

Фармакопея США (USP): Монографія «Menthol», яка охоплює натуральний і синтетичний продукт.

Основні методи аналізу:

1. Ідентифікація:

Визначення питомого оптичного обертання - дозволяє відрізнити левоментол від рацемічного.

Визначення температури плавлення: для левоментолу 41–44 °С.

ІЧ-спектроскопія (порівняння зі стандартним зразком ментолу CRS).

2. Випробування на чистоту:

Контроль супутніх домішок (цинеол, ментон, пулегон) методом газової хроматографії (ГХ).

Відсутність або обмеження нелеткого залишку.

3. Кількісне визначення: проводиться методом газової хроматографії з використанням внутрішнього стандарту, від 98,0 % до 102,0 %

Аналіз *бензилового спирту* проводиться відповідно до наступних основних фармакопейних монографій:

- Європейська фармакопея (Ph. Eur.): Основна монографія Alcohol benzylicus (номер 0256).
- Державна фармакопея України (ДФУ): монографія «Спирт бензиловий», повністю гармонізована з вимогами Європейської фармакопеї.
- Фармакопея США (USP-NF): Монографія Benzyl Alcohol.

Основні методи аналізу згідно з монографією 0256:

1. Ідентифікація:

ІЧ-спектрофотометрія: Спектр поглинання субстанції повинен відповідати спектру стандартного зразка (CRS).

Фізичні показники: Перевірка відносної густини (1,043–1,049), показника заломлення (1,538–1,541).

2. Випробування на чистоту: Прозорість та кольоровість розчину: Перевірка розчинності 2 мл спирту в 60 мл води (розчин має бути прозорим та безбарвним).

Кислотність: Титрування розчином гідроксиду натрію у присутності фенолфталеїну.

Перекисне число: Не більше ніж 5.

3. Супутні домішки (бензальдегід, циклогексилметанол та ін.): методом газової хроматографії (ГХ). Для парентеральних лікарських форм встановлені суворіші ліміти за вмістом домішок.

4. Кількісне визначення: Основним методом є газова хроматографія із застосуванням внутрішнього стандарту. Вміст діючої речовини (фенілметанолу) від 98,0 до 100,5%.

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу Газової хроматографії для ідентифікації та кількісного визначення складових трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції, а також визначення її чистоти.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є адаптування хроматографічних умов методом ГХ для виконання хроматографічного дослідження трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати методом ГХ складові трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції;
- визначити чистоту складових трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт в досліджуваній субстанції хроматографічним методом ГХ (присутність супровідних речовин);
- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекули речовин від хімічної деградації.

Методи дослідження. Газова хроматографія. Хроматограф Agilent 6890A з полум'я-іонізаційним детектором (FID), колонка – DB-1701 ((14%-ціанопропіл-феніл)-метилполісілоксан), 30 м × 530 мкм × 1 мкм; колонка підключена до заднього полум'я-іонізаційного детектора (FID). Комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у осучасненні фармацевтичного аналізу складових трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції та визначення її чистоти та кількісного вмісту.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 28.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ САЛІЦИЛАТІВ

1.1. Особливості хімічної будови

Саліцилати всмоктуються шляхом пасивної дифузії через шлункову оболонку, у верхніх відділах тонкої кишки. На всмоктування впливає рН. Сироваткові саліцилати виявляються протягом 5–30 хвилин після перорального застосування лікарських форм (водних розчинів та таблеток без покриття). Після досягнення піку терапевтичної дози концентрація в сироватці крові досягається протягом 1 години, протягом 4–6 годин для препаратів з кишковорозчинною оболонкою.

При передозуванні пікова концентрація в сироватці крові може бути затримана через уповільнене спорожнення шлунка внаслідок пілороспазму. Повідомлялося про пікові концентрації в сироватці крові. Вони виникають через 24 години після прийому ацетилсаліцилової кислоти.

Місцеве застосування саліцилової кислоти або метилсаліцилату може призвести до системної токсичності, при використанні у немовлят або де порушена цілісність шкіри. Ректальне всмоктування повільне.

Об'єм розподілу саліцилату при терапевтичних рівнях становить приблизно 0,2 л/кг. 90% зв'язується з білками. При передозуванні об'єм розподілу збільшується до 0,5 л/кг. Зв'язування з білками зменшується до менш ніж 75% через насичення місць зв'язування.

рКа саліцилової кислоти становить 3. За нормальних фізіологічних кислоотно-лужних умов саліцилати повільно перетинають гематоенцефалічний бар'єр. Системний ацидоз призводить до посиленого утворення неіонізованого саліцилату, легше розподіляється в тканинах,

особливо в центральній нервовій системі.

Саліцилати метаболізуються в печінці мікросомальною ферментною системою, переважно кон'югуються з гліцином з утворенням саліцилурової кислоти. Саліцилати кон'югуються з глюкуроною кислотою з утворенням саліцилфенольного глюкуроніду та саліцилацилглюкуроніду. Невелика кількість саліцилатів гідролізується з утворенням гентизинової кислоти - активного метаболіту та потужного інгібітора синтезу простагландинів.

Саліцилат та його метаболіти швидко виводяться з сечею шляхом клубочкової фільтрації та ниркової канальцевої секреції. Пасивна реабсорбція саліцилату відбувається в дистальних канальцях. Ступінь її виведення залежить від рН сечі.

Саліцилат та метаболіти виводяться нирками: 10% у вигляді саліцилової кислоти, 75% саліцилурової кислоти, 10% фенольного глюкуроніду, 5% ацилглюкуроніду. Виведення саліцилату є насичуваним, характеризується кінетикою Міхаеліса-Ментена. Період напіввиведення залежить від дози.

Період напіввиведення ацетилсаліцилової кислоти з сироватки крові становить лише 15 хвилин. Вона швидко метаболізується до саліцилату. Період напіввиведення саліцилату становить приблизно 6 годин.

Зі зростанням рівня саліцилату кінетика змінюється від першого порядку виведення до нульового порядку. Період напіввиведення 20 годин або більше [1-5].

Саліцилова кислота (СК або 2-гідроксибензойна кислота) виробляється прокаріотичними та еукаріотичними організмами - рослинами. Рослини синтезують СК двома шляхами: з циннамата, виробляється фенілаланінаміакліазою (PAL), та з ізохоризмату (IC), виробляється ІСсинтазою (IC). У рослин СК є гормоном з регуляторними функціями.

У термогенних рослин СК запускає вироблення тепла. Активує альтернативне дихання для випаровування сполук з гнильним запахом, що приваблює комах-запилювачів. Вивчена роль СК полягає в тому, що вона є

захисним гормоном в імунних реакціях рослин.

СК може активувати захисні реакції у рослин. Це характеризуються індукованою продукцією білків, пов'язаних з патогенезом рослин (PR). У стійких рослин патогенна інфекція викликає накопичення СК в інфікованих частинах, у верхніх неінфікованих листках. Це призводить до формування системної набутої стійкості (СНР).

Блокування накопичення або передачі сигналів СК може зробити рослини надмірно сприйнятливими до патогенної інфекції. Вони стають нездатними встановити специфічний рецептор для реагування на стрес (SAR). СК відіграє регуляторну роль у реакціях рослин на різноманітні абіотичні стреси - спека, посуха, засолення та висока освітленість.

СК-опосередковані захисні та стресові реакції є багаторівневими, включаючи активацію механізмів захисту та толерантності, модуляцію росту рослин через перехресні зв'язки з іншими рослинними гормонами - ауксин. СК також регулює ріст рослин [6-12].

СК має лікувальні ефекти. Рослини, багаті на СК, використовувалися людьми для полегшення лихоманки та болю. Аспірин або ацетил СК – це синтетична похідна СК, зберігає лікувальні властивості СК зі зменшеним подразненням шлунка. Аспірин був одним з найбільш широко використовуваних препаратів у світі. Окрім лікувального впливу на зниження температури, біль та запалення, виявлено, що аспірин знижує ризик інсульту, серцевого нападу та деяких видів раку [13-16].

Аспірин швидко метаболізується в організмі людини до СК [17]. Багато протизапальних, кардіопротекторних та протипухлинних властивостей аспірину пояснюються СК [14-18].

СК має велику кількість молекулярних мішеней, які опосередковують його дію в спектрі біологічних процесів. У рослин білки (NPR) функціонують як рецептори СК та опосередковують СК-опосередковану експресію генів захисту та імунітет. Були ідентифіковані інші СК-зв'язуючі білки, які

опосередковують інші NPR-незалежні дії СК у рослин.

У людини простагландин H синтази (циклооксигенази COX1 та COX2) є ключовими ферментами. Вони каталізують перетворення арахідонової кислоти на простагландини, що викликають лихоманку, біль та запалення.

Аспірин ацетилює та незворотно пригнічує COX1 та COX2. Цей механізм дії аспірину довгий час вважався основою його протизапальної активності. Аспірин швидко перетворюється на SA в організмі людини. SA не ацетилює білки COX, але має багато подібних фармакологічних ефектів, як аспірин.

Результати свідчать про те, що існують додаткові мішені SA у людей, що було підтверджено різноманітними дослідженнями. Обговорюються основні мішені та дії SA у рослин та людини, щоб виділити спільні або подібні дії SA - гормону у рослин порівняно з терапевтичним засобом у людей. Порівняльний та перехресний аналіз мішеней та дії SA у рослин та людей може виявити нові дії SA та краще зрозуміти їх основні механізми.

Першим білком, що зв'язує СК (SABP1), виділеним у рослин, була каталаза з тютюну. SABP1 зв'язується з тими біологічно активними аналогами СК, здатними активувати захисні реакції рослин. Аналоги СК, які не здатні активувати захисні реакції рослин, не зв'язуються з каталазами тютюну.

СК може зв'язуватися з рослинними каталазами, зв'язують СК. Вони можуть пригнічувати їх активність, підвищуючи рівень H₂O₂ у клітинах.

У опублікованому дослідженні надали докази того, що каталаза 2 *Arabidopsis* (CAT2) функціонує як рецептор СК у опосередкованому СК інгібуванні біосинтезу ауксину і жасмонової кислоти (JA). У рослин дикого типу активність каталази пригнічується. Накопичення H₂O₂ збільшується після інфікування патогеном. У мутанта *sid2* з дефіцитом SA спостерігається незначне індукване патогеном пригнічення каталази або накопичення H₂O₂. Мутація *cat2* може відновити фенотипи підвищеної сприйнятливості до захворювань, погіршити пригнічення біосинтезу ауксину та JA мутанта *sid2*.

Пригнічення активності CAT2 є ключовим механізмом індукції стійкості

до хвороб за допомогою SA.

Збільшення H_2O_2 внаслідок пригнічення CAT2 SA зменшує вироблення ауксину під час SA-опосередкованої стійкості до біотрофних патогенів. Це відбувається шляхом збільшення сульфенілювання ферменту біосинтезу IAA в субодиниці 1 (TSB1) та пригнічує його активність.

Активний CAT2 фізично взаємодіє з ферментами біосинтезу JA ацил-СоА-оксидазами 2 та 3 (ACX2/3). Це стимулює їхню активність шляхом активного видалення H_2O_2 , що утворюється в результаті ACX2-/3-кальцизованої реакції. Зв'язування CAT2 з SA пригнічує його активність і, пригнічує активність CAT2 щодо стимуляції ACX2/3 та сприяння біосинтезу JA.

СК може інгібувати каталази, пероксидази, діючи як електронодонорний субстрат та віддає один електрон каталазам. Діючи як електронодонорний субстрат для каталаз та пероксидаз СК перетворюється на СК-радикали ($SK\cdot$).

Підвищені рівні H_2O_2 в результаті інгібування каталази беруть участь в захисних реакціях, у рості рослин - індуковане СК формування додаткових коренів у проростках машу.

Генерація СК-радикалів, опосередкована пероксидазою, може призвести до утворення інших сполук - супероксид ($O_2^{\cdot-}$). Може сприяти активації СК-опосередкованих захисних реакцій.

СК запускає дві фази оксидативного вибуху. Апопластичні пероксидази клітинної стінки беруть участь у ранній фазі, NADPH-оксидази відповідають за пізню. Пероксидази клітинної стінки опосередковують утворення супероксиду, індуковане сульфаніламідом (SA).

Критична роль апопластичних пероксидаз у сульфаніламід-опосередкованому захисті від бактеріального патогену *Pseudomonas syringae* була встановлена за допомогою генетичного аналізу *Arabidopsis*.

Як каталази, так і пероксидази є залізовмісними ферментами, було висловлено припущення, що АК інгібує залізовмісні ферменти шляхом

хелатування заліза. Кілька доказів спростовують цю гіпотезу.

Механістичний та кінетичний аналіз каталаз та пероксидаз встановив, що АК інгібує ці ферменти, діючи як донор електронів, який утримує ферменти в неактивному окисно-відновному стані і не хелатує гемове залізо ферментів. Ряд структурних аналогів АК мають подібні константи зв'язування для заліза, значно відрізняються своєю здатністю зв'язуватися з каталазами та інгібувати їх. Каталази з різних рослин, різні каталази з одних і тих самих рослин суттєво відрізняються зв'язуванням та чутливістю до АК.

Окрім рослинних каталаз та пероксидаз, існують залізовмісні ферменти з інших організмів, чутливі до залізовмісної кислоти або аналогів залізовмісної кислоти. До них належить гемовий фермент мієлопероксидаза в людських нейтрофілах. Він виробляє потужний окислювач гіпохлорну кислоту (HOCl) з H_2O_2 та Cl^- запальними клітинами.

Різнманітні протизапальні препарати - залізовмісну кислоту, є ефективними інгібіторами мієлопероксидази. Простагландин Н синтаза людини - основна мішень аспірину, є біфункціональним ферментом. Вона містить циклооксигеназну і пероксидазну активність.

Циклооксигеназна активність простагландин Н синтази перетворює арахідонову кислоту на простагландин G_2 . Він потім відновлюється до відповідного спирту, простагландину H_2 , пероксидазною активністю простагландин Н синтази. Подібно до каталаз та пероксидаз, простагландин Н синтаза є залізовмісним гемовим ферментом.

Аспірин ацетилує залишок серину в циклооксигеназному сайті простагландин Н синтази. Пероксидаза простагландин Н синтази може впливати на ацетилювання простагландин Н синтази аспірином. Ацетилювання простагландин Н синтази аспірином відбувається, коли простетична група гему зв'язана з простагландин Н синтазою [18-24].

1.2. Біологічна активність

АК є інгібітором очищеної простагландин Н синтази *in vitro*. *In vivo* АК інгібує простагландин Н синтазу з IC₅₀ близько 30 мкМ, коли субстрат ферменту - арахідонова кислота відсутній або у низьких концентраціях вказує на те, що АК діє як конкурентний інгібітор простагландин Н синтази.

Оксигенація арахідонової кислоти циклооксигеназною активністю простагландин Н синтази вимагає утворення тирозильного радикала з активним центром. Активація залишку тирозину активного центру до радикального стану, ініціюється пероксидазним центром за участю гідропероксиду та простетичної групи гему.

Інгібуюча дія АК на простагландин Н синтазу залежить від пероксидазної активності простагландин Н синтази шляхом перешкоджання активації залишку тирозину активного центру. Він залежить від переносу електронів між активними центрами циклооксигенази та пероксидази

Результати ілюструють складні закономірності взаємодії СК з каталазами/пероксидазами. На них впливає їх окисно-відновний стан та інші умови - рівні субстратів та гідропероксидів *in vivo*.

Індукований АК імунітет рослин включає масове перепрограмування генів рослин, активацію генів захисту рослин. АК-рецептор NPR1 необхідний для експресії АК-індукованих генів захисту.

За відсутності АК, NPR1 присутній у цитозолі як олігомер. Після обробки АК клітинна відповідь на індуковані АФК викликає окисно-відновні зміни. Це призводить до відновлення дисульфідних зв'язків та мономеризації NPR1. Він може транслокуватися в ядро для активації транскрипції генів захисту.

NPR1 містить N-кінцевий домен BTB/POZ, домен з анкіриновими повторами посередині та C-кінцевий невідпорядкований домен. NPR1 зв'язується АК через C-кінцевий домен. АК-зв'язуюча активність необхідна для активації АК-чутливих генів захисту за допомогою NPR1.

NPR1 не має ДНК-зв'язуючої активності та функціонує як коактиватор транскрипції. Він зв'язується з родиною ДНК-зв'язуючих транскрипційних факторів TGA через домен анкіринових повторів. Зв'язування SA NPR1 індукує згортання та докінг С-кінцевого SA-зв'язуючого домену з анкіриновими повторами [24-26].

NPR3 та NPR4 мають подібну структуру домену, як NPR1. Вони функціонують як негативні регулятори імунітету, діючи як транскрипційні репресори генів захисту та реагують на SA. NPR3 зв'язується з SA з подібною спорідненістю, як NPR1. NPR4 зв'язується з SA з набагато сильнішою спорідненістю, ніж NPR1. За нормальних умов росту NPR3 та NPR4 пригнічують активацію генів захисту. Після інфікування патогеном підвищене зв'язування SA пригнічує транскрипційну репресорну активність NPR3 та NPR4. Це дозволяє вивільнити репресію генів-мішеней, що реагують на SA. Для жорсткої регуляції захисних реакцій, індукованих SA, на різних рівнях SA необхідна присутність двох типів рецепторів SA (рис. 1.2.1).

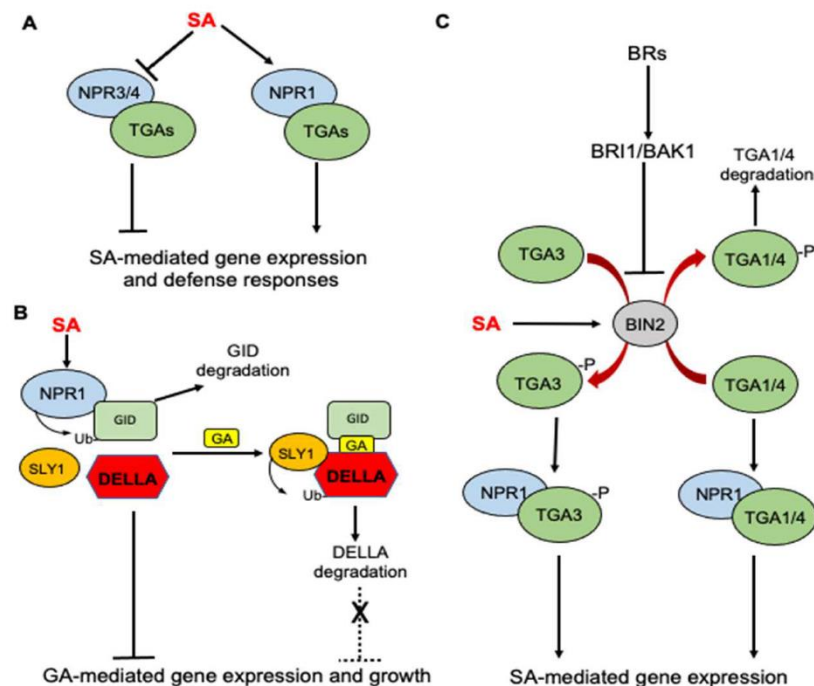


Рисунок 1.2.1. Роль рецепторів NPR у захисних реакціях та перехресні зв'язки SA з GA та BR у *Arabidopsis*. Зв'язування SA активує NPR1 - коактиватор SA з GA та BR у *Arabidopsis*.

транскрипції факторів транскрипції TGA для експресії генів, Рецептор SA NPR1 взаємодіє з рецептором GA GID1, сприяючи його деградації.

Перехресний зв'язок між АК та рослинними гормонами для кооперативної регуляції захисту рослин та балансу між захистом і ростом.

Кілька досліджень показали, що рецептор АК NPR1 та його транскрипційні фактори TGA беруть участь у перехресному зв'язку АК з рослинними гормонами - гібереліни (ГА), брасиностероїди (БР).

ГА сприяють росту рослин. АК пригнічує експресію генів, опосередковану ГА, для пригнічення росту рослин. Сигналізація ГА починається зі зв'язування ГА з розчинним рецептором GID1. Він взаємодіє з білками-репресорами ДЕЛЛА ГА-залежним чином, спрямована на деградацію білка ДЕЛЛА через убіквітинлігазу E3 SLY1. Дослідження виявило, що рецептор АК NPR1 взаємодіє з рецептором ГА GID1, функціонує як адаптер убіквітинлігази E3 для сприяння деградації GID1. Він підвищує стабільність ДЕЛЛА для пригнічення сигналізації ГА та росту рослин.

Сигналізація BR ініціюється зв'язуванням BR рецептором BR-INSENSITIVE-1 (BRI1) на плазматичній мембрані, гомологами BRI1-LIKE-1 (BRL1) та BRL3. Зв'язування індукує взаємодію з BRI1-ASSOCIATED-KINASE-1 (BAK1). Це призводить до трансфосфорилювання їх кіназних доменів.

Активация рецепторних комплексів активує сигнальний каскад. Він пригнічує кіназу BIN2, подібну до глікогенсинтази кінази 3 (GSK3). BIN2 є негативним регулятором сигналізації BR. Він пригнічує накопичення

транскрипційних факторів (BZR1) та (BES1) у ядрі. Вони контролюють експресію генів, регульованих BR. Роль BR у захисті рослин та стресових реакціях є складною. Мутанти з дефіцитом BR нечутливі до нього є більш стійкими до стресу рослин, ніж рослини дикого типу. Це вказує на негативну роль BR у стресових реакціях рослин. Низка досліджень показала, що екзогенне застосування BR сприяє стресостійкості та стійкості рослин до хвороб.

Молекулярні основи протилежного впливу ендогенних та екзогенних BR на стресові реакції рослин були досліджені. Вони вказують на роль рецептора NPR1 та транскрипційних факторів TGA. Повідомлено про негативний регулятор сигналізації BR BIN2 та позитивну роль у сигналізації SA та імунитеті на основі своїх мутантних фенотипів. SA стимулює активність кінази BIN2, яка фосфорилує транскрипційний фактор TGA3. Вона посилює його активність зв'язування з ДНК, утворення комплексу NPR1-TGA3, експресію генів захисту, опосередкованих SA.

Екзогенний BR сприяє захисним реакціям, інактивуючи BIN2. BIN2 функціонує як негативний регулятор захисних реакцій шляхом фізичної взаємодії та фосфорилування транскрипційних факторів TGA1 та TGA4. Він пригнічує взаємодію з NPR1 та сприяти їх дестабілізації. Фосфорилування різних транскрипційних факторів TGA за допомогою BIN2 має різний вплив на їхню ДНК-зв'язувальну активність, взаємодію з NPR1, стабільність.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ САЛАЦИЛАТІВ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

NF-κB належить до родини індукованих транскрипційних факторів. Вони регулюють великий спектр генів, задіяних у багатьох аспектах імунних та запальних реакцій. Родина складається з п'яти споріднених білків: NF-κB1/p50, NF-κB2/p52, RelA/p65, RelB та c-Rel.

Ці транскрипційні фактори у формі гомо- або гетеродимерів Rel/NF-κB зв'язуються з елементом ДНК, який називається елементом κB, на промоторах цільового гена для регулювання експресії. Білки NF-κB секвеструються в цитоплазмі родиною інгібіторних білків. Вони називаються IκB.

Важливим шляхом активації NF-κB у відповідь на стимули - ліганди різних рецепторів цитокінів, є індукована деградація білків IκB. Запускається їх сайт-специфічним фосфорилуванням комплексом IκB-кінази (IKK), який складається з каталітичних субодиниць, IKKα та IKKβ, регуляторної субодиниці IKKγ.

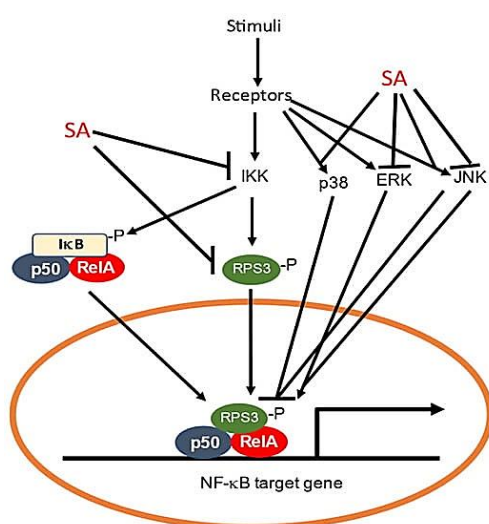


Рисунок 2.1.1. Інгібування шляху NF-κB за допомогою SA. SA може зв'язуватися з IKK та інгібувати його, запобігаючи фосфорилуванню та

деградації ІкВ, необхідним для активації NF-кВ.

Аспірин і SA інгібують шлях NF-кВ. Аспірин та SA специфічно інгібують активність ІКК β *in vitro* і *in vivo*. Механізм інгібування аспірином та SA полягає через зв'язування з ІКК β для зменшення зв'язування АТФ. Протизапальні властивості аспірину та саліцилату опосередковуються їхнім специфічним пригніченням ІКК β .

Це запобігає активації NF-кВ та пригніченню генів, задіяних у патогенезі запальної реакції.

Дослідження показали, що СК швидко та стійко активує p38 MAP-кіназу. Це важливо для здатності СК інгібувати фосфорилювання та деградацію ІкВ α , індуковану фактором некрозу пухлини (TNF).

Було виявлено, що СК може пригнічувати шлях NF-кВ через рибосомний білок S3 (RPS3), консервативну білкову субодиницю 40S рибосоми у еукаріотів. Дослідження на тваринах і людях показали, що RPS3 відіграє позарибосомну роль у репарації ДНК. RPS3 важливий у проліферації клітин, апоптозі та імунних реакціях на патогени.

RPS3 може переміщуватися до ядра після асоціації з ІКК β та фосфорилювання ним у відповідь на активацію шляху NF-кВ. У ядрі RPS3 є субодиницею NF-кВ. Вона допомагає селективному рекрутуванню NF-кВ до специфічних промоторів, адаптує транскрипційні реакції до специфічних стимулів.

СК зв'язується з RPS3 з клітин колоректального раку людини HT-29. Пригнічення RPS3 зменшило експресію циклінзалежної кінази 4 (CDK4), індукувало зупинку фази G1 у клітинах колоректального раку людини. Це спостерігалось після лікування SA. SA негативно регулює функцію RPS3 як потенційний механізм захисної дії проти колоректального раку.

Фосфорилювання білків – це оборотна посттрансляційна модифікація білків. Вона впливає на їх стабільність, субклітинну локалізацію та

активність.

У тютюні СК-індукована протеїнкіназа (SIPK) є MAPK для імунітету рослин. SIPK – це тютюновий ортолог *Arabidopsis* MPK6. Він разом зі своїм близьким гомологом MPK3 відіграє вирішальну роль не лише в сигналізації захисту, індукованій патогенами, але у рості та розвитку рослин (рис. 2.1.2).

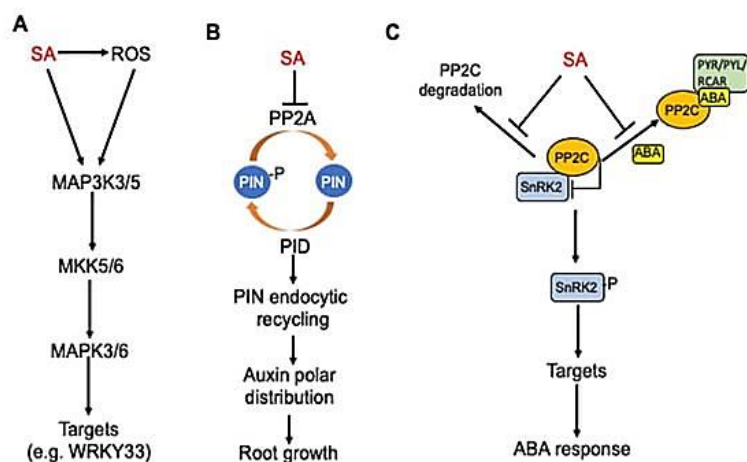


Рисунок 2.1.2. Регуляція мереж фосфорилювання білків за допомогою SA у рослин. Індукований SA сигнальний каскад MAPK для регуляції захисних реакцій. Інгібування SA росту коренів через інгібування PP2A, ендоцитарної рециркуляції та полярного розподілу ауксину.

Дослідження показало, що SA інгібує протеїнофосфатази типу 2A (PP2A) у *Arabidopsis*. PP2A - це гетеротример, що складається з каркасної субодиниці A, каталітичної субодиниці C, змінної регуляторної субодиниці B з 17 ізоформами у *Arabidopsis*.

Вони довго вважалися неселективними ферментами, PP2A частіше визнаються як специфічні регуляторні білки. Вони беруть участь у передачі сигналів для активації адаптивних реакцій рослин, регуляції транспорту ауксину за допомогою SA для балансування захисту та росту рослин.

СК може впливати на транспорт ауксину шляхом регуляції розподілу білків PIN на полярній плазматичній мембрані. Це відбувається шляхом зміни фосфорилювання білків-транспортів ауксину PIN.

Оборотне фосфорилування білків PIN важливе для регуляції їхньої полярності, субклітинної динаміки.

Транспортер ауксину PIN2 є мішенню PP2A і гіперфосфорильується у відповідь на SA. Це призводить до зміни активності транспортера виведення ауксину, пригнічення транспорту ауксину, розвитку коренів, опосередкованого ауксином - ріст, гравітропну відповідь та органогенез латерального кореня.

Дія СК на PP2A, полярний розподіл кореневих ауксинів та білків PIN, ріст коренів не залежать від рецепторів NPR.

СК впливає на протеїнофосфатази типу 2C (PP2C) для регуляції сигналізації абсцизової кислоти.

Найважливішими компонентами сигналізації ABA є рецептори ABA. Вони є членами регуляторного компонента резистентності до пірабактину 1/PYR1-подібного сімейства білків рецептора ABA (PYR/PYL/RCAR).

Зв'язування ABA рецепторами ABA стимулює зв'язування рецепторів ABA з PP2C. Тим самим запобігає опосередкованому PP2C дефосфорилуванню членів сімейства протеїнкіназ кіназ підродина 2 (SnRK2).

В результаті SnRK2 матиме підвищене автофосфорилування та підвищену кіназну активність для передачі сигналу ABA шляхом фосфорилування мішеней. SA безпосередньо зв'язується з PP2C, може пригнічувати посилену ABA взаємодію між PP2C та рецепторами ABA.

SA також може пригнічувати посилену ABA деградацію PP2C, індуковану ABA стабілізацію SnRK2.

Усі дії СК мали б негативний вплив на сигналізацію ABA. Екзогенна СК пригнічувала експресію генів, індуковану ABA. Мутант *sid2-1* з дефіцитом СК демонстрував підвищену деградацію PP2C, посилене пригнічення проростання насіння ABA.

Результати вказують на те, що СК частково антагонізує сигналізацію ABA, впливаючи на критичні компоненти PP2C сигнальних комплексів ABA.

АК може зв'язуватися та інгібувати ІКК, пригнічуючи деградацію ІкВ, активацію NF-κВ. АК швидко та стійко активує р38 MAP-кіназу, інгібуючи фосфорилування, деградацію ІкВ α .

Р38 MAP-кінази є однією з трьох основних підродин MAP-кіназ. Дві інші підродини - це позаклітинні сигнально-регульовані кінази (ERK) та с-jun N-кінцева кіназа (JNK). Сигнальні каскади трьох підродин MAP-кіназ важливі для регуляції запалення, для клітинної проліферації, диференціації та апоптозу.

Кілька ключових факторів росту та протоонкогенів передають сигнал для стимулювання росту та диференціації через сигнальні каскади MAP-кіназ.

SA пригнічує експресію COX2, індуковану TNF/IFN, шляхом пригнічення ERK та подальшої активації.

Вплив SA на активацію JNK є специфічним для типу клітин. У клітинах нирок африканської зеленої мавпи COS-1 та клітинах аденокарциноми товстої кишки людини HT-29 лікування SA призводить до стійкої активації JNK. Активація, індукована SA р38 MAPK і JNK може бути пов'язана з протизапальною дією SA.

СК може активувати аденозинмонофосфат-активовану протеїнкіназу (AMPK). Вона є центральним регулятором росту та метаболізму клітин, що зберігається у всіх еукаріотів. AMPK - це гетеротримерний комплекс, що складається з каталітичної α -субодиниці та регуляторних β - та γ -субодиниць. Після активації в умовах метаболічного стресу AMPK фосфорилує мішені, сприяючи катаболічним шляхам, що генерують АТФ. Протеїнкіназа-супресор пухлини, LKB1, та Ca²⁺-кіназа, CaMKK β , активують AMPK шляхом фосфорилування по Thr172 в α -субодиниці.

Зв'язування AMP та аденозиндифосфату (ADP) з γ -субодиницею AMPK запускає перехід до активної форми. Він сприяє фосфорилуванню та інгібуючи дефосфорилування [21-26]. Зв'язування AMP з другим сайтом може додатково активувати AMPK та індукувати подальші алостеричні зміни.

СК активує АМРК шляхом зв'язування з кіназним комплексом. Це викликає алостеричну активацію та інгібування дефосфорилювання активуючого сайту фосфорилювання. Багато видів раку мають високу швидкість синтезу жирних кислот. Він інгібується АМРК через фосфорилювання ацетил-КоА-карбоксилази (АСС). СК пригнічує клоногенне виживання клітин раку простати та легень, може збільшувати фосфорилювання АСС, зменшувати *de novo* ліпогенез АМРК-залежним чином (рис. 2.1.3).

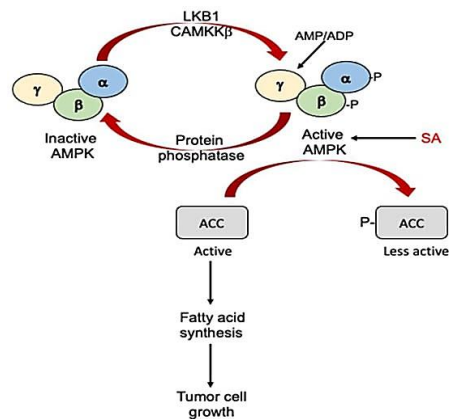


Рисунок 2.1.3. Протипухлинна активність АК через активацію АМФК, яка активується шляхом фосфорилювання її α - та β -субодиниць за допомогою LKB1 та САМКК β , через алостеричний вплив на її γ -субодиницю за допомогою АМФ/АДФ.

Консервативний фермент PP2A безпосередньо впливає на SA у рослин, регулюється аспірином у тварин. Аспірин демонструє хіміопрофілактичну ефективність при раку товстої кишки. Це пов'язано з впливом аспірину на активність онкогенного шляху інтеграції, пов'язаного з безкрилими (Wingless-related integration site)/ β -катеніну в клітинних лініях колоректального раку.

Сигналізація Wnt/ β -катеніну ініціюється зв'язуванням позаклітинних багатих на цистеїн глікопротеїнів WNT з N-кінцевим позаклітинним доменом сімейства G-білкових рецепторів Frizzled. Зв'язування порушує комплекс руйнування β -катеніну, запускає цитоплазматичне накопичення β -катеніну. Він потім переміщується до ядра, щоб зв'язатися з транскрипційним комплексом Т-клітинного фактора/лімфоїдного енансера-1 (TCF/Lef1) для

активації транскрипції генів.

Сигналізація Wnt/ β -катеніну пов'язана з патогенезом кількох видів раку.

Аспірин пригнічує активність шляху дозозалежним чином. Це оцінюється за активністю люциферази, експресією гена-мішені Wnt та рівнями й субклітинною локалізацією β -катеніну.

Лікування аспірином збільшувало фосфорилювання та було пов'язане з пригніченням ферментативної активності PP2A. Використовуючи транзиторну трансфекцію з конструкціями PP2A, показано, що пригнічення ферментативної активності PP2A необхідне для впливу аспірину на шлях Wnt/ β -катеніну. Результати дослідження виявили молекулярний механізм ефективності аспірину в хіміопрофілактиці колоректального раку шляхом пригнічення PP2A - важливого регулятора активності шляху Wnt/ β -катеніну в клітинах. АК безпосередньо зв'язується з рослинним і з людським GAPDH. GAPDH – це фермент гліколізу. Він каталізує перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на гліцерат-1,3-біфосфат. Процес супроводжується продукцією NADH.

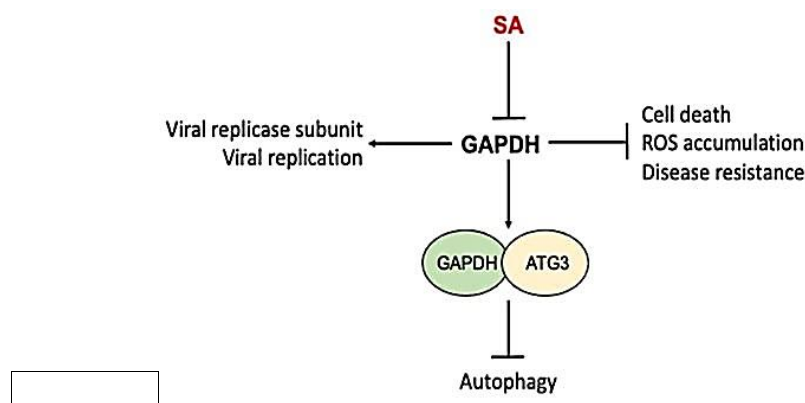
У *Arabidopsis* є сім членів GAPDH. П'ять з яких зв'язують АК. Серед п'яти GAPDH - три (GAPA-1, GAPA-2 та GAPC-2) локалізовані в хлоропластах і беруть участь у фотосинтетичному відновному вуглецевому циклі. Два інші (GAPC-1 та GAPC-2) є цитозольними білками. Окрім консервативної метаболічної функції GAPDH бере участь в інших неметаболічних процесах. GAPDH зв'язує РНК низки вірусів. На основі протеомного аналізу, GAPDH є одним із кооптованих білків хазяїна реплікази вірусу кущистої спинномозкової недостатності томатів (TBSV), одноланцюгового РНК-вірусу з позитивним (+) ланцюгом. GAPDH переважно зв'язується з (-) ланцюгом РНК TBSV. Це зв'язування необхідне для реплікації TBSV.

СА пригнічує реплікацію TBSV, пригнічуючи зв'язок цитозольного GAPDH з негативним(-)-ланцюгом РНК TBSV. Клітинні біологічні та генетичні підходи виявили додаткові ролі GAPDH *Arabidopsis* в імунних

реакціях на бактеріальний патоген *Pseudomonas syringae*. Нокаут-мутанти для різних генів GAPDH демонстрували підвищену стійкість до бактеріального патогену. Вони прискорювали загибель клітин та збільшували базальне накопичення активних форм кисню.

Цитозольний GAPC-1 *Arabidopsis* демонстрував підвищене накопичення в ядрі у відповідь на інфекцію. Мутант для GAPA-1 та GAPC-1 демонстрував конститутивні фенотипи аутофагії за нормальних умов росту. Цитозольні GAPC *Arabidopsis* взаємодіють з білком, пов'язаним з аутофагією (ATG3).

СК регулює багато з імунних та стресових реакцій. Деякі з цих дій СК принаймні частково опосередковуються її інгібуванням GAPDH шляхом прямого зв'язування (рис. 2.1.4).



Рисуно 2.1.4. Пригнічення неметаболічної активності GAPDH за допомогою SA. GAPDH рослин і людини беруть участь у низці неметаболічних процесів - реплікація вірусів, загибель клітин, накопичення активних форм кисню (ROS), стійкість до хвороб, аутофагія.

У людей GAPDH бере участь у репарації ДНК, транскрипції, утворенні ROS та апоптозі клітин. GAPDH відіграє вирішальну роль у нейродегенерації. Є основним підозрюваним у кількох нейродегенеративних захворюваннях, включаючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона. Протипаркінсонічний препарат депреніл пригнічує ядерну транслокацію людського GAPDH.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

За Євр. Фарм. аналіз саліцилової кислоти виконується за монографією 01/2017:0366. 2-Гідроксибензолкарбонова кислота. Вміст: від 99,0% до 100,5%. Перша ідентифікація: А, В. Друга ідентифікація: А, С.

А. Температура плавлення (2.2.14): від 158 °С до 161 °С.

В. Інфрачервона абсорбційна спектрофотометрія (2.2.24). Порівняння: саліцилова кислота CRS.

С. Розчиніть 30 мг у 5 мл 0,05 М розчину гідроксиду натрію, нейтралізуйте, доведіть об'єм розчину водою Р до 20 мл. 1 мл розчину дає реакцію саліцилатів (2.3.1).

Супровідні речовини за методом РХ. (2.2.29). Випробовуваний розчин. 0,50 г досліджуваної речовини в рухомій фазі, доведіть об'єм рухомою фазою до 100,0 мл. Розчин порівняння (а). 10 мг фенолу R (домішка С) у рухомій фазі, доведіть об'єм рухомою фазою до 100,0 мл. Розчин порівняння (b). 5 мг CRS саліцилової кислоти домішки В у рухомій фазі, доведіть об'єм рухомою фазою до 20,0 мл. Розчин порівняння (с). 50 мг 4-гідроксибензойної кислоти R (домішка А) у рухомій фазі, доведіть об'єм рухомою фазою до 100,0 мл. Розчин порівняння (d). 1,0 мл розчину порівняння (а) до 10,0 мл рухомою фазою. Розчин порівняння (е). суміш 1,0 мл кожного з розчинів порівняння (а), (b) та (с) до 10,0 мл рухомою фазою. Розчин порівняння (f). суміш 0,1 мл кожного з розчинів порівняння (а), (b) та (с) до 10,0 мл рухомою фазою. Рухома фаза: льодовикова оцтова кислота R-метанол R-вода R (1:40:60 об./об./об.).

Виявлення: спектрофотометр при 270 нм. Кількісний вміст: 0,120 г у 30 мл етанолу (96%) Р та 20 мл води Р. Титруйте 0,1 М розчином гідроксиду натрію (0,1 мл розчину фенолового червоного Р). 1 мл 0,1 М розчину

гідроксиду натрію еквівалентний 13,81 мг $C_7H_6O_3$.

Нами виконано хроматографічне дослідження - впровадження високоселективного методу Газової хроматографії для ідентифікації та кількісного визначення складових трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції, а також визначення її чистоти; адаптація умов хроматографування випробовуваної субстанції з використанням базових умов хроматографування і методик дослідження, які описано в Європейській Фармакопеї для дослідження методом Рідинної хроматографії.

Дослідження включає два напрямки:

- 1). Ідентифікація та визначення чистоти методом ГХ складових трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції;
- 2). Визначення кількісного вмісту методом ГХ складових трьохкомпонентної системи – ментол-метилсаліцилат-бензиловий спирт, які одночасно присутні у складі випробовуваної субстанції.

Матеріали та методи.

Agilent 6890A з полум'я-іонізаційним детектором (FID).

Хроматографічні умови

- колонка – DB-1701 ((14%-ціанопропіл-феніл)-метилполісілоксан), 30 м × 530 мкм × 1 мкм; колонка була підключена до заднього полум'я-іонізаційного детектора (FID).
- газ-носій — азот, подача в режимі постійного потоку 3,0 мл/хв.
- Контроль режиму потоку здійснювався у режимі постійного потоку.
- Температурна програма хроматографічного аналізу:
 - початкова температура: 50 °C (утримання 5 хв),
 - нагрівання зі швидкістю 20 °C/хв до 170 °C (утримання 8 хв),

- нагрівання зі швидкістю 30 °C/хв до 230 °C (утримання 6 хв),
- кінцева температура: 230 °C.
- Температура інжектора — 200 °C.

Інжекція здійснювалась у режимі з діленням потоку зі співвідношенням 5:1. Об'єм ін'єкції складав 1 мкл. Температура детектора FID — 240 °C. Детектор працював із потоком: водню 30 мл/хв; повітря 350 мл/хв; азоту 25 мл/хв.

Передній детектор ECD був вимкнений. Час хроматографування – 27 хв.

Ідентифікацію сполук проводили за часом утримування з порівнянням до стандартів. У якості внутрішнього стандарту використовуввся 1-деканол.

Обчислення концентрацій виконували за площею піків у хроматограмах.

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS. Для проведення досліджень методом ГХ використовували реактиви: вода (чистоти для ГХ).

Отримані результати.

Підготовка внутрішнього стандарту (також виступає у якості розчинника): точну наважка 500 мг 1-деканолу помістити в мірну колбу на 500 мл, додати метанол, розчинити. Довести до мітки метанолом (концентрація 1-деканолу 1 мг/мл).

Підготовка стандартного розчину: точні наважки — 40 мг ментолу, 40 мг бензилового спирту (BA), 400 мг метилсаліцилату (MS) поміщають у мірну колбу на 100 мл. Додають 20 мл метанолу та 20 мл внутрішнього стандарту. (кінцеві концентрації: BA — 400 ppm, ментол — 400 ppm, MS — 4000 ppm, 1-деканол — 200 ppm)

На рисунках 3.1-3.3 представлено отримані хроматограми.

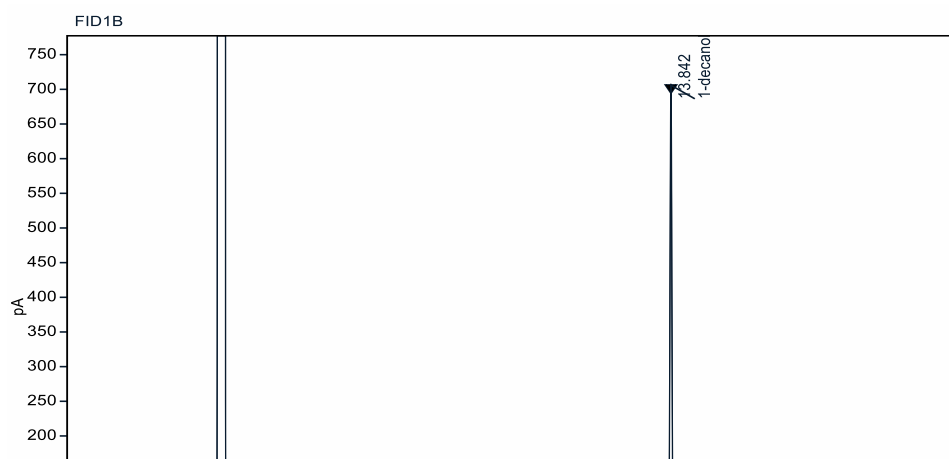


Рисунок 3.1. Хроматограма бланку.

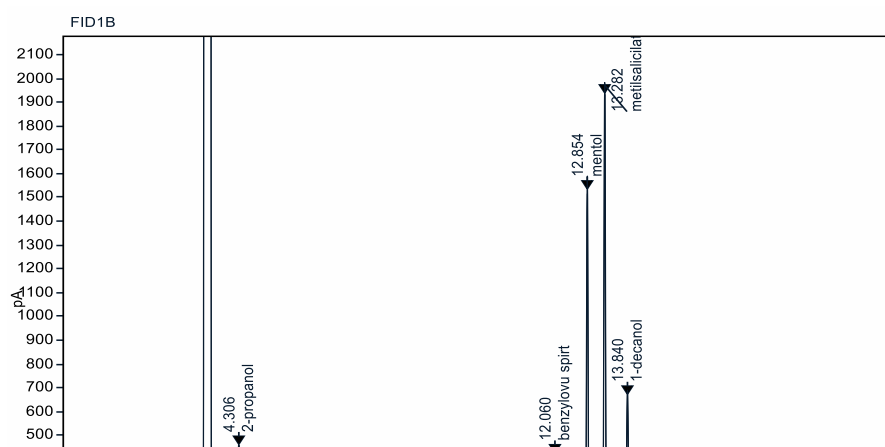


Рисунок 3.2. Хроматограма розчину стандартного зразку.

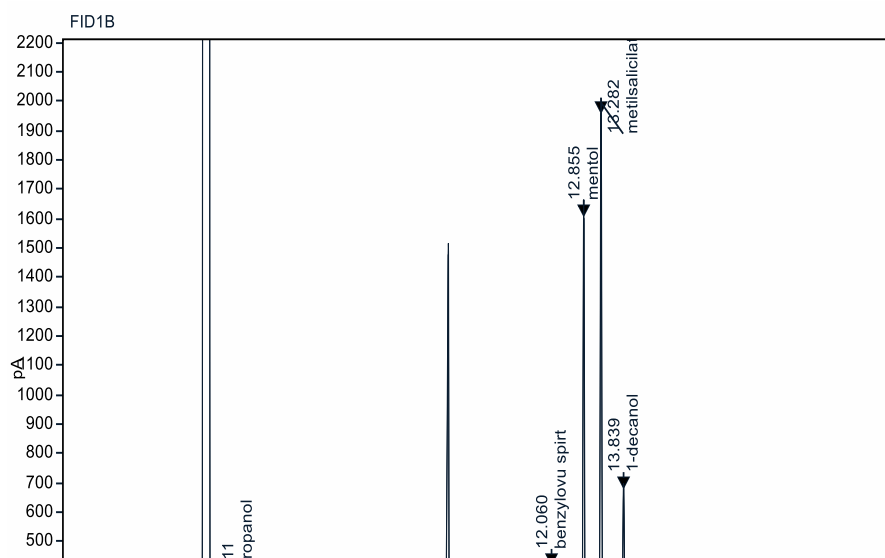


Рисунок 3.3. Хроматограма розчину випробовуваного зразку: 2-пропанол $R_t = 4.311$ хв, бензиловий спирт $R_t = 12.060$ хв, ментол $R_t = 12.855$ хв, метилсаліцилат $R_t = 13.282$ хв, 1-деканол (стандарт) $R_t = 13.839$ хв.

Отримані результати представлено в таблиці 3.1:

Таблиця 3.1. Результати хроматографування.

	1-деканол S5		бензиловий спирт S2		S2/S5	ментол S3		S3/S5	метилсаліцилат S4		S4/S5
	час	площа	час	площа		час	площа		час	площа	
			мг=	41,8		мг=	200,0		мг=	400,8	
	13,840	2125,258	12,06	838,296	0,394	12,854	4059,024	1,910	13,282	5346,223	2,516
	13,838	2080,593	12,061	826,220	0,397	12,854	4001,444	1,923	13,282	5273,478	2,535
	13,839	2080,415	12,061	823,55	0,396	12,855	3984,996	1,915	13,282	5250,335	2,524
	13,839	2183,031	12,06	866,097	0,397	12,855	4191,791	1,920	13,282	5519,697	2,528
	13,839	2035,459	12,059	808,235	0,397	12,853	3912,977	1,922	13,281	5162,283	2,536
	13,840	2083,789	12,06	825,915	0,396	12,855	4000,032	1,920	13,283	5267,080	2,528
Середнє	13,839	2098,091	12,060	831,386	0,396	12,854	4025,044	1,918	13,282	5303,183	2,528
SD					0,0010			0,0050			0,0075
RSD%					0,3%			0,3%			0,3%
	1-деканол S5		бензиловий спирт S2		S2/S5	ментол S3		S3/S5	метилсаліцилат S4		S4/S5
	час	площа	час	площа		час	площа		час	площа	
	13,839	2172,311	12,060	834,566	0,384	12,855	4267,351	1,964	13,282	5430,114	2,500
	13,843	2277,993	12,062	875,952	0,385	12,857	4470,688	1,963	13,285	5679,121	2,493
	13,844	2282,918	12,063	878,954	0,385	12,858	4487,063	1,965	13,286	5697,581	2,496
Середнє	13,842	2244,407	12,062	863,157	0,385	12,857	4408,367	1,964	13,284	5602,272	2,496

В таблицях:

T- тейлінг (форма піку, часто буває менше 2),

N – кількість теоретичних тарілок (чим більше теоретичних тарілок, тим вища ефективність розділення компонентів у колонці),

RSD - відносне стандартне відхилення, згідно Фармакопеї, має бути менше 2),

SD –стандартне відхилення, використовується для визначення *RSD*)

Розрахунок концентрацій (вмісту) компонентів у субстанції базується на методі внутрішнього стандарту (1-деканол) за співвідношенням площ піків у хроматограмах. Використовуємо формулу %Assay (w/w) для кожного компонента: бензилового спирту (BA), ментолу, метилсаліцилату (MS). Р (чистота стандарту) = 100%. Sample wt = 1000 мг (1 г препарату). Заявлений вміст: BA — 1%, ментол — 5%, MS — 10%. Обчислені концентрації: BA ≈ 1,04%, ментол ≈ 4,95%, MS ≈ 9,85%. % від заявленого: BA — 104%, ментол — 99%, MS — 99%.

Опис розрахунку

Розрахунок проводиться за методом внутрішнього стандарту (1-деканолу) з використанням співвідношення площ піків (з наданого малюнка).

Формула:

%Assay (w/w, % масових): $\%Assay = (Sample\ ratio / Avg\ Std\ ratio) \times (Std\ wt, \text{мг} / Sample\ wt, \text{мг}) \times 25,$

де:

- Sample ratio — середнє співвідношення площ піку речовини до піку стандарту в досліджуваному зразку (нижня таблиця).
- Avg Std ratio — середнє співвідношення в стандартному розчині (верхня таблиця).
- Std wt — маса наважки речовини в стандартному розчині (БА: 41,8 мг; ментол: 40 мг; MS: 400,8 мг).
- Sample wt = 1000 мг (1 г препарату).
- 25 — фактор розведення (об'єм колби для зразка, мл).
- % від заявленого = $(\%Assay \times 100) / \text{заявлений \%}$.

Покроковий розрахунок

1. Бензиловий спирт (БА):

- Sample ratio = 0,385.
- Avg Std ratio = 0,386.
- Проміжне: $Sample\ ratio / Avg\ Std\ ratio = 0,385 / 0,386 \approx 0,9974$.
- Проміжне: $Std\ wt / Sample\ wt = 41,8 / 1000 = 0,0418$.
- $\%Assay = 0,9974 \times 0,0418 \times 25 \approx 0,9974 \times 1,045 \approx 1,04\%$.
- $\% \text{ від заявленого} = (1,04 \times 100) / 1 = 104\%$.

2. Ментол:

- Sample ratio = 1,964.
- Avg Std ratio = 0,396.
- Проміжне: $Sample\ ratio / Avg\ Std\ ratio = 1,964 / 0,396 \approx 4,9596$.
- Проміжне: $Std\ wt / Sample\ wt = 40 / 1000 = 0,04$.

- $\% \text{Assay} = 4,9596 \times 0,04 \times 25 \approx 4,9596 \times 1 = 4,96\%$.
- $\% \text{ від заявленого} = (4,96 \times 100) / 5 \approx 99\%$.

3. Метилсаліцилат (MS):

- Sample ratio = 2,496.
- Avg Std ratio = 2,528.
- Проміжне: Sample ratio / Avg Std ratio = $2,496 / 2,528 \approx 0,9873$.
- Проміжне: Std wt / Sample wt = $400,8 / 1000 = 0,4008$.
- $\% \text{Assay} = 0,9873 \times 0,4008 \times 25 \approx 0,9873 \times 10,02 \approx 9,89\%$.
- $\% \text{ від заявленого} = (9,89 \times 100) / 10 \approx 99\%$.

Метилсаліцилат дуже малорозчинний у воді - близько 0,6–1 г на 1 літр води при кімнатній температурі. Він вільно змішується з етанолом, ефіром, жирними та ефірними оліями. Будучи складним ефіром (метиловим ефіром саліцилової кислоти), він має неполярний характер, що заважає йому утворювати стійкі зв'язки з полярними молекулами води. Завдяки своїй гідрофобності метилсаліцилат добре проникає крізь ліпідний шар шкіри, що робить його ефективним компонентом мазей та гелів для місцевого знеболення. Завдяки своїй гідрофобності *ментол* добре проникає крізь ліпідний шар шкіри, що робить його ефективним компонентом олійних та спиртових розчинів, мазей та бальзамів. Ментол використовують для створення гідрофобних глибинних евтектичних розчинників (DES) для екологічно чистої екстракції речовин. *Склад з домінуванням метилсаліцилату (9,89%) та ментолу (4,96%) вказує на гідрофобний (ліпофільний) профіль (HLB ~3–8), придатний для стабілізації емульсій у препаратах, де покращує розчинність гідрофобних лікарських засобів. Зазвичай концентрація ментолу складає у спиртових розчинах 2,5%, мазях та гелях 1-5%, у ментоловому маслі – 1%. Зазвичай концентрація метилсаліцилату складає у мазях та лініментах 20%, комбінованих гелях та кремах 5-15%, у ментоловому маслі – 1%. Концентрація цих компонентів суттєво варіюється залежно від форми випуску та місця застосування.*

ВИСНОВКИ

1. Впроваджено метод ГХ у аналіз субстанції, яка містить одночасно три компоненти: бензиловий спирт $R_t=12.060$ хв, ментол $R_t= 12.855$ хв, метилсаліцилат $R_t= 13.282$ хв, які за допомогою хроматографічних даних ідентифіковані та виявлена супровідна речовина 2-пропанол (помірно токсична сполука, 3 клас небезпеки) $R_t= 4.311$ хв (за Євр. Фарм. використовують метод РХ, ІЧ-спектрофотометрії).
2. Методом ГХ та розрахунковим методом визначено концентрації компонентів субстанції (у %): *середні площі аналітичних сигналів для випробовуваного зразку субстанції*: бензиловий спирт 863.157, ментол 4408.367, метилсаліцилат 5602.272: Бензиловий спирт: 1,04%, Ментол: 4,96%, Метилсаліцилат: 9,89% (за Євр. Фарм. використовують метод титриметричний).
3. Склад з домінуванням метилсаліцилату (51,52%) та ментолу (40,5%) вказує на гідрофобний (ліпофільний) профіль (HLB ~3–8), придатний для стабілізації емульсій у препаратах, де покращує розчинність гідрофобних лікарських засобів. Концентрація цих компонентів **суттєво варіюється залежно від форми випуску та місця застосування.**

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Liu, J.; Qiu, G.; Liu, C.; Li, H.; Chen, X.; Fu, Q.; Lin, Y.; Guo, B. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone, Combats Abiotic Stresses in Plants. *Life* 2022, 12, 886.
2. Khan, M.I.; Fatma, M.; Per, T.S.; Anjum, N.A.; Khan, N.A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 462.
3. Zhong, Q.; Hu, H.; Fan, B.; Zhu, C.; Chen, Z. Biosynthesis and Roles of Salicylic Acid in Balancing Stress Response and Growth in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1672.
4. Dempsey, D. A.; Klessig, D.F. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biol.* 2017, 15, 23.
5. Arif, H.; Aggarwal, S. Salicylic Acid (Aspirin); StatPearls: Treasure Island, FL, USA, 2022.
6. Liu, Y.; Sun, T.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Radojicic, A.; Ding, Y.; Tian, H.; Huang, X.; Lan, J.; Chen, S.; et al. Diverse Roles of the Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Plant Immunity. *Plant Cell* 2020, 32, 4002–4016.
7. Wu, Y.; Zhang, D.; Chu, J.Y.; Boyle, P.; Wang, Y.; Brindle, I. D.; De Luca, V.; Despres, C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.* 2012, 1, 639–647.
8. Kumar, S.; Zavaliev, R.; Wu, Q.; Zhou, Y.; Cheng, J.; Dillard, L.; Powers, J.; Withers, J.; Zhao, J.; Guan, Z.; et al. Structural basis of NPR1 in

- activating plant immunity. *Nature* 2022, 605, 561–566.
9. Peng, Y.; Yang, J.; Li, X.; Zhang, Y. Salicylic Acid: Biosynthesis and Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2021, 72, 761–791.
 10. Yu, X.; Cui, X.; Wu, C.; Shi, S.; Yan, S. Salicylic acid inhibits gibberellin signaling through receptor interactions. *Mol. Plant* 2022, 15, 1759–1771.
 11. Nolan, T.; Vukasinovic, N.; Liu, D.; Russinova, E.; Yin, Y. Brassinosteroids: Multi-Dimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Plant Cell* 2019, 32, 295–318.
 12. An, S.; Liu, Y.; Sang, K.; Wang, T.; Yu, J.; Zhou, Y.; Xia, X. Brassinosteroid signaling positively regulates abscisic acid biosynthesis in response to chilling stress in tomato. *J. Integr. Plant Biol.* 2022.
 13. Han, Q.; Tan, W.; Zhao, Y.; Yang, F.; Yao, X.; Lin, H.; Zhang, D. Salicylic acid-activated BIN2 phosphorylation of TGA3 promotes Arabidopsis PR gene expression and disease resistance. *EMBO J.* 2022, 41, e110682.
 14. Kim, Y.W.; Youn, J.H.; Roh, J.; Kim, J.M.; Kim, S.K.; Kim, T.W. Brassinosteroids enhance salicylic acid-mediated immune responses by inhibiting BIN2 phosphorylation of clade I TGA transcription factors in Arabidopsis. *Mol. Plant* 2022, 15, 991–1007.
 15. Park, Y. J.; Kim, S. H.; Kim, T.S.; Lee, S. M.; Cho, B.S.; Seo, C.I.; Kim, H.D.; Kim, J. Ribosomal protein S3 associates with the TFIIF complex and positively regulates nucleotide excision repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021, 78, 3591–3606.

16. Alam, E.; Maaliki, L.; Nasr, Z. Ribosomal protein S3 selectively affects colon cancer growth by modulating the levels of p53 and lactate dehydrogenase. *Mol. Biol. Rep.* 2020, 47, 6083–6090.
17. Imai, A.; Horinaka, M.; Aono, Y.; Iizumi, Y.; Takakura, H.; Ono, H.; Yasuda, S.; Taniguchi, K.; Nishimoto, E.; Ishikawa, H.; et al. Salicylic acid directly binds to ribosomal protein S3 and suppresses CDK4 expression in colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022, 628, 110–115.
18. Park, Y. J.; Kim, S. H.; Kim, T.S.; Lee, S. M.; Cho, B.S.; Seo, C.I.; Kim, H.D.; Kim, J. Ribosomal protein S3 associates with the TFIIH complex and positively regulates nucleotide excision repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021, 78, 3591–3606.
19. Alam, E.; Maaliki, L.; Nasr, Z. Ribosomal protein S3 selectively affects colon cancer growth by modulating the levels of p53 and lactate dehydrogenase. *Mol. Biol. Rep.* 2020, 47, 6083–6090.
20. Imai, A.; Horinaka, M.; Aono, Y.; Iizumi, Y.; Takakura, H.; Ono, H.; Yasuda, S.; Taniguchi, K.; Nishimoto, E.; Ishikawa, H.; et al. Salicylic acid directly binds to ribosomal protein S3 and suppresses CDK4 expression in colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022, 628, 110–115.
21. Tan, S.; Abas, M.; Verstraeten, I.; Glanc, M.; Molnar, G.; Hajny, J.; Lasak, P.; Petrik, I.; Russinova, E.; Petrasek, J.; et al. Salicylic Acid Targets Protein Phosphatase 2A to Attenuate Growth in Plants. *Curr. Biol.* 2020, 30, 381–395.e8.
22. Niu, L.; Yang, W.; Duan, L.; Wang, X.; Li, Y.; Xu, C.; Liu, C.; Zhang, Y.; Zhou, W.; Liu, J.; et al. Biological functions and theranostic

- potential of HMGB family members in human cancers. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2020, 12, 850.
23. Guo, J.; Wei, L.; Chen, S.S.; Cai, X. W.; Su, Y. N.; Li, L.; Chen, S.; He, X.J. The CBP/p300 histone acetyltransferases function as plant-specific MEDIATOR subunits in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.* 2021, 63, 755–771.
24. Jiang, Y.; Ye, F.; Du, Y.; Zong, Y.; Tang, Z. P2X7R in Mast Cells is a Potential Target for Salicylic Acid and Aspirin in the Treatment of Inflammatory Pain. *J. Inflamm. Res.* 2021, 14, 2913–2931.
25. Lu, Y. G.; Tang, Z.Q.; Ye, Z.Y.; Wang, H. T.; Huang, Y. N.; Zhou, K.Q.; Zhang, M.; Xu, T. L.; Chen, L. Salicylate, an aspirin metabolite, specifically inhibits the current mediated by glycine receptors containing alpha1-subunits. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 157, 1514–1522.
26. Choi, H. W.; Wang, L.; Powell, A.F.; Strickler, S. R.; Wang, D.; Dempsey, D. A.; Schroeder, F.C.; Klessig, D.F. A genome-wide screen for human salicylic acid (SA)-binding proteins reveals targets through which SA may influence the development of various diseases. *Sci. Rep.* 2019, 9, 13084.
27. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2.
28. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022. V.1II: 3938-3939.

SUMMARY

Motrunich Valeriia

"STUDY BY GAS CHROMATOGRAPHY OF A THREE-COMPONENT SYSTEM – MENTHOL-METHYL SALICYLATE-BENZYL ALCOHOL IN THE COMPOSITION OF THE SUBSTANCE"

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: PhD (Biol.) Meleshko R.A.

Keywords: three-component system, menthol, methyl salicylate, benzyl alcohol, accompanying substances, residual amounts, substance, medicinal product, GC, impurities.

Introduction. A composition that simultaneously contains menthol, methyl salicylate and benzyl alcohol, typical of local analgesics and anti-inflammatory agents (ointments, gels or solutions). Methyl salicylate: has a pronounced anti-inflammatory and analgesic effect, inhibiting the synthesis of prostaglandins. Menthol: stimulates the cold receptors of the skin, causing a feeling of coolness. This distracts from pain and improves local blood circulation. Benzyl alcohol: in mixtures often acts as an antiseptic, solvent or auxiliary preservative, has a slight local anesthetic effect. Being an ester (methyl ester of salicylic acid), it has a non-polar nature, which prevents it from forming stable bonds with polar water molecules. Due to its hydrophobicity, methyl salicylate penetrates well through the lipid layer of the skin, which makes it an effective component of ointments and gels for local anesthesia.

Materials and methods. Objects of research are substances of menthol, methyl salicylate, benzyl alcohol and its standard samples. Research subject: development of conditions for GC study of pharmaceutical analysis of the mix of menthol, methyl salicylate, benzyl alcohol substances. Methods: Agilent 6890A with flame ionization detector (FID), column – DB-1701 ((14%-cyanopropyl-phenyl)-methylpolysiloxane), 30 m × 530 μm × 1 μm; Temperature program of chromatographic analysis: initial temperature: 50 °C (hold 5 min), heating at a rate of 20 °C/min to 170 °C (hold 8 min), OpenLab CDS program.

Results. The GC method was introduced into the analysis of a substance containing three components at the same time: benzyl alcohol $R_t=12.060$ min, menthol $R_t=12.855$ min, methyl salicylate $R_t=13.282$ min, which were identified and the accompanying substance 2-propanol (moderately toxic compound, hazard class 3) $R_t=4.311$ min was detected (according to the Eur. Pharm., the method of LC, IR spectrophotometry is used).

Conclusions. The GC method and the calculation method determined the concentrations of the substance components (in %): average areas of analytical signals: benzyl alcohol 863.157, menthol 4408.367, methyl salicylate 5602.272: Benzyl alcohol: $(863.157 / 10\ 873.796) \times 100 = 7.94\%$, Menthol: $(4408.367 / 10\ 873.796) \times 100 = 40.54\%$, Methyl salicylate: $(5602.272 / 10\ 873.796) \times 100 = 51.52\%$ (according to the Eur. Pharm., the titrimetric method is used).

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор

В. о. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор



Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК