

УДК: 54.062:615.454.1:543.544.943.3.068.7

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ РЕСВЕРАТРОЛУ В ГЕЛІ МЕТОДОМ ВЕРХ

Іванюк О.І., Ханін В.А., Ярних Т.Г.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Вступ. Для лікування гіпоестрогенових станів у жінок доцільно використовуються препарати рослинного походження фітоестрогенної дії. До складу гелю, що розробляється введено ресвератрол, який має фітоестрогенну, антиоксидантну та протизапальну дію [1]. Використання як активний фармацевтичний інгредієнт речовини рослинного походження дозволяє уникнути прийому синтетичних гормональних препаратів, що зменшує негативний вплив на організм жінки. Для отримання якісного препарату важливим є проведення аналізу кількісного вмісту діючої речовини у складі лікарського засобу.

Мета дослідження. Розробка методики кількісного вмісту ресвератролу в гелі методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням.

Матеріали і методи. Для визначення кількісного вмісту ресвератролу в препараті було використано рідинний хроматограф Agilent 1290 з чотирьох каналним насосом для формування градієнту низького тиску, автосамплером, термостатом колонки та мас-спектрометром Agilent 6420 Triple Quad. Для обробки отриманих результатів дослідження використовували програмне забезпечення MassHunter B04.01. В якості стандартного зразку використовували СЗ ресвератрол фірми Sigma Aldrich, Німеччина (серія №SLBS8228).

Рухома фаза: А: 0,005М розчин форміату амонію в воді Р; В: 0,005М розчин форміату амонію в суміші ацетонітрил Р – вода Р (90:10), дегазовані будь яким зручним способом. Режим елюювання: градієнтний від 5 до 100% рухомої фази В за 30 хв.

Випробовуваний розчин. 1,00 г (точна наважка) препарату поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 90,0 мл метанолу Р та обробляють ультразвуком протягом 10 хв. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять до позначки тим самим розчинником та перемішують протягом 10 хв.

Розчин порівняння. 70,0 мг (точна наважка) СЗ ресвератролу поміщають в мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 170,0 мл метанолу Р та обробляють ультразвуком до повного розчинення. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять до позначки тим самим розчинником та перемішують. 2 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 20 мл доводять до позначки метанолом Р та перемішують.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь PTFE мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,2 мкм.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з мас-спектрометричним детектором за таких умов: колонка InfinityLab Poroshell 120 Bonus-RP, розміром 2.1 x 50 мм та сорбентом з діаметром пор 2.7 мкм, швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв, температура колонки –30 °С, об'єм інжекції – 5 мкл.

Тип іонізації – позитивний, електроспрей (+ESI). Детектування проводили в режимі вимірювання накопичення іонів з масою 229 а.е. Напруга на фрагментаторі

складала 50 В, витрата азоту була на рівні 10 мл/хв, температура азоту – 350 °С.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо виконувались наступні вимоги: ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком ресвератролу з хроматограми розчину порівняння має бути не меншою 1000 теоретичний тарілок; коефіцієнт симетрії піка ресвератролу – не більше 2,0; відносне стандартне відхилення розраховане за результатом 5 інжекцій – не більше 1,0%.

Основні результати. Було розроблено методику кількісного визначення ресвератролу в гелі. При проведенні тесту на придатність хроматографічної системи були отримані наступні результати: коефіцієнт симетрії піка ресвератролу становив 1,81; відносне стандартне відхилення було на рівні 0,2%; ефективність хроматографічної колонки – 3827 теоретичні тарілки. Отримані результати тесту свідчать про достовірність отриманих результатів.

Вміст ресвератролу (X), у відсотка, в препараті розраховували за формулою:

$$x = \frac{S_i \times m_0 \times 100 \times 2 \times P}{S_0 \times m \times 200 \times 20} = \frac{S_i \times m_0 \times P}{S_0 \times m \times 20}, \text{ де}$$

S_i – середнє значення площі піку ресвератролу, розраховану з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку ресвератролу, розраховану з хроматограм розчину порівняння ;

m_0 – маса наважки стандартного зразку СЗ ресвератролу, у грамах;

m – маса наважки препарату, у грамах;

P – вміст ресвератролу в стандартному зразку , у відсотках;

В результаті проведених досліджень було виявлено, що кількісний вміст ресвератролу в досліджуваному препараті був на рівні 0,34%, що відповідає вимогам методів контролю якості (МКЯ) на даний препарат ($\pm 5\%$).

Також було проведено валідацію аналітичної методики відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) 2-ге видання, том 1, 5.3.N.2. «Валідація аналітичних методик і випробувань» [2].

Висновок. Розроблено методику кількісного визначення ресвератролу в гелі методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням. Було проведено валідацію розробленої методики відповідно до вимог ДФУ. В ході досліджень визначено, що вміст ресвертаролу в препараті відповідає вимогам МКЯ. Розроблена методика може використовуватися не тільки для кількісного визначення ресвератрола, але і для його ідентифікації.

Список літератури:

1. Зайченко Г. В. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. - 2017. - Вип. 4(1). - С. 21-30.
2. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с. ISBN 978-966-97390-0-1