

Рекомендована д.ф.н., професором Є.В.Гладухом

УДК 615.3.07:[582.998.16+547.461.4]:615.07

РОЗРОБКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦІЇ ПРЕПАРАТУ, ЩО МІСТИТЬ БУРШТИНОВУ КИСЛОТУ ТА ЕКСТРАКТ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ

I.Є.Цокало, О.І.Зайцев

Національний фармацевтичний університет

Розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин: бурштинової кислоти та екстракту ехінацеї пурпурової сухого, що прийняті для стандартизації препарату у промисловому виробництві. Проведено валідацію розроблених методик. Доведено вірогідність результатів.

Профілактика та лікування наслідків стресу, у тому числі синдрому хронічної втоми та неспецифічного адаптаційного синдрому, є однією з актуальних медичних і соціальних проблем [4, 6].

Найчастіше при синдромі хронічної втоми, неспецифічному адаптаційному синдромі та інших наслідках стресу застосовують адаптаційні препарати, які підвищують захисні сили та опірність інфекціям, прискорюють поновлення функціональних резервів організму. Тому існує значна потреба в лікарських препаратах з подібною фармакологічною активністю [8, 9].

Нами було розроблено оригінальний препарат-адаптоген, до складу якого входить бурштинова кислота у кількості 0,1 г та екстракт ехінацеї пурпурової сухий у кількості 0,2 г. У зв'язку з цим необхідно було розробити методики, які б дозволили встановити наявність бурштинової кислоти та екстракту ехінацеї пурпурової, та визначити їх кількість з певною вірогідністю відповідно до вимог Державної фармакопеї України [1, 2]. Це й стало метою нашої роботи.

Для підтвердження наявності екстракту ехінацеї пурпурової були обрані класи речовин, що відповідають за фармакологічну активність та екстрагуються у спирто-водні та водні суміші, такі як полісахариди класу фруктозанів та гідроксикоричні кислоти, представлені похідними кавової кислоти — цикорієвою та хлорогеновою кислотами [10].

Полісахариди класу фруктозанів ідентифікували за допомогою кольорової реакції, а гідроксикоричні кислоти — методом тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Бурштинову кислоту ідентифікували методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)

[5] за співпаданням часу утримування на хроматограмах випробованого розчину та розчину порівняння. Ідентифікацію бурштинової кислоти проводили разом з її кількісним визначенням.

Кількісне визначення екстракту ехінацеї пурпурової проводили за вмістом гідроксикоричніх кислот.

Експериментальна частина

Досліджувався розроблений препарат, виготовлений у лабораторних умовах із сировини, що відповідає вимогам ДФУ. У роботі використовувалась бурштинова кислота 99,8% марки ХЧ (виробник “Китай”) та екстракт ехінацеї пурпурової сухий (фірма “Frutarom”, Швейцарія).

Ідентифікацію гідроксикоричніх кислот проводили, використовуючи метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) [7].

З порошку розтертого препарату проводили екстракцію 50% спиртом при нагріванні на водяній бані із зворотним холодильником. Одержану витяжку охолоджували та фільтрували через складчастий паперовий фільтр “червона стрічка”. Операцію витягання повторювали ще один раз.

Одержаній розчин випаровували до видалення спирту, охолоджували до кімнатної температури і фільтрували. З одержаного фільтрату проводили екстракцію етилацетатом та концентрували випарюванням. Далі на лінію старту хроматографічної пластинки із шаром силікагелю F254 товщиною 0,2 мм і розміром часток 60 мкм на алюмінієвій підкладці наносили отриманий розчин. Елюювання проводили сумішшю розчинників хлороформ Р — кислота оцтова льодяна Р — метанол Р — вода Р (15:8:3:2) висхідним способом. Гідроксикоричні кислоти ідентифікували за їх властивістю флуоресценції в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі випробованого розчину у діапазоні величин R_f від 0,2 до 0,8 мають виявлятися не менше трьох зон з блакитною флуоресценцією.

Визначення фруктозанів проводили за їх здатністю утворювати кольорові комплекси у кислому середовищі з резорцином. Попередньо полісаха-

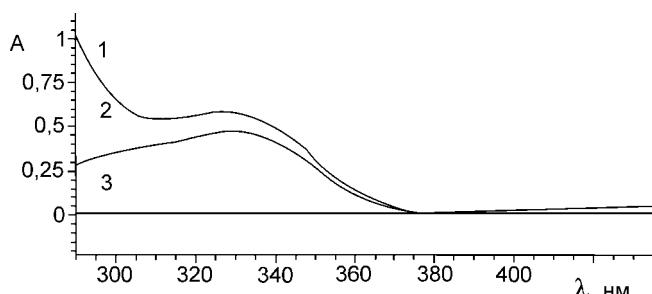


Рис. 1. Спектри поглинання: 1 — випробуваного розчину; 2 — розчину хлорогенової кислоти; 3 — розчину плацебо.

риди висаджували із спирто-водного екстракту, отриманого, як вказано вище, при проведенні екстракції гідроксикоричних кислот 96% спиртом. Суміш центрифугували, а осад промивали ацетоном, підсушували на водяній бані до зникнення запаху ацетону і розчиняли у гарячій воді. До одержаного розчину додавали розчин резорцину спиртовий, розчин кислоти хлористоводневої концентрованої і перемішували. При нагріванні на водяній бані протягом 20 хв при температурі від 78°C до 82°C розчин поступово забарвлюється у червоний колір.

Кількісний вміст екстракту ехінацеї пурпурової розраховували за вмістом гідроксикоричних кислот. Визначення проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ і видимих областях, використовуючи характерну для них смугу поглинання за довжини хвилі 328 нм. Розрахунок проводили за питомим показником поглинання кислоти хлорогенової при довжині хвилі 328 нм, який становить 520. Випробовуваний розчин готовували наступним чином. Із наважки порошку розтертих таблеток проводили екстракцію 50% спиртом при нагріванні на водяній бані зі зворотним холодильником. Одержану витяжку фільтрували через складчастий паперовий фільтр “червона стрічка”. Проводили розведення та вимірювали оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі

при довжині хвилі 328 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Отриманий спектр поглинання наведено на рис. 1.

Вміст суми гідроксикоричних кислот у препараті у перерахунку на кислоту хлорогенову має бути не менше 0,005 г. Нормування зумовлено її вмістом у екстракті сухому.

Визначення вмісту бурштинової кислоти проводили методом рідинної хроматографії. У якості рухомої фази використовували фосфатний буферний розчин із pH 2,8.

Для приготування випробуваного розчину проводили водну екстракцію із порошку розтертого препарату та центрифугували для видалення компонентів основи. Далі пробу пропускали крізь 1 г сорбенту С 18 і, таким чином, відокремлювали кислоту бурштинову від інших компонентів.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі (фірми “Shimadzu LS 20”) з УФ-детектором за таких умов:

- колонка розміром 0,10 м×4,0 мм LiChrosorb RP-sel B (spher.), з розміром часток 5 мкм або аналогічна;
- швидкість рухомої фази — 1,0 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі — 205 нм;
- температура колонки — 30°C.

Розрахунок проводили методом стандарту.

Вміст C₄H₆O₄ (бурштинової кислоти) у препараті має бути від 0,095 г до 0,105 г.

Отримані хроматограми випробуваного розчину та розчину порівняння представлена на рис. 2.

Результати та їх обговорення

Методики якісного аналізу були провалідовані за характеристикою специфічності.

Специфічність методики ідентифікації гідроксикоричних кислот методом ТШХ підтверджується тим, що хроматограми випробуваного розчину та розчину екстракту ехінацеї пурпурової за положенням та кольором плям співпадають, отримані плями добре розділяються. Okрім того, ідентифіковані кавова та хлорогенова кислоти.

Методики кількісного визначення були провалідовані за наступними характеристиками: специфічність, правильність, прецизійність та лінійність [2, 3].

Для методики визначення вмісту суми гідроксикоричних кислот специфічність підтверджено співпаданням максимуму поглинання випробуваного розчину та розчину кислоти хлорогенової та незначністю поглинання плацебо у порівнянні з поглинанням речовин, що визначались ($\max \delta = 1,02\%$). Поглинання плацебо складає: дшум = $0,36 \leq 1,02$.

Враховуючи те, що визначається не індивідуальна сполука, а її суміш і вимоги встановлюються лише для мінімального вмісту, правильність та прецизійність не підтверджувались. Вірогідність отриманих результатів підтверджено лінійністю (рис. 3, табл. 1).

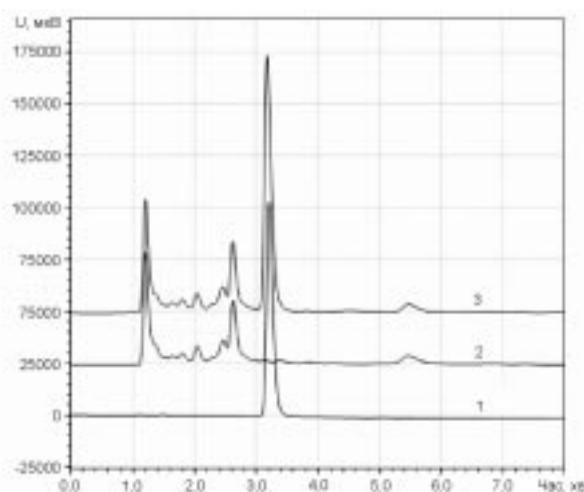


Рис. 2. Хроматограми [знизу-вверх] розчину порівняння бурштинової кислоти 1, плацебо 2 та випробуваного розчину 3.

Таблиця 1

Метрологічні характеристики лінійної залежності поглинання від концентрації хлорогенової кислоти

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Заключення
B	0,0520			
S _B	0,0005			
A	-0,00029	$\leq 1,895 \times S_a = -0,0093 $	$\leq 5,1 $	вітримуються за 1 критерієм
S _A	0,0049			
RSD ₀	0,0049			
RSD _{0/B}	0,0933	$\leq 1,69 $		вітримуються
R	0,9998	$> 0,99236 $		вітримуються

Таблиця 2

Метрологічні характеристики результатів аналізу модельних сумішей препарату

Метрологічні характеристики	Значення
Відносне стандартне відхилення, s_z , %	0,2829
Відносний довірчий інтервал Δ , % = $t(95\%, 8) \times s_z = 2,3060 \times s_z$	0,6523
Критичне значення для збіжності результатів Δ , %	3,2
Систематична похибка $\delta = Z_{cp} - 100 $	1,25
Критерій незначності систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta = 3,2 / 3 = 1,06$ 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 3,2$	не виконується виконується
Загальний висновок про методику	Коректна

Для бурштинової кислоти специфічність підтверджується тим, що час утримування піків кислоти бурштинової на хроматограмах випробовуваного розчину співпадає з часом утримування піків кислоти бурштинової на хроматограмах розчину порівняння (рис. 3), а компоненти плацебо не заважають проведенню випробувань на ідентифікацію та кількісне визначення бурштинової кислоти.

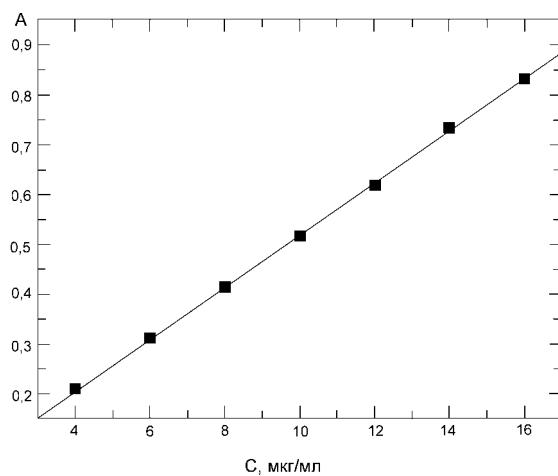


Рис. 3. Лінійна залежність поглинання від концентрації хлорогенової кислоти у нормалізованих координатах.

Правильність, прецизійність та лінійність підтверджено на модельних сумішах препарату методом “закладено- знайдено”. Результати представлені у табл. 2 і 3.

Як видно з даних табл. 2, 3, правильність, прецизійність та лінійність на модельних сумішах препарату методом “закладено- знайдено” підтверджуються.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено якісні методики аналізу оригінального препарату, що містить бурштинову кисло-

Таблиця 3

Метрологічні характеристики лінійної залежності площин піку від концентрації бурштинової кислоти

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Заключення
B	1,01425			
S _B	0,00807			
A	-0,16778	$\leq 1,895 \times S_a = -1,5477 $	$\leq 5,1 $	вітримуються за 1 критерієм
S _A	0,81673			
RSD ₀	0,31401			
RSD _{0/B}	0,3096	$\leq 1,27 $		вітримуються
r	0,99978	$> 0,99236 $		вітримуються

ту та екстракт ехінацеї пурпурової, які дозволяють вірогідно ідентифікувати діючі речовини.

2. Для діючих речовин розроблено методики їх кількісного визначення та проведено їх валідацію.

За валідаційними характеристиками: специфічність, правильність, прецизійність та лінійність наведені методики відповідають вимогам, встановленим ДФУ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — С. 187-214.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Доп. 2. — Х.: РІРЕГ, 2008. — С. 85-100.
3. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В.Юргеля, А.Л.Младенцева, А.В.Бурдейна и др. — М.: Медицина, 2007. — 48 с.
4. Goel V., Lovlin R., Chang C. et al. // Phytother. Res. — 2005. — Aug. 19 (8). — P. 689-694.
5. HPLC Columns Applications Notebook. Waters Corporation. — 2003. — P. 61.
6. Huntley A.L., Thompson Coon J., Ernst E. // Drug Saf. — 2005. — Vol. 28 (5). — P. 387-400.
7. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry / Ed. Monika Aksmundzka-Hajnos, Joseph Sherma, Teresa Kowalska. — CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. — P. 346.
8. Turner R.B., Bauer R., Woelkart K. et al. // N. Engl. J. Med. — 2005. — Jul. 28. — Vol. 353 (4). — P. 341-348.
9. Weber W., Taylor J.A., Stoep A.V. et al. // J. Altern. Complement. Med. — 2005. — Dec. 11 (6). — P. 1021-1026.
10. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. — 1999. — Vol. 1. — P. 125-135.

УДК 615.3.07:[582.998.16+547.461.4]:615.07

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТА, КОТОРЫЙ СОДЕРЖИТ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЭКСТРАКТ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ

І.Е.Цокало, А.И.Зайцев

Разработаны методики идентификации и количественного определения действующих веществ: янтарной кислоты и экстракта эхинацеи пурпурной сухого, принятые для стандартизации препарата при промышленном производстве. Проведено валидацию разработанных методик. Подтверждена достоверность результатов.

UDC 615.3.07:[582.998.16+547.461.4]:615.07

DEVELOPMENT OF METHODS FOR STANDARDIZATION OF A MEDICINE CONTAINING SUCCINIC ACID AND ECHINACEAE PURPUREA DRY EXTRACT

I.Ye.Tsokalo, O.I.Zaytsev

The methods of identification and assay of such active substances as succinic acid and Echinaceae purpurea dry extract used in standardization of a medicine in industrial production have been developed. Validation of the methods developed has been conducted. The consistency of the results has been confirmed.