УДК 615.322:615.07:618.17

ИЗУЧЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРЕПАРАТА «КЛИМАСЕД»

В.А. ГЕОРГИЯНЦ
В.К. ЯКОВЕНКО
Е..А. ХОХЛОВА

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

e-mail: v.iakovenko@gmail.com

Проведена валидация методики идентификации флавоноидов в препарате «Климасед», капли оральные. Проверена пригодность хроматографической системы и доказана возможность использования различных видов пластин. Специфичность методики подтверждена наличием в препарате «Климасед» индивидуальных веществ, входящих в состав отдельных видов растительного сырья. Методика соответствует требованиям по показателюробастности сходимостиполученных результатов.Доказана возможность использованиядляидентификации флавоноидов впрепарате «Климасед» различных реактивов-проявителей.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, валидация, хроматография.

Вступление. Актуальным вопросом контроля качества лекарственных средств растительного происхождения является разработка методик контроля качества и их валидация для включения в методы контроля качества (МКК) на препарат.

Комплекс разработанных методик, приводимых в МКК на препарат, должен обеспечивать специфичность определения и гарантировать получение готового продукта надлежащего качества.

Специфичность испытуемого раствора препарата может быть доказана по сравнению с избранными веществами-свидетелями и исходным сырьем препарата. Условия проведения методик влияют на конечный результат. Поэтому на стадии разработки методики, при изучении робастности, должны быть выявлены факторы, которые могут влиять на получение конечного результата, и факторы, которые могут меняться. Важную роль при разработке методики имеет сходимость получаемых результатов, которая также должна быть изучена в эксперименте.

Изучение данных параметров (специфичность, робастность и сходимость) при разработке методик идентификации методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) позволяет разработать и провалидировать методику [2, 5, 8].

В предыдущих исследованиях был установлен качественный состав препарата «Климасед» [6]. Среди групп биологически активных веществ, находящихся в оральных каплях, для стандартизации лекарственного препарата были выбраны флавоноиды, эфирные масла, алкалоиды.

Целью данной работы было изучение валидационных характеристик методики идентификации флавоноидов методом ТСХ в препарате «Климасед».

Материалы и методы исследований. Объектами исследования были оральные капли «Климасед», содержащие пассифлоры траву, липы цветки, душицы траву, шалфея листья, мелиссы траву и вспомогательное вещество этанол 40 % (серия № 010312).

Индивидуальные вытяжки пассифлоры травы, липы цветков, душицы травы, шалфея листья, мелиссы травы, приготовленные с использованием 40 % этанола в концентрации, соответствующей их содержанию в каплях оральных «Климасед». Для приготовления индивидуальных вытяжек использовали лекарственное растительное сырье надлежащего качества. Пассифлоры трава, липы цветки, душицы трава, шалфея листья отвечали требованиям ГФУ [3], мелиссы трава – требованиям ЕФ [7].

Достоверные вещества-свидетели: рутин (Sigma Aldrich, 17208TB) гиперозид (ФСО ГФУ, сер. 1); изокверцитрин (Fluka, BioChemika, № 17793).

ТСХ-пластинки: Silicagel 60 F254 (Merck, Germany), 1.05729, 25 TLC plates и Sorbfil ПТСХ-АФ-А; ТУ 26-11-17-89, (Sorbfil Imid Ltd, Россия, Краснодар).

Обсуждение результатов. Первым этапом нашего исследования была проверка использованных ТСХ-пластинок (Silicagel 60 F254, Merck, Германия и Sorbfil ПТСХ-АФ-А, Россия) на пригодность хроматографической системы. Поскольку отличия в активности марок сорбента одного и того же типа (например, силикагеля) нередко бывают значительными [1], это влияет на значительные колебания в значениях коэффициента содержания (*Rf*) исследуемых соединений. Обычно для оценки пригодности достаточно испытания на пригодность неподвижной фазы, описанной в разделе ГФУ, Реактивы 4.1.1 [3].

Проверка разделительной способности неподвижной фазы для идентификации [3] выявила, что компоненты раствора свидетелей четко разделяются на используемых пластинках. Так, обе марки ТСХ-пластин могут быть использованы в эксперименте.

Проводили определение специфичности флавоноидов по сравнению с веществами-свидетелями: рутином, гиперозидом и изокверцитрином, содержащимися в исходном сырье препарата «Климасед» (рис. 1) [4, 10], и вытяжками пассифлоры травы, липы цветков, душицы травы, шалфея листья, мелиссы травы.

Трава пассифлоры в исследуемой системе этилацетат Р – муравьиная кислота безводная Р – уксусная кислота ледяная Р – вода Р (100 : 11 : 11 : 26) содержит 6-8 веществ флавоноидной природы – флавон – С-гликозиды, размещенные между стартом и *Rf* ~ 0,65: изоориентин (*Rf* ~ 0,45) – зона интенсивной флуоресценции, изовитексин, витексин, изовитексин-2, -О-гликозид (Rf ~ 0,2) и другие дополнительные зоны [3, 10].

Цветки липы в данной системе содержат комплекс (около 8) веществ флавоноидной природы, производные кверцитина, мирицетина и кемпферола. Так, проявляются: зона, отвечающая по цвету и расположению рутину (*Rf* ~ 0,4); интесивная зона, отвечающая по цвету и расположению гиперозиду (*Rf* ~ 0,6), над ней находится еще одна зона того же цвета, что отвечает по цвету и размещению изокверцитрину (Rf ~ 0,7), зона тилирозида (*Rf* ~ 0,9) [3, 10] и др.

Трава душицы, листья шалфея, трава мелиссы содержат флавоноиды в незначительном количестве.

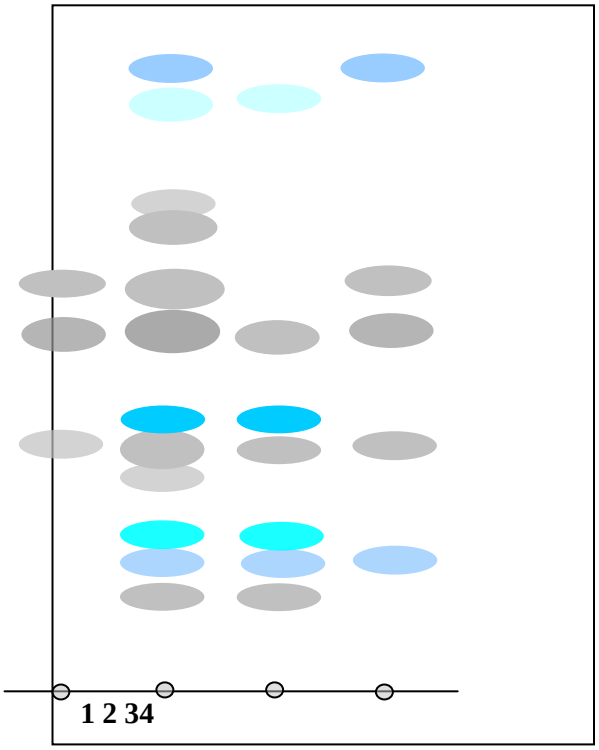

Рис. Схема ТСХ-хроматограммы флавоноидов препарата«Климасед»:
1 – смесь веществ-свидетелей рутин/гиперозид/изокверцитрин;
2 – хроматограммапрепарата «Климасед»;
3 – настойка травы пассифлоры;
4 – настойка цветков липы

Анализируя хроматограмму, показанную на рисунке, можно сделать вывод, что в препарат «Климасед» переходит большинство веществ флавоноидной природы, присущих его исходному сырью (пассифлоры траве и липы цветкам), что свидетельствует о специфичности определения данных исходных компонентов в готовом продукте.

Далее мы определяли робастность методики. Для этого проводили хроматографирование препарата «Климасед», контролированно изменяя условия выполнения методики: различные ТСХ-пластинки, различные проявители и условия высушивання.

Сравнивали результаты хроматографирования, полученные на ТСХ-пластинках разных производителей, таких, как Sorbfil и Merck, с прохождением подвижной фазы 11 см, после проявления различными проявителями, которые используются для выявления флавоноидов [9]: 0,1 г/л алюминия хлорида Р в этаноле Р, 10 г/л аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты

Р в метаноле Р и раствора 50 г/л макрогола 400 Р в метаноле Р и борно-цитратного реактива, подбирая оптимальные условия высушивания.

Оценивали результат, просматривая пластинку в УФ-свете 365 нм, сравнивая размер и *Rf* и цвет флюоресценции зоны и четкость ее разделения на хроматограмме раствора препарата «Климасед» и на хроматограмме растворов-свидетелей (табл. 1).

Таблица 1

Выбор оптимального проявителя для выявления флавоноидов в препарате «Климасед»

Проявитель	Условия высушивания пластинки	Результат детектирования при длине волны 365 нм	
		Вещества-свидетели	Климасед
0,1 г/л алюминия хлорида Р в этаноле Р	5 мин. при температуре 100-105 °С	-рутин: зеленовато-желтая флуоресцентная зона (*Rf*~0,4); -гиперозид: зеленовато-желтая флуоресцентная зона (*Rf*~0,6); -изокверцитрин: зеленовато-желтая флуоресцентная зона (*Rf*~0,7)	Три зеленовато-желтые флуоресцентные зоны, расположенные на уровне зон рутина, гиперозида и изоквецитрина, что примерно соответствуют им по размеру и интенсивности окраски (цветки липы). Выше зон рутина расположена интенсивная желто-зеленая зона, отвечающая изоориентину (трава пассифлоры), желто-зеленая зона, отвечающая изовитексин-2"-О-гликозиду (Rf ~ 0,2) (трава пассифлоры), около финиша расположена голубая флуоресцентная зона, отвечающая тилирозиду (Rf ~ 0,9) (цветки липы)
Борно-цитратный реактив	100 °С до 105 °С на протяжении 3 мин.		
10 г/л аминоэтилового эфира дифедифенилборной кислоты Р в метаноле Р, раствор 50 г/л макрогола 400 Р в метаноле Р	10 мин. при температуре 100-105 °	-рутин: желто-оранжевая флуоресцентная зона (*Rf*~0,4); -гиперозид: желто-оранжевая флуоресцентная зона (*Rf*~0,6); -изокверцитрин: желто-оранжевая флуоресцентная зона (*Rf*~0,7)	Три желто-оранжевые флуоресцентныезоны, расположенные на уровнезонрутина, гиперозида иизоквецитрина, чтопримерно соответствуютим по размеруиинтенсивностью окраски(цветкилипы).Вышезонрутинараспо ложенаинтенсивнаяжелто-оранжеваязона, отвечающаяизоориентину(травапассифлоры), зеленаязона, отвечающаяизовитексин-2"-О-гликозиду (Rf~ 0,2) (травапассифлоры), около финишарасположенаголубаяфлуоресцентнаязона, что соответствуеттилирозиду(Rf~0,9)(цветкилипы)

Как свидетельствуют данные табл.1, всеисследуемые проявители могут быть использованы для выявления флавоноидов.При использовании 0,1 г/л алюминия хлорида Р в этаноле Р и борно-цитратного реактива вещества флавоноидной природы обнаруживают очень близкие результаты по цвету флуоресценции. Использование 10 г/л аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты Р в метанолеР и раствора 50 г/л макрогола 400 Р в метаноле Р дает болеечеткое разделение соединений флавоноидной природы и разный цвет флуоресценции в зависимости от строения [10].Определяли сходимость получаемых результатов, сравнивая значения Rf, соответствующие веществам-свидетелям на хроматограммах препарата «Климасед», полученным в разные дни. Метрологические характеристики определения сходимости приведены в табл. 2.

Таблица 2

Сходимостьрезультатов определенияпрепарата «Климасед»

Зона	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\overline{X}$	S	$\overline{X} \pm \Delta x$, (%)	ε, %
Рутин	0,426	0,436	0,44	0,423	0,421	0,412	0,427	0,446	0,452	0,431	0,013	0,426	0,436
Гиперозид	0,609	0,619	0,62	0,61	0,601	0,61	0,623	0,645	0,625	0,618	0,013	0,609	0,619
Изокверцитрин	0,666	0,679	0,683	0,673	0,695	0,685	0,657	0,676	0,679	0,677	0,011	0,666	0,679

Полученные результаты выявили, что при определении сходимости зоны, которые оказались на хроматограмме препарата «Климасед», полученные в разные дни, идентичны относительно их количества, интенсивности флуоресценции и четко разделены.

Методика определения флавоноидов в препарате «Климасед» приведена ниже.Определение осуществляют методом ТСХ с использованием ТСХ пластинок со слоем силикагеля Р размером 7.5 × 15 см (ГФУ, 2.2.27^{N}).

Раствор сравнения: 1 мг рутина Р и 3 мг изокверцитрина растворяют в 10 мл метанола Р. Раствор хранят в плотно закупоренной таре темного стекла в холодильнике.

На линию старта хроматографической пластинки наносят 15 мкл препарата и 10 мкл раствора сравнения в виде полосок длиной 15 мм (линия старта на расстоянии 1.5 см от нижнего края пластинки, расстояние между пробами 1 см). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин. и помещают в камеру со смесью растворителей: этилацетат Р – муравьиная кислота безводная Р – уксусная кислота ледяная Р – вода Р (100 : 11 : 11 : 26). Когда фронт растворителей пройдет около 11 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин. Пластинку опрыскивают борно-цитратным реактивом или другим подходящим реактивом*, нагревают при температуре 100 °С до 105 °С в течение 3 мин. и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора сравнения с возрастающей величиной *Rf* проявляются рутин, гиперозид и изокверцитрин в виде зеленовато-желтых флуоресцентных зон.

На хроматограмме препарата должны проявиться три зеленовато-желтые флуоресцентные зоны, расположенные на уровне зон хроматограммы раствора сравнения, которые должны примерно соответствовать им по размеру и интенсивности окрашивания (рутин, гиперозид, изокверцитрин). На хроматограмме препарата также должны проявиться три зеленовато-желтые флуоресцентные зоны в нижней трети хроматограммы и одна над зоной изокверцитрина, также три голубые флуоресцентные зоны в верхней части хроматограммы. На хроматограмме препарата могут присутствовать другие, менее заметные зоны.

Примечания.

1. Смесь растворителей для ТСХ используют в течение 1 суток.

2. Приготовление борно-цитратного реактива: 2,5 г борной кислоты Р и 2,5г лимонной кислоты Р растворяют в 100 мл метанола Р.

* – учитывая изменение окраски выявленных зон (табл. 1), допускается использование других реактивов-проявителей: 0,1 г/лалюминия хлорида Р в этаноле Р или 10 г/л аминоэтиловогоэфирадифенилборной кислотыР в метанолеР, раствор 50 г/л макрогола400 Р в метаноле Р.

Выводы.Провалидирована методика идентификации флавоноидов методом ТСХ в препарате «Климасед».

1. Установлено, что большинство веществ флавоноидной природы в составе препарата «Климасед» идентичны флавоноидам травы пассифлоры и цветков липы.

2. Подтверждена робасность методики идентификации флавоноидов относительно вида ТСХ-пластин, проявителей и условий высушивания.

3. Установлена сходимость результатов по значениямRf, количеству и интенсивности зон флюоресценции на хроматограммах препарата «Климасед».

Литература

1. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3-х т. на рус. языке / под. ред. член. кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. «НТМТ», 2011. – Т. 2. – 474 с.
2. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под. ред. В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.; Доп. 2., 2008. – 620 с.; Доп. 3., 2009. – 280 с.; Доп. 4., 2011. – 540 с.
4. Кортиков, В. Н. Справочник лекарственных растений / В. Н. Кортиков, А. Н. Кортиков. – Ростов н/Д: Издательский дом «Проф-Пресс», 2004. – 800 с.
5. Хохлова, К. О. Вивчення валідаційних характеристик при ідентифікації настойки складної методом тонкошарової хроматографії / К. О. Хохлова, Л. І. Вишневська, С. В. Гарна // Управління якістю в фармації : VI наук.-практ. конф. 12 жовтн., 2012 р. – тез. доп. – Х., 2012. – С. 142.
6. Яковенко, В.К. Дослідження якісного складу препарату комплексної дії клімасед / В.К. Яковенко // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Том № 13, №1. – С. 98-101.
7. EuropeanPharmacopoeia. – 6 thed. –Strasbourg: CouncilofEurope, 2007. – 3261 p.
8. Reich, E. ValidationofHigh-PerformanceThin-Layer Chromatographic Methods for the Identificaion of Botanicals in a cGMP / E. Reich, A. Schibli, A. Debatt // Journal of AOAC International. –2008. – Vol. 91, № 1. – P. 13–20.
9. Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods / Hellmut Jork, Werner Funk, Walter Fischer, Hans Wimmer. – Germany, Weinheim, 1990. –Vol. 1 a. – 464 p.
10. Wagner, H. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas / H. Wagner, S. Bladt. – 2-nd ed. – Berlin : Springer-Verlag, 1996. – 384 p.

STUDY OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF THE IDENTIFICATION METHODS OF THE MEDICINE «CLIMASED»

V.A. GEORGIYANTS
V.K. IAKOVENKO
E.A. KHOKHLOVA

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

e-mail: v.iakovenko@gmail.com

The validation methods of flavanoids identification was carried out in the medicine «Climased», oral drops. Chromatographic system suitability was verified, and the possibility of various plates use was proved. The method specificity was confirmed by the presence of individual substances in the medicine «Climased», that are parts of certain types of herbal raw materials. The method meets the requirements for the robustness index and obtained results of convergence. The possibility of different reagents-developers application for identification of flavanoids in the medicine «Climased» was proved.

Key words: starting materials of herbal origin, validation, chromatography.