

УДК 615.072: 615.454.2: 582.736

О. А. РУХМАКОВА, Т. Г. ЯРНИХ, В. І. ГУСАРОВ, С. М. ГУВАРЬ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІЦИРИЗИНОВОЇ КИСЛОТИ В СУПОЗИТОРІЯХ «ІМУНОСОЛ» МЕТОДОМ ВЕРХ

Розроблено методику кількісного визначення гліциризинової кислоти у ректальних супозиторіях під умовною назвою «Імуносол». З використанням розробленої методики проведено аналіз експериментальної серії препарату. Середнє значення гліциризинової кислоти склало 68,58 мг на супозиторій. Серія відповідає встановленим вимогам.

Ключові слова: кількісне визначення, ректальні супозиторії, солодка гола.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Незважаючи на чисельні експериментальні та клінічні дослідження, фармакотерапія дитячих вірусних імунозалежних захворювань потребує пошуку і впровадження у медичну практику нових лікарських препаратів. Актуальним резервом у цьому плані є рослинні сполуки, зокрема сухий екстракт кореня солодки голої, який проявляє протівірусну та імуномодулюючу активність у поєднанні з низькою токсичністю [9].

З використанням вказаної рослинної сировини на кафедрі технології ліків Національного фармацевтичного університету були розроблені дитячі ректальні супозиторії під умовною назвою «Імуносол» для лікування вірусних захворювань імунозалежної природи [7].

Як відомо, одним із етапів у процесі створення нових препаратів, зокрема, на основі природних субстанцій, є розробка методик кількісного аналізу діючих речовин [1].

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Основною діючою речовиною сухого екстракту кореня солодки голої є гліциризинова кислота (ГК). Для стандартизації препаратів, до складу яких входять субстанції, виготовлені переробкою коренів солодки, визначення вмісту ГК є загальноприйнятним підходом [2].

За даними літературних джерел, методики кількісного визначення ГК поділяються на декілька груп [5, 6]: визначення за ГК; визначення

за вуглеводною частиною ГК; визначення за гліциретиновою кислотою.

У свою чергу, визначення за ГК можливо проводити гравіметричним, титриметричним, хроматографічним та спектрофотометричним методами.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Серед існуючих методик визначення ГК найбільш часто використовують з метою її кількісного визначення у складі лікарських препаратів – екстракційно-спектрофотометричний метод [3].

Проте, досягнення сучасної аналітичної хімії сприяють застосуванню більш надійних, точних та селективних методів у фармацевтичному аналізі. Так, у національній та провідних світових Фармакопеях пропонується проводити визначення ГК методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [4, 8].

Зважаючи на те, що даний метод є найбільш точним і сучасним, актуальність його використання при визначенні ГК у супозиторіях «Імуносол» є безсумнівною.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Розробка методики кількісного визначення ГК в ректальних супозиторіях «Імуносол» методом ВЕРХ.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розробку методики визначення ГК проводили на аналітичному хроматографі Varian ProStar

© Колектив авторів., 2015

(насос ProStar 210; спектрофотометричний детектор ProStar 330; автосамплер ProStar 410 з об'ємом дозуючої петлі 20 мкл) та колонки Nucleosil 100-3 C18 100*4.6 з предколонкою.

В роботі використовували наступні розчинники та реактиви: ацетонітрил «gradient grade» (Sigma-Aldrich), вода для хроматографії (Millipore Direct-Q5), кислоти ацетова льодяна (х.ч), аміак водний (х.ч). Стандартні зразки, що було використано: фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України (ДФУ) моноамонію гліциризату, робочий стандартний зразок сухого екстракту солодкового кореня.

Розробку методики проведено з використанням експериментальної серії препарату «Імуносол» та плацебо препарату. Визначення ГК проводили методом ВЕРХ (ДФУ, 2.2.29).

Першим етапом розробки методики кількісного визначення ГК було визначення вимог, за яких буде можливе виділення активного компонента з матриці, що складається з емульгатора твін-80 та твердого жиру.

Необхідно було запропонувати методику прободіготовки, яка б забезпечила точне визначення ГК та запобігала б потраплянню у пробу компонентів матриці. Як розчинник було обрано водний розчин аміаку, здатний утворювати з ГК легкорозчинний моноамонію гліциридат, та нездатний до розчинення твердого жиру.

Для запобігання потраплянню у пробу компонентів матриці, після диспергування наважки розчин центрифугували протягом 5 хв за 5000 хв⁻¹ та фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм.

Для визначення ГК використовували модифікацію методики, описаної у ДФУ, валідацію проводили лише в обсязі доведення специфічності.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Після внесення змін у фармакопейну методику для урахування прободіготовки при кількісному визначенні у супозиторіях, методика пропонується у наступному вигляді.

Суміш для проб. Змішували 25 мл аміаку розчину концентрованого P1 та 975 мл води P.

Рухома фаза. Змішували 55 мл кислоти оцтової льодяної P-335 мл ацетонітрилу P та 610 мл води P.

Випробовуваний розчин. Близько 0,18 г (точна наважка) препарату поміщали у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додавали 25 мл суміші для проб, нагрівали за 80 °С до повного розчинення основи та витримували за тих самих умов протягом 5 хв при перемішуванні.

Розчин охолоджували, рідину кількісно переносили у мірну колбу місткістю 100 мл за допо-

могою суміші для проб та доводили до позначки тим самим розчинником. Розчин центрифугували (5000 хв⁻¹, 5 хв). Надосадову рідину фільтрували крізь нейлоновий мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші порції фільтрату.

Розчин порівняння. Близько 50 мг (точна наважка) ФСЗ моноамонію гліциризату поміщали у мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняли у суміші для проб, доводили до позначки тим самим розчинником; 5,0 мл отриманого розчину доводили сумішшю для проб до об'єму 50,0 мл та фільтрували крізь нейлоновий мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов: колонка розміром 0,10 м × 4,6 см, заповнена *силькагелем октадецилсилільним для хроматографії P*, з розміром частинок 3,0 мкм, з предколонкою (Nucleosil 100-3 C18 100×4.6), швидкість рухомої фази 1,5 мл/хв, температура колонки — 25 °С, детектування за довжини хвилі 254 нм, об'єм інжекції — 20 мкл.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо виконувались наступні вимоги:

- коефіцієнт симетрії (A_s), розрахований за піком моноамонію гліциризату на хроматограмі розчину порівняння (v) має бути не менше 0,8 та не більше 2,0;
- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком моноамонію гліциризату на хроматограмі розчину порівняння (v) складає не менше 2000 т. т.

З метою виконання вимог тесту придатності хроматографічної системи, допускається корегування умов хроматографування.

Отримували послідовно $n_0=2, 3, \dots, 8$ паралельних хроматограм розчину порівняння (v) та розраховували відносно стандартне відхилення RSD. Величина n_0 є достатньою, якщо значення RSD, розраховане для площі піку моноамонію гліциризату не перевищує RSD_{max} , що наведено нижче.

Кількість паралельних інжекцій, n_0						
2	3	4	5	6	7	8
RSD _{max}						
0,51	1,34	1,92	2,37	3,75	3,08	3,38

Якщо одержані величини RSD не перевищують величини RSD_{max} , поперемінно хроматографують однакову кількість $n \geq n_0$ разів розчин порівняння та випробовуваний розчин.

Вміст ГК (X), у міліграмах на один супозиторій, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{S_1 * m_0 * 5 * 100 * P * a * 823}{S_0 * m_1 * 50 * 50 * 100 * 840} = \frac{S_1 * m_0 * P * a * 823}{S_0 * m_1 * 500 * 840},$$

де: S_1 – середнє значення площі піку випробовуваної речовини, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку випробовуваної речовини, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_1 – маса наважки препарату, г;

m_0 – маса наважки ФСЗ моноамонію гліциризату, мг;

P – вміст активної речовини ФСЗ моноамонію гліциризату, %;

823 – молекулярна маса ГК;

840 – молекулярна маса моноамонію гліциризату (без урахування кристалізаційної води);

a – середня маса супозиторію, г.

Вміст ГК має бути не менше 62,5 мг на один супозиторій.

З використанням розроблених методик було проконтрольовано вміст ГК у експериментальній серії препарату. Вміст ГК склав 68,58 мг на один супозиторій. Розрахунки вмісту ГК наведені на рис. 1.

Типові хроматограми, отримані при визначенні ГК у супозиторіях «Імуносол», наведено на рис. 2, 3.

Для доведення специфічності методики визначення ГК було приготовано та проаналізовано розчин плацебо, який містив всі компоненти супозиторіїв, крім сухого екстракту солодкового кореня. Хроматограма розчину плацебо наведено на рис. 4.

На хроматограмі плацебо видно, що визначенню ГК за методикою, що запропонована, компоненти плацебо не заважають. Таким чином, методика може бути використана для контролю вмісту ГК (сухого екстракту кореню солодки) у препараті «Імуносол».

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розроблено методику кількісного визначення ГК у ректальних супозиторіях «Імуносол».

Для запропонованої методики як одну з валідаційних характеристик визначено специфічність.

З використанням розробленої методики проведено аналіз експериментальної серії препарату. Вміст ГК склав 68,58 мг на супозиторій. Експериментальна серія препарату відповідає встановленим вимогам.

Середня маса суп., г			1,16		
Наважка суп., г			0,1526		
Колба, мл			100		
Наважка стандарту, мг			52,5		
Вміст гліциризинової кислоти у стандарті, %			93		
Колба 1, мл			50		
Аліквота, мл			5		
Колба 2, мл			50		
Площі піків гліциризинової кислоти					
розчин порівняння			випробовуваний розчин		
rs_0621_02.run	355,92		ts_0709_03_run	335,42	
rs_0621_02_001.run	355,16		ts_0709_03_001.run	335,08	
середнє	355,54		середнє	335,25	
RSD, %	0,15		RSD, %	0,07	
Вміст кислоти гліциризинової (X), у міліграмах на грам мазі, обчислюють за формулою:					
$X = \frac{S_1 * m_0 * 5 * 100 * P * a * 823}{S_0 * m_1 * 50 * 50 * 100 * 840} = \frac{S_1 * m_0 * P * a * 823}{S_0 * m_1 * 500 * 840} = 68,58$					
де:					
S_1 – середнє значення площі, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;					
S_0 – середнє значення площі, розраховане з хроматограм розчину порівняння;					
m_1 – маса наважки препарату, г;					
m_0 – маса наважки ФСЗ моноамонію гліциризату, мг;					
P – вміст активної речовини ФСЗ моноамонію гліциризату, %;					
a – середня маса супозиторію, г;					
823 – молекулярна маса кислоти гліциризинової;					
840 – молекулярна маса моноамонію гліциризату.					

Рис. 1. Розрахунки вмісту ГК у супозиторіях «Імуносол»

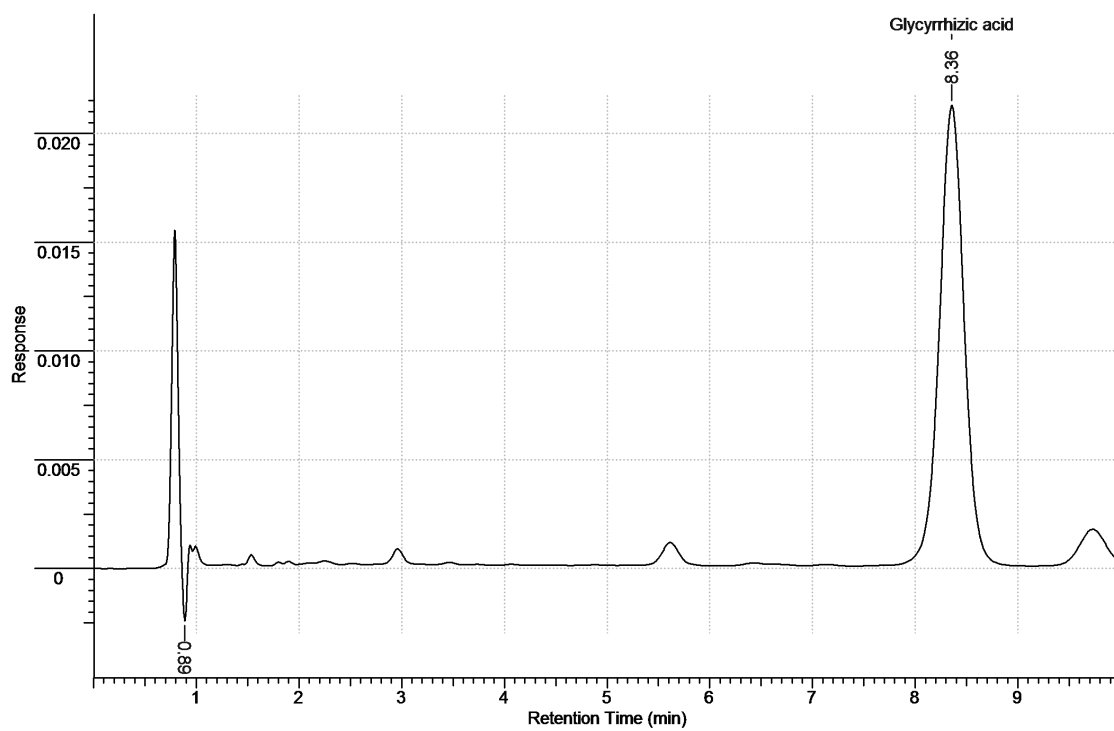


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння

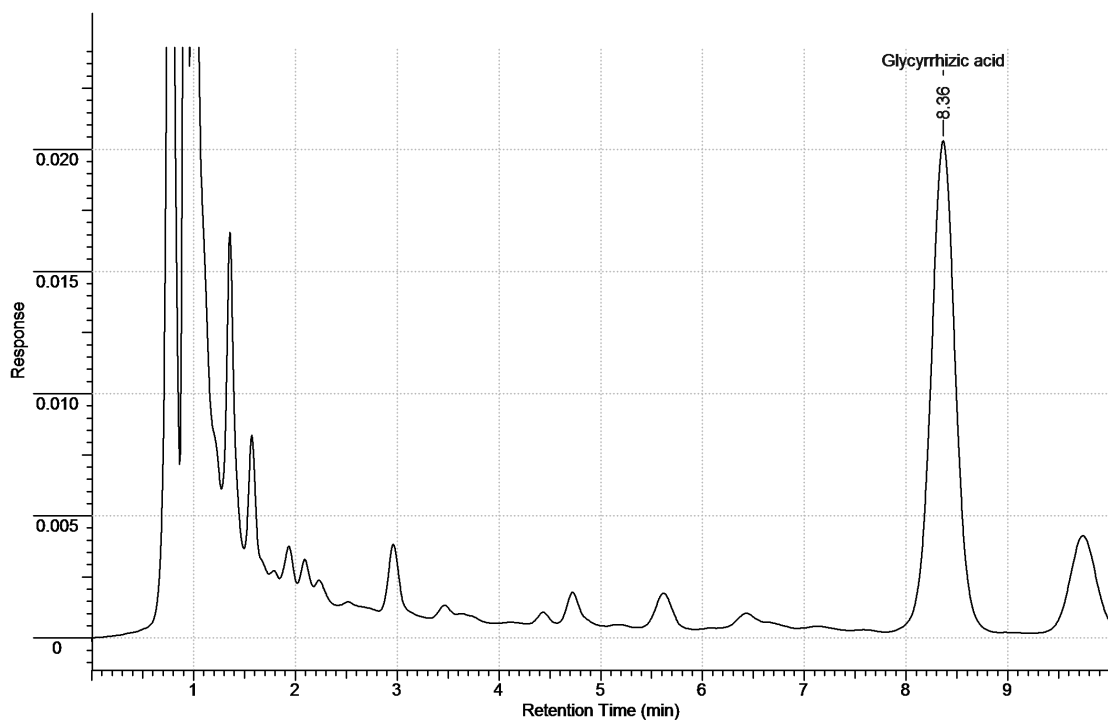


Рис. 3. Хроматограма випробовуваного розчину

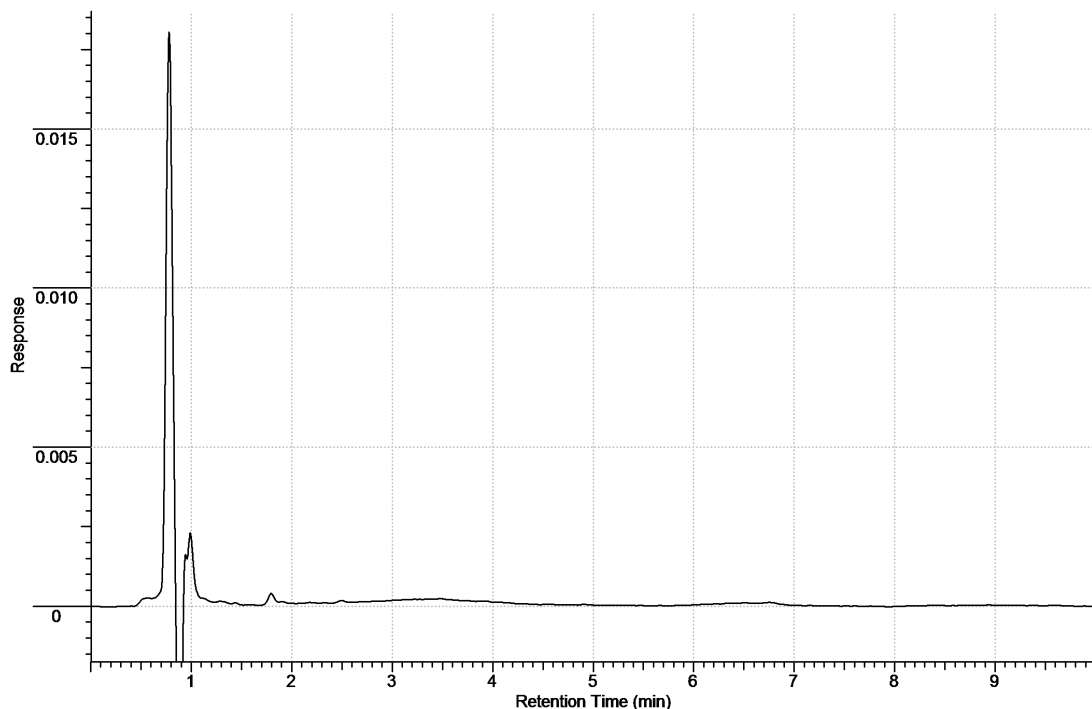


Рис. 4. Хроматограма плацебо

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств : в 3-х т. / под ред. чл.-кор. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Х. : НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
2. Валидация методик качественного анализа сырья и препаратов солодки / М. В. Егоров, В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная [и др.] // Фармация. – 2005. – № 1. – С. 9-12.
3. Государственная фармакопея СССР / ред. кол. М. Д. Машковский, А. Н. Обоймакова, А. П. Арзамасцев и др. – X изд. – М. : Медицина, 1968. – С. 583.
4. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1 вид., 2 допов. – Х. : РІРЕГ, 2008. – С. 548.
5. Куркин В. А. Стандартизация корней солодки голой и лекарственного препарата «Солодки экстракт жидкий» / В. А. Куркин, М. В. Егоров // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6. – С. 1232-1236.
6. Совершенствование способов оценки качества корней и сиропа солодки / М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко, А. М. Тамирян [и др.] // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 147-150.
7. Ярных Т. Г. Технология приготовления детских суппозиторий с экстрактами солодкового корня / Т. Г. Ярных, Г. Н. Мельник, О. А. Рухмакова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – № 11 (154). – С. 257-260.
8. European Pharmacopeia. – 8th ed. – Strasbourg : Council of Europe, 2014. – 3639 p.
9. Study of immunomodulating activity of rectal suppositories with an extract of licorice root / L. V. Yakovleva, T. G. Yarnykh, E. Yu. Kosheva, O. A. Rukhmakova, G.N. Melnik // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2014. – Vol. 2, N 4. – P. 277-283.

УДК 615.072: 615.454.2: 582.736

О. А. Рухмакова, Т. Г. Ярних, В. И. Гусаров, С. Н. Губарь

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СУППОЗИТОРИЯХ «ИММУНОСОЛ» МЕТОДОМ ВЭЖХ

Разработана методика количественного определения глицирризиновой кислоты в ректальных суппозиториях под условным названием «Иммуносол». С использованием разработанной методики проведен анализ экспериментальной серии препарата. Среднее значение содержания глицирризиновой кислоты составило 68,58 мг на суппозиторий. Серия отвечает установленным требованиям.

Ключевые слова: количественное определение, ректальные суппозитории, солодка голая.

UDC 615.072:615.454.2:582.736

O. A. Rukhmakova, T. G. Yarnykh, V. I. Gusarov, S. N. Gubar

THE DEVELOPMENT OF GLYCYRRHIZIN ACID QUANTITATIVE DETERMINATION METHODIC IN SUPPOSITORIES “IMMUNOSOL” USING HPLC METHOD

The methodic of quantitative determination of glycyrrhizin acid in rectal suppositories under conditional name «Immunosol» was developed. Using the developed methodic experimental series of the medicine were analyzed. Mean glycyrrhizin acid content was 68.58 mg per suppository. Series meets the requirements.

Key words: quantitative determination, rectal suppositories, licorice.

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4,

Кафедра технології ліків НФаУ.

E-mail: olynka22@rambler.ru

Надійшла до редакції:

24.02.2015 р.