

## Розробка методів контролю якості та дослідження галенового препарату для лікування та профілактики алопеції

О.Ю.Галкін, А.Г.Котов

ТОВ «Універсальне агентство «ПРО-ФАРМА», Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» МОЗ України  
Київ, Харків, Україна

Розроблено методи контролю якості галенового препарату для лікування та профілактики алопеції, що являє собою настойку зі збору лікарської рослинної сировини (корені лопуха, кореневища лепехи, листя кропиви, шишки хмелю, плоди софори). Для якісного аналізу препарату проводили ідентифікацію терпеноїдів, флавоноїдів та гідроксикоричних кислот, амінокислот, поліфенольних сполук. Для кількісного аналізу визначали вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин. Проведений аналіз трьох дослідно-промислових серій препарату за розробленими методами контролю якості засвідчив їх відповідність специфікації.

**Ключові слова:** фітопрепарат, корені лопуха, кореневища лепехи, листя кропиви, шишки хмелю, плоди софори, стандартизація, контроль якості, алопеція.

### ВСТУП

Фармакотерапія захворювань шкіри голови посідає важливе місце серед різних напрямів лікарської терапії, що пов'язано з рядом причин медичного і соціального характеру та станом фармацевтичного виробництва. Серед багатьох засобів, що використовують для профілактики і лікування косметичних недоліків, значне місце займають рослини, які поліпшують обмінні процеси в клітинах шкіри, допомагають у боротьбі з передчасним старінням, зміцнюють волосся, попереджають появу лупи тощо. Тому створення сучасних ефективних

рослинних препаратів, у тому числі і для лікування дефектів шкіри голови, та їх виробництво є актуальним [1-3].

Досліджуваний препарат являє собою складну настойку зі збору лікарської рослинної сировини, до складу якої входять (на 100 г): корені лопуха справжнього – 28 г, плоди софори японської – 28 г, кореневища айру – 16 г, листя кропиви – 14 г, хмелю супліддя (шишки) – 14 г. На попередніх етапах дослідження був здійснений фітохімічний та фармакотерапевтичний дизайн препарату [4, 5], проведено вивчення якісного та кількісного складу складної настоянки [6]. Наступним етапом наших досліджень була розробка методів контролю якості у відповідності до існуючих в Україні вимог [7-10] та вивчення 3 дослідно-промислових серій препарату.

Метою дослідження було обґрунтування та розробка методів контролю якості фітопрепарату та дослідження трьох його серій, отриманих у дослідно-промислових умовах.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження була складна настойка зі збору лікарської рослинної сировини. Критерії стандартизації для розробленого засобу визначені Державною Фармакопеею України (ДФУ) у загальній монографії «Екстракти» [11-13]. Настойки контролюють за такими показниками: опис, ідентифікація, вміст етанолу, важких металів, об'єм вмісту контейнера, сухий залишок, мікробіологічна чистота та кількісне визначення [13-14].

Дослідження трьох дослідно-промислових серій препарату проводили відповідно до розробленої специфікації.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За зовнішнім виглядом усі напрацьовані серії препарату являли собою прозору рідину від світло-коричневого до коричневого кольору.

На попередніх етапах дослідження [6] було встановлено наявність у препараті наступних біологічно активних речовин (БАР): терпеноїди, флавоноїди, амінокислоти, полісахариди, пен-тозани, поліфеноли, гідроксикоричні кислоти. Відповідно до фармакотерапевтичного дизайну розроблений препарат активує область навколо дермального (шкірного) сосочка і, таким чином, нейтралізує гормональну нерівновагу, яка може спричиняти надмірне випадання волосся; володіючи вираженою судинорозширювальною дією, покращує кровообіг у волосистій частині шкіри голови; нормалізує роботу сальних залоз та знімає запальні явища в області волоссяних фолікулів; нормалізує процес відлущування шкіри; посилює синтез білка у фолікулах [15].

Виходячи із згаданої фармакологічної активності препарату в цілому та біологічно активних речовин, що входять до його складу, нами прийнято рішення при контролі якості настоянки проводити ідентифікацію наступних сполук:

- терпеноїдів, що містяться в айрі, флавоноїдів і гідроксикоричних кислот, що містяться в плодах софори, коренях лопуха, листі кропиви та шишках хмелю, методом тонкошарової хроматографії (ТШХ);

- поліфенольних сполук, що містяться в усіх складових препарату, за допомогою краплинної якісної реакції;

- амінокислот, що містяться в коренях лопуха, плодах софори та шишках хмелю, за допомогою краплинної якісної реакції.

У процесі розробки методик ТШХ були оптимізовані умови приготування випробовуваного розчину, визначені типи пластинок, системи розчинників, реактиви для обприскування, проведено опис регламентованих зон.

Ідентифікацію терпеноїдів проводили в наступних умовах. Випробовуваний розчин: метанольний розчин хлороформного витягання із препарату. Розчин порівняння: розчин евгенолу Р і холестерину Р у хлороформі Р. Хроматографічна пластинка: «Сорбфіл» ПТСХ-П-А-УФ розміром 6\*10 або «Silica gel 60» F<sub>254</sub> (Merck, США). Процедура нанесення: смуги розміром 10\*3 мм по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Рухома фаза: бензол Р – етилацетат Р (93:7). Висота пробігу фронту розчинників – близько 8 см від лінії

старту. Метод виявлення: обприскують реактивом ваніліну Р, нагрівають при температурі від 100°C до 105°C протягом 5 хв. і переглядають при денному світлі. Регламентация: на хроматограмі розчину порівняння в нижній половині пластинки має виявлятися зона синьо-фіолетового кольору (холестерин), у верхній половині пластинки – зона червоно-коричневого кольору (евгенол); на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися зона червоно-фіолетового кольору нижче зони евгенолу на хроматограмі розчину порівняння (азарон) (рис. 1).

Ідентифікацію флавоноїдів, гідроксикоричних кислот проводили в наступних умовах. Випробовуваний розчин: метанольний розчин етилацетатного витягання із водного шару. Розчин порівняння: розчин рутину Р, кислоти хлорогенової Р і гіперозиду Р у метанолі Р. Хроматографічна пластинка: «Сорбфіл» ПТСХ-АФ-А-УФ або «Silica gel 60» F<sub>254</sub> (Merck, США) розміром 6\*10. Процедура нанесення: смуги розміром 10\*3 мм по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Рухома фаза: кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р (10:10:80). Висота пробігу фронту розчинників – близько 8 см від лінії старту. Метод виявлення: пластинку обприскують розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім обприскують розчином макрогону 400 Р у метанолі Р і переглядають в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм.

Регламентация. На хроматограмі розчину порівняння (рис. 2) у нижній і середній частинах пластинки мають виявлятися в порядку збільшення значення R<sub>f</sub> жовто-коричнева флуоресціююча зона (рутин) (1), блакитна флуоресціююча зона (кислота хлорогенова) (2), жовто-коричнева флуоресціююча зона (гіперозид) (3). На хроматограмі випробовуваного розчину (рис. 2) мають виявлятися: жовто-коричнева флуоресціююча зона на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння (рутин) (1); нижче (4) та безпосередньо вище (5) неї – дві жовто-зелені флуоресціюючі зони (флавоноїди софори); блакитна флуоресціююча зона, що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння (2) (кислота хлорогенова, лопух, кропиви); вище неї – жовто-коричнева (оранжева) флуоресціююча зона (6) дещо вище зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння (флавоноїди хмелю); вище цієї зони – дві слабо розділені жовто-зелені флуоресціюючі зони (7, 8) (флавоноїди софори) та інтенсивна жовто-блакитна флуоресціююча зона (9) (фенолкарбонові кислоти лопуха).

Ідентифікацію поліфенольних сполук проводили якісною краплинною реакцією із фос-

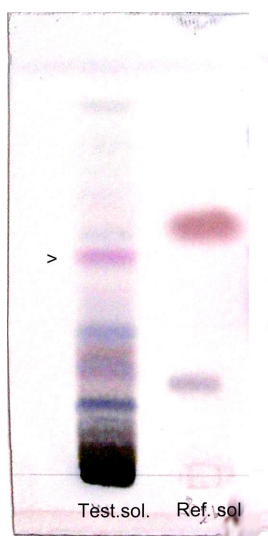


Рис. 1. Хроматограми випробовуваного розчину (Test. sol.) і розчину порівняння (Ref. sol.) евгенолу і холестерину.

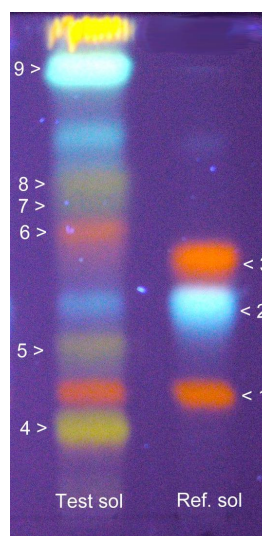


Рис. 2. Хроматограми розчину порівняння рутину, кислоти хлорогенової, гіперозиду (Ref. sol.) і випробовуваного розчину (Test. sol.).

форно-молібденово-вольфрамовим реактивом з подальшою обробкою плями калію гідроксиду розчином спиртовим [12]. Дослідження, проведені на спеціально приготованих водно-спиртових витягах усіх рослин, що входять до складу препарату, показали високу чутливість даної реакції.

Ідентифікацію амінокислот проводили якісною краплинною реакцією із розчином нінгідрину [17].

**Кількісне визначення.** На підставі попередніх фітохімічних досліджень для контролю якості препарату було вирішено проводити кількісне визначення суми флавоноїдів у відповідності з методикою Європейської фармакопеї (ЄФ) 5 вид. [16] та ДФУ 1 вид. [12, 13], яка використовується в декількох монографіях на ЛРС, що стандартизована за кількісним вмістом даного класу БАР («Квітки календули», «Квітки бузини», «Листя берези», «Трава собачої кропиви»).

До складу препарату як один з основних компонентів входять плоди софори, кількість суми флавоноїдів у яких складає біля 4,5%. У препараті вміст цієї сировини на 100 г складає 5,6 г, що відповідає 0,25 г суми флавоноїдів. Крім того, й інші рослини, а саме шишки хмелю та листя кропиви, містять цей клас сполук, здебільшого похідні кверцетину (гіперозид, рутин тощо).

При розробці методики в першу чергу була перевірена відповідність максимуму спектрів поглинання випробовуваного розчину препарату, отриманого в умовах методики, довжині хвилі, зазначеній в методиці ЄФ. Було встановлено, що положення максимуму на спектрі розчину препа-

рату повністю співпадає з довжиною хвилі, зазначеною в монографії ( $425 \pm 2$  нм) (рис. 3).

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин у препараті вирішено регламентувати з урахуванням експериментально отриманих результатів, а саме не менше 0,25%. Регламентація дана відповідно до експериментальних даних, отриманих при аналізі трьох серій препарату ( $X(c.11006)=0,31$ ,  $X(c.20807)=0,27$ ,  $X(c.30308)=0,33$ ) і наведені в табл. 1.

Сухий залишок. Даний показник відповідає вимогам ДФУ та має становити не менше 3,5%.

Важкі метали. Даний показник відповідає вимогам ДФУ та має становити не більше 0,001%.

Спирт етиловий. Визначення вмісту спирту етилового запропоновано проводити методом перегонки із подальшим визначенням густини відгону. За алкоголіметричними таблицями визначають вміст етанолу у відсотках за об'ємом [12]. Вміст спирту етилового в препараті має бути не менше 33,0% і не більше 36,0%.

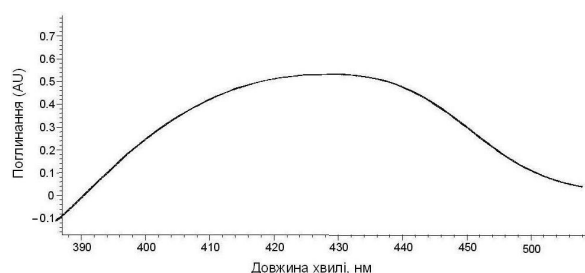


Рис. 3. УФ-спектр препарату, отриманий в умовах методики кількісного визначення флавоноїдів.

ТАБЛИЦЯ 1

## Результати визначення показників якості фітопрепарату

Показники	Результати випробувань для різних серій		
	серія 11006	серія 20807	серія 30308
Опис	відповідає	відповідає	відповідає
Ідентифікація: - Терпеноїди - Флавоноїди. Гідроксикоричні кислоти - Амінокислоти - Поліфенольні сполуки	відповідає відповідає відповідає відповідає	відповідає відповідає відповідає відповідає	відповідає відповідає відповідає відповідає
Сухий залишок	5,3%	5,6%	5,2%
Вміст етанолу	35%	35%	34%
Важкі метали	відповідає	відповідає	відповідає
Об'єм вмісту флакона	100 мл	100 мл	100 мл
Мікробіологічна чистота	відповідає	відповідає	відповідає
Кількісне визначення: вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин	0,31%	0,27%	0,33%

**Примітки:** показники достовірності:  $p < 0,05$ ;  $t = 2,75$ ;  $n = 5$ .

Об'єм вмісту пакування. Випробування слід проводити з 10 флаконів за допомогою мірного циліндра місткістю 250 мл. Об'єм вмісту пакування має бути не менше номінального (100 мл).

Мікробіологічна чистота. Методика випробування відповідає вимогам ДФУ 1.1 (2.6.12, 2.6.13., N) [10]. Перевірку придатності методики проводили відповідно до вимог ДФУ 1.1 (2.6.12, 2.6.13). Результати перевірки придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів засвідчили, що в умовах випробування в присутності випробовуваного зразка для кожного з тест-мікроорганізмів були отримані позитивні результати ідентифікаційних тестів при використанні різних партій рідких поживних середовищ, що свідчить про придатність методики випробування на окремі види мікроорганізмів.

Нормування мікробіологічної чистоти препарату встановлено відповідно до національної частини розділу 5.1.4 ДФУ, як для готових лікарських засобів категорії 3А. У препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше  $10^3$  бактерій в 1 мл і не більше  $10^2$  грибів в 1 мл; не допускається наявність бактерій родини Enterobacteriaceae в 1 мл, Staphylococcus aureus в 1 мл, Pseudomonas aeruginosa в 1 мл.

Результати випробування дослідно-промислових серій препарату наведені в табл. 1.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено методи контролю якості галенового препарату для лікування та профілактики алопеції.

2. Виходячи з фітохімічного та фармакологічного дизайну препарату, для ідентифікації в препараті обрані наступні класи біологічно активних речовин: терпеноїди, флавоноїди та гідроксикоричні кислоти, амінокислоти, поліфенольні сполуки.

3. Для проведення кількісного аналізу вирішено визначати вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин.

4. Встановлено, що за показниками вмісту етанолу, важких металів, об'єму вмісту флакона, сухого залишку, а також мікробіологічної чистоти фітопрепарат відповідає вимогам ДФУ.

5. Проведений аналіз трьох дослідно-промислових серій препарату за розробленими методами контролю якості засвідчив їх відповідність специфікації.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Практическая фитотерапия / Т.А.Виноградова, Б.Н.Гажев, В.М.Виноградов, В.К.Мартынов. – СПб.: Нева, 1998. – 638 с.
2. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.А.Буданцев, Е.Е.Лесиовская. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.
3. Котов А.Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України // Фармаком. – 2009. – №1. – С. 5-19.
4. Галкін О.Ю. Фітохімічний дизайн галенового препарату для лікування та профілактики різних форм алопеції / Біологічні дослідження молодих вчених в Україні: Матеріали X Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців (28-29 жовтня 2010 р., м. Київ). – К., 2010. – С. 16-17.
5. Галкін О.Ю. Фармакотерапевтичний дизайн галенового препарату для профілактики та лікування



- алопеції / Медична наука – 2010: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених (16-17 грудня 2010 р., м. Полтава). – Полтава, 2010. – С. 97.
6. Galkin O.Yu., Kotov A.G. Study of biologically active substances content in herbal preparation for the treatment and prevention of alopecia // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2011. – №1.
  7. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А.Ляпунова, В.А.Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой. – К.: МОРИОН, 2001. – 472 с.
  8. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / Под ред. Н.А.Ляпунова, В.А.Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой. – К.: МОРИОН, 1999. – 896 с.
  9. Руководство 42-3.1:2004. Руководства по качеству. Лекарственные средства. Фармацевтическая разработка. – Киев: Министерство здравоохранения Украины, 2004.
  10. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
  11. Державна Фармакопея України. Доп. 1 / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
  12. Державна Фармакопея України. Доп. 2 / Державне п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2008. – 620 с.
  13. Державна Фармакопея України. Доп. 3 / Державне п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2009. – 280 с.
  14. Товмасын Е.К., Гризодуб А.И., Котов А.Г. и др. К вопросу о стандартизации экстрактов и настоек в Государственной Фармакопее Украины // Фармаком. – 2003. – №4. – С. 13-16.
  15. European Pharmacopoeia, 5th Ed. – Strasburg, Council of Europe. – 2416 p.
  16. Солошенко Э.Н. Клинические разновидности алопеций: патогенез, дифференциальная диагностика, терапия // Международный медицинский журнал. – 2009. – №1. – С. 102-109.
  17. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам: в 2-х ч. Ч.II. / Под ред. О.Микеша; пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 381 с.

**А.Ю.Галкин, А.Г.Котов. Разработка методов контроля качества и исследование галенового препарата для лечения и профилактики алопеции. Киев, Харьков, Украина.**

**Ключевые слова:** фитопрепарат, корни лопуха, корневища аира, листья крапивы, шишки хмеля, плоды софоры, стандартизация, контроль качества, алопеция.

Разработаны методы контроля качества галенового препарата для лечения и профилактики алопеции, который представляет собой настойку из сбора лекарственного растительного сырья (корни лопуха, корневища аира, листья крапивы, шишки хмеля, плоды софоры). Для качественного анализа препарата проводили идентификацию терпеноидов, флавоноидов и гидроксикоричных кислот, аминокислот, полифенольных соединений. Для количественного анализа определяли содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Проведенный анализ трех опытно-промышленных серий препарата по разработанным методам контроля качества показал их соответствие спецификации.

**A.Yu.Galkin, A.G.Kotov. Development of quality control methods and analysis of herbal preparation for treatment and prevention of alopecia. Kyiv, Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** phytopreparation, burdock roots, rhizomes of calamus, nettle leaves, hop cones, fruits, Sophora, standardization, quality control, alopecia.

The methods of quality control of herbal preparation for treatment and prevention of alopecia has been developed. Preparation is tincture of collecting medicinal plants (the roots of burdock root calamus, nettle leaves, hop cones, the fruits of Sophora). For a qualitative analysis of the preparation identification of terpenoids, flavonoids and hydroxycinnamic acids, aminoacids, polyphenolic compounds has been carried out. For quantitative analysis of total flavonoid content (in terms of routines) has been determined. The analysis of three pilot lots of the preparation in accordance with the developed quality control methods demonstrated their compliance with specifications.

Надійшла до редакції 18.02.2011 р.