

Рекомендована д.ф.н., професором Д.І.Дмитрієвським

УДК 615.07:615.454.1:582.736-035.85

СТАНДАРТИЗАЦІЯ МАЗІ “ДЕРМАЛІК”

О.А.Гаркавцева, Т.Г.Ярних, В.М.Чушенко

Національний фармацевтичний університет

Проведені дослідження зі стандартизації мазі “Дермалік”: розроблено методику кількісного визначення гліциризинової кислоти у препараті методом екстракційної спектрофотометрії у переважанні на гліцирам і методом ідентифікації гліциризинової кислоти та ефірних олій методами ТШХ і ГРХ відповідно. За результатами досліджень розроблено проект АНД на мазь “Дермалік”.

Протягом останніх років запропоновано чимало нових лікарських засобів для зовнішньої терапії хронічних запальних захворювань шкіри, провідне місце серед яких займають мазі з глюкокортикоістeroїдами (ГКС) [9, 10, 11].

Проте відношення до місцевого застосування гормональних препаратів є неоднозначним. З одного боку, мазі з ГКС чинять виражену протизапальну та протиалергічну дію, з іншого — їх застосування нерідко призводить до розвитку небажаних побічних ефектів, таких як атрофія шкіри, утворення телеангіектазій, стриж та ін. [7, 11, 13].

З метою підвищення ефективності лікування хронічних алергічних захворювань шкіри нами була розроблена мазь під умовою назвою “Дермалік” на основі природної сировини.

У ході виконання фармакологічних досліджень було встановлено, що дана мазь має протизапальну активність на рівні з гормональним препаратом — маззю “Преднікарб” і протиалергічні властивості, які навіть у декілька разів перевищують аналогічні препарату порівняння.

Проведення мікробіологічних досліджень показало наявність вираженої антибактеріальної та протигрибкової дії розробленого препарату, що є дуже важливим для профілактики вторинної інфікованості уражених ділянок шкіри.

Метою даної роботи стала розробка методик кількісного та якісного аналізу діючих речовин мазі “Дермалік”.

Експериментальна частина

Наявність протиалергічних і протизапальних властивостей розробленої мазі забезпечує гліциризинова кислота (ГК). Згідно з даними літературних джерел [1, 3, 5] для ідентифікації ГК використовують осадову реакцію з кислотою сірчаною з

наступним розчиненням осаду у розчині аміаку та методи тонкошарової хроматографії (ТШХ). Методики кількісного визначення ГК поділяються на декілька груп [3, 5, 8]:

- визначення за ГК;
- визначення за вуглеводною частиною ГК;
- визначення за гліциритиновою кислотою.

У свою чергу кількісне визначення за ГК можна проводити гравіметричним, титриметричним, хроматографічним та спектрофотометричним методами. Найбільш часто використовується екстракційно-спектрофотометричний метод, який на ведено у Державній фармакопеї СРСР Х видання [1].

Дослідженнями Муравйова та Пономарьова були уточнені умови екстракції ГК та встановлено, що більш точні та відтворювані результати досягаються при використанні у якості розчинника 3% ацетонового розчину кислоти азотної [5]. Ця методика знайшла підтвердження і була включена на корені солодки до Державної фармакопеї України, 2 доповнення, с. 548 [2].

До визначення за вуглеводною частиною ГК відносяться:

- метод Еріксона, заснований на окисленні вуглеводної частини ГК реактивом Фелінга при нагріванні та гравіметричному визначені оксису міді;
- метод Едера та Зака, заснований на здатності кислоти глікуронової при нагріванні з 12,5% кислоти хлористоводневої давати фурфурол;
- кольорова реакція вуглеводної частини ГК з нафторезорцином.

Метод Онрюста (полярографічне визначення) та метод Бріескорн і Маран (колориметричне визначення) відносяться до методів кількісного визначення ГК за гліциритиновою кислотою [5].

Окрім вищевказаних методів для кількісного визначення ГК застосовується високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [4].

Необхідно зазначити, що більшість цих методів потребує певного обладнання або ж є складною у виконанні, що не робить їх широко розповсюдженими.

Вивчивши існуючі методики кількісного визначення та ідентифікації ГК для її визначення в мазі “Дермалік”, ми обрали екстракційно-спект-

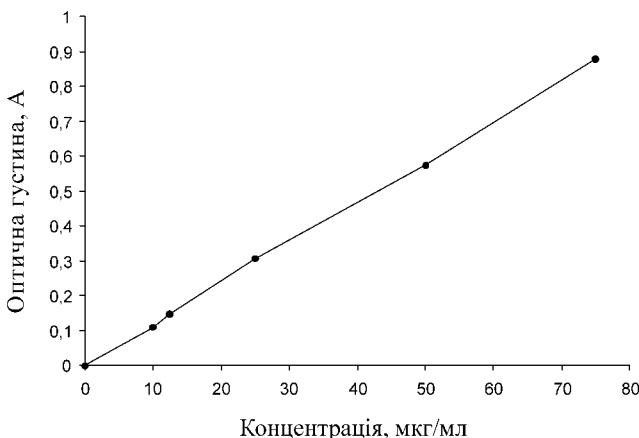


Рис. 1. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації гліцираму.

трофотометричний метод [2] та метод ТШХ. Застосування осадової реакції для ідентифікації ГК неможливе через багатокомпонентність досліджуваної лікарської форми.

Перед кількісним визначенням та ідентифікацією ГК нами були проведені дослідження з вибору оптимальних умов її екстракції з мазі, а саме: виду розчинника, його кількості, часу екстракції. В якості розчинників було обрано для видалення гідрофобної частини мазі 96% спирт етиловий, для екстракції ГК — 3% ацетоновий розчин кислоти азотної, визначені їх кількості та час екстракції. Повноту екстракції контролювали спектрофотометричним методом, який представляє собою екстракційне виділення ГК із мазі, утворення її амонійної солі і вимірювання оптичної густини даного розчину за довжини хвилі (258 ± 2) нм.

З якості стандарту для визначення ГК даним методом було використано гліцирам, так як ГК — речовина нестабільна, що перешкоджає застосуванню даної сполуки як стандартного зразка [3, 5].

Паралельно зі спектрофотометричним визначенням ГК у мазі було проведено її ідентифікацію методом ТШХ.

За літературними даними [3, 5, 8, 12] для проведення ідентифікації ГК методом ТШХ використовуються пластиинки різних марок та наступні системи розчинників: хлороформ — метанол — вода (26:14:3) і бутанол — спирт етиловий 96% — 1 М розчин аміаку (6:3:3).

Як зовнішню стандартну речовину, відносно якої проводилася оцінка положення плям на хроматограмі, використано гліцирам.

Експериментально були проведені дослідження з ідентифікації гліцираму у вищевказаних системах, на підставі досліджень для подальшої роботи обрана система хлороформ — метанол — вода (26:14:3). Проведені дослідження було покладено в основу методики ідентифікації ГК у мазі “Дермалік”.

Діючими речовинами мазі “Дермалік”, які забезпечують наявність антибактеріальної дії пре-

парату та виступають у якості антимікробних консервантів, є ефірні олії ромашки блакитної та чайного дерева.

Згідно з даними літературних джерел [6, 8, 12] єдиним методом ідентифікації таких малих кількостей ефірних олій є газорідинна хроматографія (ГРХ). У якості стандартного зразка для визначення ефірної олії ромашки застосовували хамазулен, для ефірної олії чайного дерева — терпен-4-ол.

У якості екстрагенту ефірних олій із мазі нами було використано циклогексан. Умови хроматографування були підібрані експериментально та покладені в основу методики їх ідентифікації.

Результати та їх обговорення

Гліцирам має максимум поглинання при довжині хвилі (258 ± 2) нм. Підпорядкування основному закону світлопоглинання відбувається в межах концентрацій гліцираму 10–60 мкг/мл (рис. 1).

Наявність піків поглинання витяжки мазі та гліцираму з максимумами поглинання спостерігається за однакової довжини хвилі — (258 ± 2) нм (рис. 2). Оптичні густини обох розчинів підібрані нами, виходячи з їх початкових концентрацій.

Проведені дослідження були покладені в основу методики кількісного визначення ГК у перерахунку на гліцирам.

Точну наважку мазі (10,0 г) вміщують у конічну колбу місткістю 250 мл, додають 20 мл 96% спирту Р та інтенсивно перемішують протягом 15 хв. Отриманий розчин фільтрують крізь фільтр “синя стрічка”, попередньо промитий 96% спиртом Р, у колбу місткістю 150 мл, після чого у колбу ще тричі вносять по 20 мл 96% спирту Р, збовтують протягом 10 хв і фільтрують у ту ж саму колбу.

Осад з фільтру кількісно переносять у колбу місткістю 150 мл, додають 25 мл 3% ацетонового розчину кислоти азотної, перемішують протягом 10 хв.

Отриманий розчин фільтрують крізь фільтр “синя стрічка”, колбу промивають 10 мл 3% ацетонового розчину кислоти азотної, фільтруючи крізь той же фільтр (розчин А).

До розчину А додають краплями аміаку розчин концентрований до pH від 8,3 до 8,8 за універсальним індикатором (розчин з осадом амонійної солі гліциризинової кислоти).

Розчин з осадом амонійної солі гліциризинової кислоти переносять на скляний фільтр №4, рідину відсмоктують за допомогою вакууму. Осад на фільтрі промивають по 10 мл ацетону Р у три прийоми.

Осад кількісно переносять за допомогою води Р у мірну колбу місткістю 10 мл, доводять об'єм розчину водою Р до мітки і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробуваного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 258 нм у кюветі з товщиною шару 1 см, використовуючи у якості розчину порівняння воду Р.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину Б гліцираму у тих же умовах.

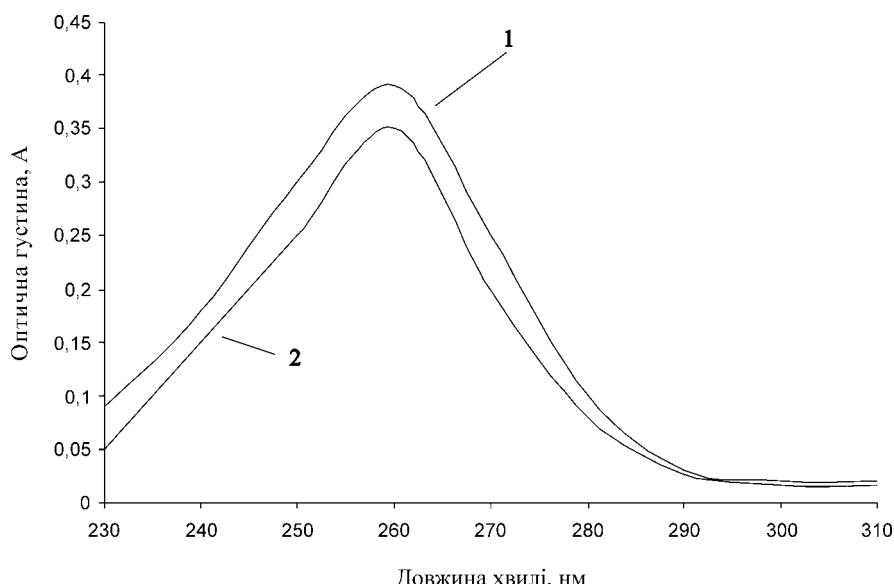


Рис. 2. Спектр поглинання: гліцираму — 1 та витяжки мазі “Дермалік” — 2.

Вміст ГК (X) в 1,0 г мазі у перерахунку на гліцирам розраховують за формулою:

$$X = \frac{A_0 \cdot 10}{m_n \cdot 135,4},$$

де: A_0 — оптична густина випробуваного розчину; m_n — маса наважки мазі, г; 135,4 — питомий показник поглинання гліцираму при довжині хвилі 258 нм.

Розрахунок вмісту ГК в 1,0 г мазі проводили методом стандарту, використовуючи стандартний зразок гліцираму. Вміст ГК в 1,0 г мазі повинен бути не менше 0,0028 г у перерахунку на гліцирам.

За розробленою методикою було проаналізовано шість зразків мазі, результати представлені у табл. 1.

Нижче наведені метрологічні характеристики визначення ГК в 1,0 г мазі у перерахунку на гліцирам (табл. 2).

Паралельно із спектрофотометричним визначенням ГК у мазі була розроблена методика її ідентифікації: біля 1,0 г мазі (з точністю до 0,01 г)

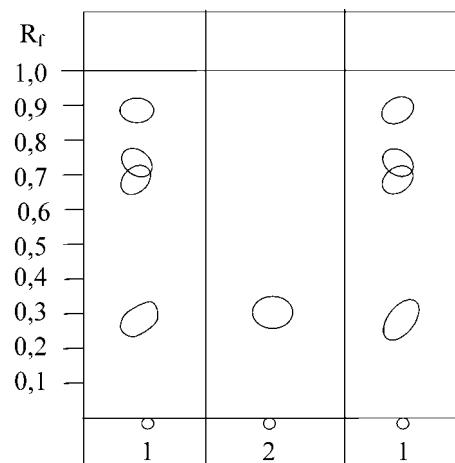


Рис. 3. Схема тонкошарової хроматограми мазі “Дермалік”; 1 — витяжка мазі, 2 — стандарт — гліцирам.

обробляли згідно з методикою кількісного визначення. На лінію старту пластинки Silica Gel (фірма “MERCK”, Німеччина) із товщиною шару 0,25 мм мікропіпеткою наносили 0,01 мл витяжки мазі та 0,02 мл (20 мкг) 0,1% розчину стандарту гліцираму. Пластинку з нанесеними пробами хроматографували висхідним способом у камері, яку попередньо насичували не менше 24 год сумішшю розчинників хлороформ — метанол — вода (26:14:3).

Коли фронт розчинників пройшов біля 9 см, пластинку виймали з камери, висушували протягом 5 хв та роздивлялись у видимому світлі та УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм. На хромато-

Таблиця 1

Результати визначення кількісного вмісту ГК у 1,0 г мазі “Дермалік”

Номер серії препарату	Кількісний вміст ГК у перерахунку на гліцирам (визначений екстракційною СФ), г
011207	0,0041
010308	0,0038
020708	0,0039
031008	0,0040
041108	0,0037
010209	0,0038

Таблиця 2

Метрологічні характеристики визначення кількісного вмісту ГК у 1,0 г мазі “Дермалік”

X	\bar{X}	f	S	P, %	t (P, f)	$\Delta X, \%$
0,0041						
0,0038						
0,0039						
0,0040						
0,0037						
0,0038	0,00387	5	$1,87 \cdot 10^{-8}$	95	2,57	3,71

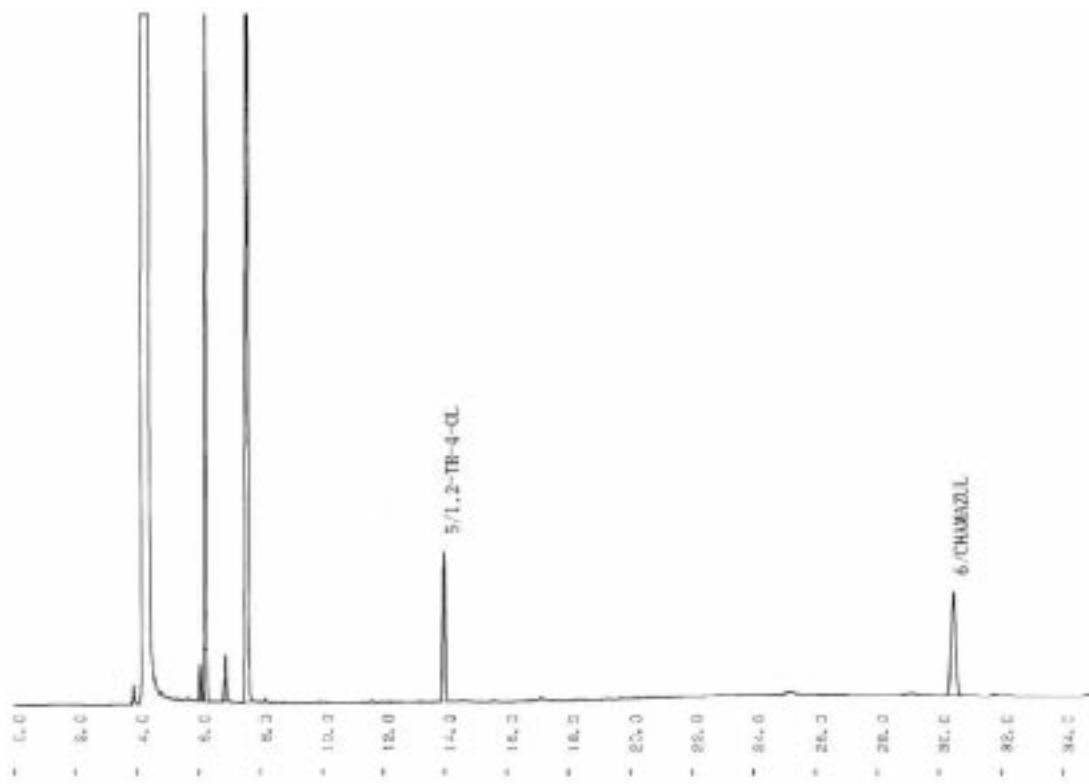


Рис. 4. Газорідинна хроматограма мазі “Дермалік”.

грамі на рівні стандарту гліцираму визначається жовта пляма з величиною R_f біля 0,3 (рис. 3).

Допускається наявність інших плям.

З метою ідентифікації ефірних олій 10,0 г мазі вміщують у круглодонну скляну колбу з короткою шийкою зі шліфованого скла місткістю 500 мл (частина приладу для визначення ефірних олій) та додають 300 мл 1% розчину натрію хлориду. У трубку з поділками вміщують таку кількість циклогексану P , щоб верхній шар знаходився у нижній частині верхнього розширення цієї трубки, та проводять відгонку протягом 2 год. Потім за допомогою триходового крану зливають водний шар, який відбраковують, а шар циклогексану фільтрують крізь паперовий фільтр з 0,1 г натрію сульфату безводного P у мірну колбу місткістю 10 мл. Об’єм розчину доводять до мітки циклогексаном P і перемішують.

1 мкл досліджуваного розчину хроматографують на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором у наступних умовах:

- колонка капілярна кварцова, розміром 50 м \times 0,25 мм з нерухомою фазою FFAP, товщина шару 0,33 мкм;
- температуру колонки програмують: 60°C витримують протягом 5 хв, потім температуру підвищують зі швидкістю 4°C/хв до температури 220°C і витримують протягом 10 хв;

- температура блока вводу зразка — 240°C;
- температура детектора — 260°C;
- швидкість газу-носія (гелій P) — 1,2 мл/хв;
- поділ потоку — 1 : 60.

Поперемінно хроматографували по 1 мкл досліджуваного розчину та розчину порівняння на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором в обраних умовах, одержуючи не менше п’яти хроматограм кожного розчину.

Порядок виходу піків на хроматограмі має бути: терпен-4-ол, хамазулен.

На хроматограмі досліджуваного розчину мають бути присутніми основні піки, часи утримання яких повинні співпадати з часами утримання піків терпен-4-олу і хамазулену на хроматограмі розчину порівняння.

Результати цих досліджень наведені на рис. 4.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику кількісного визначення ГК у мазі “Дермалік” методом екстракційної спектрофотометрії у перерахунку на гліцирам.

2. Розроблено методики ідентифікації ГК та ефірних олій у складі препарату методами ТШХ і ГРХ відповідно.

3. За результатами досліджень розроблено проект АНД на мазь “Дермалік”.

ЛІТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. — X изд. — М.: Медицина, 1968. — С. 285.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Х.: PIPEG, Доп. 2. — 2008. — 620 с.

3. Егоров М.В., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Быков В.А. // Фармация. — 2005. — №1. — С. 9-12.
4. Землянская Н.Р., Адилова З.А., Орлова Е.Я. и др. // Farmatsevtika jurnali. — 2005. — №1. — С. 24-26.
5. Муравьев И.А., Пономарев В.Д. // Вопросы изучения и использования солодки в СССР / АН СССР. — Л.: Наука, 1966. — 214 с.
6. Сур С.В., Диудух И.Р., Герасимчук Т.В. // Фармац. журн. — 2001. — №1. — С. 90-94.
7. Ярных Т.Г., Хохленкова Н.В., Горова О.А. // Клінічна фармація. — 2007. — Т. 11, №4. — С. 14-18.
8. European Pharmacopeia. — 4-th ed. — Consil of Europe: Strasbourg, 2000. — 2570 p.
9. Rackal J.M., Vender R.B. // Skin Therapy Lett. — 2004. — Vol. 9, №2. — P. 15-21.
10. Rudikoff D. // US Dermatol. Rev. — 2006. — №1. — P. 26-29.
11. Sharma A.D. // Ind. J. Dermatol., Venerol., Leprol. — 2005. — Vol. 71, №2. — P. 96-98.
12. USP Pharmacists' Pharmacopeia. — 2-nd Ed. — Rockville. The United State Pharmacopeial, Inc., 2008. — 1519 p.
13. Wanitphakdeedecha R., Tuchinda P., Sivayathorn A. // Ind. J. Dermatol. — 2007. — №52. — P. 83-88.

УДК 615.07:615.454.1:582.736-035.85

СТАНДАРТИЗАЦИЯ МАЗИ “ДЕРМАЛИК”

О.А.Гаркавцева, Т.Г.Ярных, В.Н.Чушенко

Проведены исследования по стандартизации мази “Дермалик”: разработана методика количественного определения глициризиновой кислоты в препарате методом экстракционной спектрофотометрии в пересчете на глицирам и методики идентификации глициризиновой кислоты и эфирных масел методами ТСХ и ГЖХ соответственно. По результатам исследований разработан проект АНД на мазь “Дермалик”.

UDC 615.07:615.454.1:582.736-035.85

STANDARDIZATION OF “DERMALIK OINTMENT”

O.A.Garkavtseva, T.G.Yarnykh, V.N.Chushenko

The research on standardization of “Dermalik ointment ” has been conducted: the method of the quantitative determination of glycyrrhizinic acid in the medicine has been developed by the method of extraction spectrophotometry calculated by glycyrrham, as well as methods for identification of glycyrrhizinic acid and essential oils with the help of HLC and GLC. According to the research results the project of the analytical and normative documentation of “Dermalik ointment ” has been developed.