

H.O. Yeromina, S.G. Isaev, N.Yu. Sheveliova, Z.G. Yeromina

Synthesis, structure and pharmacological activity of 6,9-diamino-2-ethoxyacridinium 6-nitro-n-phenylanthranilates

National University of Pharmacy

Introduction. A special place among acridine derivatives is occupied by substituted 9-aminoacridine and their salts with aromatic acids.

Materials and methods. Synthesis of the salts was carried out at the Department of Medicinal Chemistry of NPhaU. The biological screening was carried out at the Department of Microbiology, Virusology and Immunology of NPhaU.

Results. 9 salts were synthesized. The structure and individuality of the compounds were confirmed by IR-spectral, element and chromatographic analysis. It was established that the synthesized compounds had bacteriostatic, fungistatic, diuretic, anti-inflammatory and analgesic activities. According to the classification by K.K. Sydorov these salts belong to low toxic compounds.

Conclusion. The conducted research are indicative of the prospects of search for new biologically active compounds based on derivatives of anthranilic acid.

Key words: synthesis, 6,9-diamino-2-ethoxyacridinium, N-phenylanthranilic acid, pharmacological activity.

Відомості про авторів:

Єр'оміна Гана Олександрівна – магістр НФаУ.

Ісаєв Сергій Григорович – д.фарм.н., професор кафедри медичної хімії НФаУ. Адреса: Харків, вул. Блюхера, 4, тел.: (0572) 67-92-04.

Шевельова Наталія Юхимівна – к.біол.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології НФаУ.

Єр'оміна Зінаїда Григорівна – к.фарм.н., доцент кафедри медичної хімії НФаУ. Адреса: Харків, вул. Блюхера, 4, тел.: (0572) 67-92-04.

УДК 615.03;615.1/.3

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

О.А.Здорик, К.О.Хохлова, В.А.Георгіяни, Л.І.Вишневська

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАЗІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ, ЩО МІСТИТЬ НАСТОЙКИ НАГІДОК І АРНІКИ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Вступ. Актуальним завданням фармацевтичної практики, є проведення контролю якості лікарських засобів, виготовлених в аптечних умовах. Об'єктом дослідження була екстемпоральна мазь для лікування геморою, що містить рослинні субстанції – настойки нагідок і арніки.

Мета. Розробити і провалідувати методики ідентифікації діючих речовин мазі – флавоноїдів і календулозидів.

Матеріали і методи. Визначення було проведено методом тонкошарової хроматографії. У роботі було використано реактиви і стандартні зразки належної якості.

Результати. Встановлено оптимальні умови хроматографування, що забезпечують специфічне, робастність і прецизійність отриманих результатів. Для флавоноїдів обрані: рухома фаза – етилацетат Р – кислота мурашина безводна Р – кислота оцтова льодяна Р – вода очищена Р (100:11:11:27), проявник – розчин 10 г/л

аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р /розчин 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, нагрівання при 100-105 °С протягом 3-5 хв., детектування – в УФ-365 нм. Для календулозидів обрані: рухома фаза – хлороформ Р – кислота оцтова льодяна Р – метанол Р – вода очищена Р (35:16:6:4), проявник – розчин анісового альдегіду Р, нагрівання при 100-105 °С протягом 2-5 хв., детектування – при денному світлі.

Висновки. Методики можуть бути використані в методах контролю якості мазі для лікування геморою.

Ключові слова: мазь, екстемпоральне виготовлення, ідентифікація, ТШХ, рослинні субстанції.

ВСТУП

Поряд з лікарськими засобами (ЛЗ), що виробляє фармацевтична промисловість, свого споживача має і аптечне виробництво. Препарати, виготовлені в умовах аптеки, дають можливість раціонально комбінувати ЛЗ, що сприяє індивідуальному підходу до лікування пацієнта [3]. Актуальним питанням екстемпоральної рецептури є процедура контролю якості, яка включає розробку методів оцінки якості готового продукту – опис, ідентифікацію, випробування, кількісне визначення та ін. [2].

Об'єктом нашого дослідження була мазь для лікування геморою екстемпорального виробництва. Діючими речовинами мазі є рослинні субстанції – настойки нагідок (2 мл) і арніки (2 мл), допоміжні речовини – ланолін безводний (12,0 г) і вазелін (8,0 г).

Відомо, що оцінка якості рослинних субстанцій викликає значні труднощі, особливо коли до складу препарату входять декілька рослинних компонентів [6]. Тому **метою** цієї роботи була розробка методик ідентифікації мазі екстемпорального виготовлення для лікування геморою та їх валідація.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Мазь для лікування геморою, серія № 328, 329, 330 (апт. № 63, м. Куп'янськ, Україна). Ідентифікацію мазі проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [1]. При проведенні хроматографічного дослідження використовували стандартні зразки (СЗ): рутин ФСЗ ДФУ (сер. № 10808); кислота хлорогенова (Acros Organics, сер. № A0285833); гіперозид ФСЗ ДФУ (сер. № 271109); вітексин ФСЗ ДФУ (сер. № 150910), календулозиди ФСЗ ДФУ (сер. 1). ТШХ-пластинки: Silica gel 60 F254 (Merck, Germany), 1.05715, 25 TLC plates 20×20; Silica gel 60 F254 (Merck, Germany), 1.05642.0001, 50 HPTLC plates 20×10. Хроматографічна камера: Latch-LID Chromatotanks, USA (27×7×26); Сорбфіл, Росія (19×19,5×6,5). Мікрошприць: Hamilton Bonaduz AG, CH-7402 Switzerland, MB-29-11-1. УФ-лампа: Spectroline, CM-10; ENF-24 OC/FE, USA, Serial N 1783400. Хроматограми фотографували фотокамерою Apple iPhone 4.0. Реактиви готували відповідно до вимог ДФУ і використовували свіжоприготованими. У роботі використовували мірний посуд класу А [1].

Умови проведення хроматографічного аналізу. Випробовуваний розчин. 10,0 препарату поміщають у конічну колбу місткістю 50 мл, додають 10 мл етанолу 70 % і нагрівають на киплячій водяній бані при перемішуванні до розплавлення основи (3-5 хв). Суміш охолоджують на льодяній бані і відразу фільтрують через паперовий складчастий фільтр у конічну мірну колбу місткістю 50 мл. Екстракцію повторюють ще три рази з 10, 15 та 15 мл етанолу 70 % вищеописаним методом, знову фільтрують у ту ж мірну

колбу. Об'єм розчину доводять етанолом 70 % до мітки, омиваючи фільтр. Отриманий розчин випарюють до сухого залишку. Розчиняють сухий залишок в 1 мл етанолу 70 %.

Методика визначення флавоноїдів.

Розчин порівняння 1. 1 мг кислоти хлорогенової Р, 2,5 мг гіперозиду Р і 2,5 мг рутину Р, розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Розчин порівняння 2. Із 1 частини квіток нагідок із використанням етанолу 70 % одержують 10 частин готового продукту методом мацерації.

Розчин порівняння 3. Із 1 частини квіток арніки із використанням етанолу 70 % одержують 10 частин готового продукту методом мацерації.

Розчин порівняння 4. 2 мл настойки нагідок і 2 мл настойки арніки ретельно змішують. Використовують отриману суміш настоек.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (5-40 мкм), (або ВЕТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (2-10 мкм)).

Рухома фаза: етилацетат Р – кислота мурашина безводна Р – кислота оцтова льодяна Р – вода очищена Р (100:11:11:27).

Об'єм проб, що наносяться: 20 мкл (або 10 мкл) випробовуваного розчину та 10 мкл (або 2-5 мкл) розчинів порівняння, смугами.

Насичення хроматографічної камери: протягом 1 год (або 30 хв) з фільтрувальним папером.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см (або 6 см) від лінії старту.

Висушування: при температурі 100-105 °С протягом 3 хв.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрогелю 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у середній частині у порядку зростання R_f – жовтаво-коричнева флуоресціююча зона (рутин), блакитна флуоресціююча зона (кислота хлорогенова), жовтаво-коричнева флуоресціююча зона (гіперозид). На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися жовтаво-коричнева флуоресціююча зона слабкої інтенсивності на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння; нижче та безпосередньо вище неї мають виявлятися жовтаво-зелена флуоресціююча зона та блакитна флуоресціююча зона, що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; вище та нижче зони, що відповідає гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння, виявляються дві зони жовтаво-коричневої флуоресценції; у верхній частині має виявлятися блакитна флуоресціююча зона. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Методика визначення календулозидів.

Розчин порівняння. До 5.0 мг ФСЗ ДФУ календулозидів додають 5 мл метанолу Р, перемішують, витримують і використовують надосадову рідину.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (5-40 мкм), (або ВЕТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (2-10 мкм)).

Рухома фаза: хлороформ Р – кислота оцтова льодяна Р – метанол Р – вода очищена Р (35 : 16 : 6 : 4).

Об'єм проб, що наносяться: 20 мкл (або 7-10 мкл) випробовуваного розчину та 10 мкл (або 5-7 мкл) розчинів порівняння, смугами.

Насичення хроматографічної камери: протягом 1 год (або 30 хв) з фільтрувальним папером.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см (або 6 см) від лінії старту.

Висушування: на повітрі протягом 10 хв.

Виявлення: пластинку обприскують розчином анісового альдегіду Р, витримують протягом 10 хв (або 2-5 хв) в сушильній шафі при температурі 100-105 °С і переглядають при денному світлі.

Результати: на хроматограмі розчину порівняння у середній частині пластинки мають виявлятися дві основні чітко розділені зони синьо-фіолетового кольору (календулозиди). На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися не менше двох чітко розділених зон синьо-фіолетового кольору на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину порівняння (календулозиди); у нижній частині виявляються дві синьо-фіолетові зони. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Робота по розробці методик ідентифікації мазі екстемпорального виготовлення складалася з наступних етапів: обґрунтований вибір класів біологічно активних речовин (БАР) або індивідуальних речовин для ідентифікації мазі, що є специфічними для вихідної лікарської рослинної сировини (ЛРС) та здатні охарактеризувати мазь (активні маркери) [7]; вибір підходячого методу/ів ідентифікації; вибір стаціонарної фази; вибір рухомої фази; розробка пробопідготовки випробовуваного розчину та розчинів по-рівняння; вибір умов детектування.

При валідації методик ідентифікації за методом ТШХ нами були вивчені такі валідаційні характеристики як специфічність, робастність і прецизійність.

При визначенні робастності вивчали вплив різних факторів на хроматографічний результат: вплив типу пластинки; вплив насиченості камери; вплив об'єму нанесення; вплив проявника.

Специфічність вивчали у порівнянні зі стандартними зразками; у порівнянні з індивідуальними витягами вихідної ЛРС; у порівнянні з сумішшю індивідуальних витягів вихідної ЛРС.

Для ідентифікації мазі був проведений літературний пошук специфічних БАР для вихідної ЛРС (квіток нагідок і арніки) і їх рослинних препаратів (настойок нагідок і арніки), які здатні охарактеризувати мазь. За результатами проведеного аналізу для ідентифікації мазі були обрані такі класи сполук як флавоноїди і календулозиди. Флавоноїди є характерними для квіток нагідок і квіток арніки. Згідно з монографіями провідних фармакопей та спеціалізованих фармакогностичних видань, за цими речовинами ідентифікують квітки нагідок, квітки арніки, а також їх настойки [1, 5, 8, 12]. Календулозиди є специфічними речовинами для квіток нагідок, її настойки [1, 4, 10, 12]. Стандартні зразки флавоноїдів (рутин, гіперозид та ін.) та календулозидів (календулозиди А і В) є атестованими ДФУ.

Як метод ідентифікації був обраний метод ТШХ, який дає можливість специфічно визначити активні субстанції багатокomпонентної мазі [7].

Як стаціонарна фаза нами були використані ТШХ (5-40 мкм) і ВЕТШХ (2-10 мкм) пластинки на силікагелі, які дозволяють розділити складну суміш БАР, характерну для ЛРС, її рослинних препаратів і готового продукту. Для ТШХ і ВЕТШХ пластинок були підібрані необхідні об'єми нанесення випробовуваного розчину і розчинів порівняння, а також встановлений

оптимальний час насичення камер залежно від типу пластинок, що використовуються. Оптимальні умови наведені у методиках.

При виборі рухомої фази і відповідних умов детектування для ідентифікації флавоноїдів і календулозидів мазі, нами були відібрані рухомі фази і відповідні хімічні проявники, що застосовуються в хроматографічному аналізі БАР активних субстанцій мазі (нагідки і арніки) [1, 5, 8-12]. Проведений порівняльний аналіз результатів, отриманих при хроматографуванні за заданих умов, виявив краще розділення флавоноїдів мазі у рухомій фазі: етилацетат Р – кислота мурашина безводна Р – кислота оцтова льодяна Р – вода очищена Р (100:11:11:27), проявник – розчин 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р / розчин 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, нагрівання при 100-105 °С протягом 3-5 хв, детектування в УФ-365 нм; календулозидів у рухомій фазі: хлороформ Р – кислота оцтова льодяна Р – метанол Р – вода очищена Р (35:16:6:4), проявник – розчин анісового альдегіду Р, нагрівання при 100-105 °С протягом 10 хв (або 2-5 хв), детектування при денному світлі.

Оптимальна пробопідготовка випробовуваного розчину мазі та розчинів порівняння наведені у методиках.

Проведені хроматографічні дослідження виявили перехід відповідних флавоноїдів і календулозидів з вихідної сировини до відповідної рослинних препаратів і в готовий продукт, що доводить можливість використання цих класів БАР для ідентифікації мазі та забезпечує специфічність ідентифікації мазі (рис. 1, рис. 2).

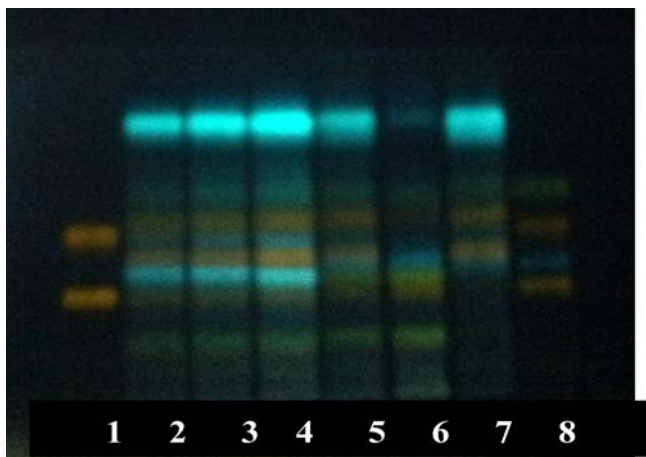


Рис. 1. Специфічність визначення флавоноїдів мазі

Примітка: ВЕТШХ-пластинка, відстань для хроматографування – 6 см. Рухома фаза: етилацетат Р – кислота мурашина безводна Р – кислота оцтова льодяна Р – вода очищена Р (100:11:11:27), УФ-365 нм після проявлення розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р і розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі: 1 – розчин порівняння: рутин і гіперозид, у порядку зростання R_f , 2 мкл; 2-4 – випробовуваний розчин мазі, 5 мкл; 7 мкл; 10 мкл відповідно; 5 – суміш настоек нагідок і арніки, 5 мкл; 6 – настойка нагідок, 5 мкл; 7 – настойка арніки, 5 мкл; 8 – розчин порівняння: рутин, кислота хлорогенова, гіперозид, вітексин, у порядку зростання R_f , 4 мкл.

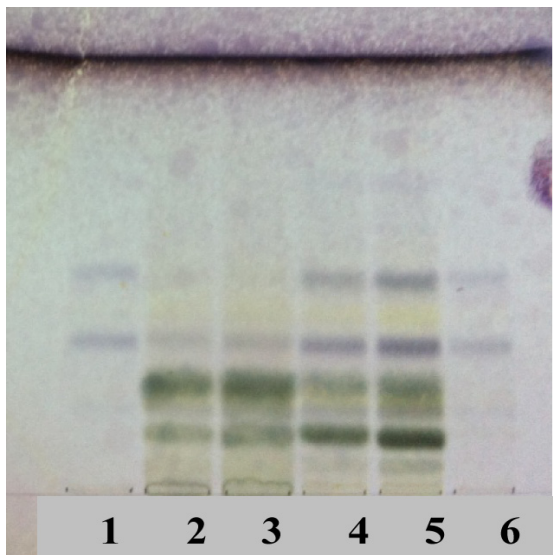


Рис. 2. Специфічність визначення календулозидів мазі

Примітка: ВЕТШХ-пластинка, відстань для хроматографування – 6 см. Рухома фаза: хлороформ Р – кислота оцтова льодяна Р – метанол Р – вода очищена Р, денне світло, після проявлення розчином анісового альдегіду Р: 1, 6 – розчин порівняння: календулозиди, 5 мкл і 7 мкл відповідно; 2, 3– випробовуваний розчин мазі, 7 мкл; 4 – суміш настоек нагідок і арніки, 5 мкл; 5 – настойка нагідок, 5 мкл.

ВИСНОВКИ

Розроблені методики ідентифікації флавоноїдів і календулозидів мазі методом тонкошарової хроматографії. Визначені оптимальні умови проведення хроматографування, які забезпечують специфічне визначення, отримання робасних і прецизійних результатів. Методики можуть бути використані в МКЯ мазі для лікування геморою екстемпорального виготовлення.

Література

1. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., доп. 2. – Х. : ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.; доп. 4. – Х. : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.

2. Наказ МОЗ України від 17.10.2012 р. № 812 «Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) та контролю якості лікарських засобів в аптеках» [Електронний ресурс] – Режим доступу до сайту: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/z1846-12>

3. Хохлова К.О. Огляд екстемпоральних прописів, що містять лікарську рослинну сировину / К.О. Хохлова, Л.І. Вишневська, Здорик О.А. // Матеріали І Міжнар. наук.-практ. internet-конф. [Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин], 20-21 бер. 2014 р. – Х. - 2014. – С. 264.

4. Barnes J. Herbal Medicines / Barnes J., Anderson L., Phillipson D. – 3-rd ed. – London: PhP, 2007. – 710 p.

5. British Herbal Pharmacopoeia. – London : British Herbal Medicine Association, 1996. – 212 p.

6. European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products. Guideline on Quality of Combinational Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products (EMA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006). July 2007. [Електронний ресурс] – Режим доступу до сайту: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003298.pdf. Accessed January 23, 2014.

7. European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products. Reflection paper on Stability Testing of Herbal Medicinal Products and Traditional Herbal Medicinal Products (EMA/HMPC/3626/2009). October 21, 2010. [Електронний ресурс] – Режим доступу до сайту: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/11/WC500098816.pdf. Accessed January 22, 2014.

8. European Pharmacopoeia. – 6 th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – 3261 p.

9. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis / ed. by M. Witchl. – London: Stuttgart, 1994. – 566 p.

10. Method for TLC-identification test for ointment with herbal tinctures / Zdoryk O.A., Khokhlova K.O., Savchenko L.P., Georgiyants V.A. // The 17-th International Congress Phytopharm 2013, Vienna, Austria, 8-10 July 2013. – 2013. – P. 51.

11. Reich E. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants / E. Reich, A. Schibli. – New-York: Thieme, 2007. – 264 p.

12. Wagner H. S. Plant drug analysis / H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski. – Berlin, Springer-Verlag, 1984. – 320 p.

А.А.Здорик, Е.А.Хохлова, В.А.Георгиянц, Л.И.Вишневская

Разработка методик идентификации мази аптечного изготовления, которая содержит настойки календулы и арники

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Вступление. Актуальным заданием фармацевтической практики, является проведение контроля качества лекарственных средств, изготовленных в аптечных условиях. Объектом исследования была экстенпоральная мазь для лечения геммороя, содержащая растительные субстанции – настойки календулы и арники.

Цель. Разработать и провалидировать методики идентификации действующих веществ мази – флавоноидов и календулозидов.

Материалы и методы. Определение проведено методом тонкослойной хроматографии. В работе использованы реактивы и стандартные образцы надлежащего качества.

Результаты. Определены оптимальные условия хроматографирования, обеспечивающие специфичность, робастность и прецизионность полученных результатов. Для флавоноидов выбраны: подвижная фаза – этилацетат Р – кислота муравьиная безводная Р – кислота уксусная ледяная Р – вода очищенная Р (100:11:11:27), проявитель – раствор 10 г/л аминоэтилового эфира дифенилбоной кислоты Р в метаноле Р / раствор 50 г/л макрогола 400 Р в метаноле Р, нагревание при 100-105 °С в течении 3-5 мин, детектирование – УФ-365 нм. Для календулозидов выбраны: подвижная фаза – хлороформ Р – кислота уксусная ледяная Р – метанол

P – вода очищена P (35:16:6:4), проявитель – раствор анисового альдегида P, нагрівання при 100-105 °C в теченні 2-5 мин, детектирование – при деневном свете.

Выводы. Методики можуть бути використані в методах контролю качества мази для лечения геморроя.

Ключевые слова: мазь, екстемпоральное изготовление, идентификация, ТСХ, растительные субстанции.

O. Zdoryk, K. Khokhlova, V. Georgiiants, L. Vyshnevs'ka

Development of identification methods of compounding preparation ointment with marigold and arnica tinctures

National University of Pharmacy, Kharkiv

Introduction. The actual task of pharmacy practice is the conduction of quality control of medicinal products, which were prepared in the pharmacy condition. The object of investigation was compounding preparation ointment for treatment of haemorrhoids with herbal substances – Marigold and Arnica tinctures.

The aim. To develop and validate identification methods of ointment active substances – flavonoids and calendulosides.

Materials and methods. The analysis was conducted by thin-layer chromatography. All reagents and standards used in the study were analytical reagent grade.

Results. The optimal conditions of chromatography which provide specific, robust and precision identifications were determined. The mobile phase – Ethyl acetate; anhydrous formic acid; glacial acetic acid; water (100:11:11:27), derivatization reagent – Natural Products / PEG Spraying Solution, heating at 100-105 C for 3-5 min, examination under UV 365 nm were selected for flavonoids.. The mobile phase – chloroform-glacial acetic acid; methanol water (35:16:6:4), derivatization reagent – Anisaldehyde-sulfuric Acid Spraying Solution, heating at 100-105 C for 2-5 min, examination in white light were selected for calendulosides.

Conclusion. The methods can be used in the quality control of ointment for treatment of haemorrhoids.

Key words: ointment, compounding formulation, identification, TLC (thin-layer chromatography), herbal substances.

Відомості про авторів:

Здорик Олександр Анатолійович – к. фарм. н., доцент кафедри фармацевтичної хімії НФаУ. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53.

Хохлова Катерина Олександрівна – к. фарм. н., асистент кафедри аптечної технології ліків ім. Д.П.Сала НФаУ.

Георгіянц Вікторія Акіопівна – д. фарм. н., професор, зав. кафедри фармацевтичної хімії НФаУ.

Вишневська Лілія Іванівна – д. фарм. н., професор, зав. кафедри аптечної технології ліків ім. Д.П.Сала НФаУ. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53.