

УДК 615.32: 547.972+543.544

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО

© 2011 А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Е.В. Авдеева

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 30.08.2011

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) изучен компонентный состав цветков бессмертника песчаного и лекарственного средства «Фламина таблетки» и определено, что в обоих случаях доминирующим флавоноидом является изосалипурпозид. Разработана методика количественного определения содержания изосалипурпозидов в лекарственном средстве «Фламина таблетки» с использованием ВЭЖХ при длине волны 360 нм (стационарная фаза «Диасорб С-16», элюентная система – ацетонитрил: вода в соотношении 25:75 с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты). Обоснована целесообразность использования в методиках анализа ГСО изосалипурпозидов. Содержание изосалипурпозидов в препарате «Фламина таблетки» варьирует от 10,35 мг до 11,05 мг в одной таблетке. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения изосалипурпозидов в лекарственном средстве «Фламина таблетки» с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,03\%$.

Ключевые слова: *бессмертник песчаный Helichrysum arenarium (L.) Moench., флавоноиды, изосалипурпозид, спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография*

Флавоноиды как биологически активные соединения обладают широким спектром фармакологического действия и являются уникальным источником желчегонных, гепатопротекторных и антиоксидантных лекарственных средств [2, 3, 7]. Одним из перспективных источников препаратов желчегонного и гепатопротекторного действия являются цветки бессмертника песчаного *Helichrysum arenarium (L.) Moench.* [1-3]. В настоящее время в медицинской практике широко применяются такие лекарственные средства, как настой, жидкий экстракт, «Фламин», желчегонные сборы, однако по-прежнему проблемы стандартизации сырья и препаратов не решены в полной мере, в том числе в плане унификации. Это связано с тем, что в отношении химического состава цветков бессмертника песчаного литературные данные довольно противоречивы. Согласно им

в цветках бессмертника песчаного к преобладающим флавоноидам относятся халкон изосалипурпозид, флаваноны салипурпозид, прунин и нарингенин [2-7], однако нет единой точки зрения, какой из этих компонентов является доминирующим. В бессмертнике песчаном содержится также ряд сопутствующих веществ, включая кумарины, коричные кислоты, фталиды, полисахариды и др. [2], которые вносят вклад в спектральные характеристики анализируемых извлечений, что, на наш взгляд, может приводить к завышению результатов анализа.

Цель исследований – разработка методики количественного определения изосалипурпозидов в лекарственном средстве «Фламина таблетки» с использованием ВЭЖХ.

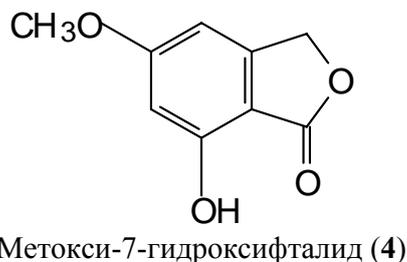
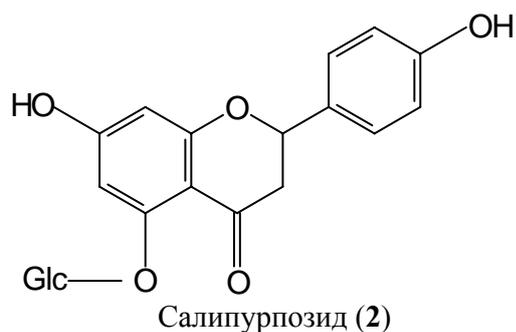
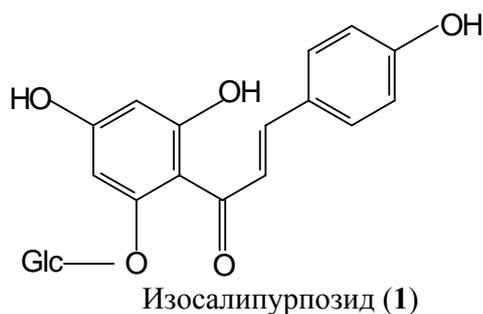
Материал и методы. Исследовали образцы цветков бессмертника песчаного, собранные в различных регионах РФ, промышленные образцы сырья производства ОАО «Красногорсклекарств» (Московская обл.), а также образцы лекарственного средства «Фламина таблетки» (АО «Галичфарм», г. Львов). В ходе разработки методики количественного определения изосалипурпозидов в цветках бессмертника песчаного изучены УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из данного сырья, а также растворов изосалипурпозидов (1), салипурпозидов (2), 5,7-дигидроксифталида (3) и 5-гидрокси-7-метоксифталида

Куркина Анна Владимировна, кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: Annushkae@yandex.ru

Рыжов Виталий Михайлович, кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: lavr_vmt@mail.ru

Авдеева Елена Владимировна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: avdeeva.ev@gmail.com

(4), выделенных из цветков бессмертника песчаного.



Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). В основу разработанной нами методики количественного определения положены следующие оптимальные параметры: экстракция сырья 70% этиловым спиртом в течение 1 часа в условиях кипения в соотношении 1:50 [4]. ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-5» в следующих условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме: колонка КАХ (2 мм × 80 мм), стационарная

фаза «Диасорб С-16», элюентная система – ацетонитрил: вода в соотношении 25:75 с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл. Детекцию веществ осуществляли при пяти длинах волн 254, 270, 290, 330 и 360 нм. Выбор длин волн обусловлен тем, что исследуемые вещества имеют максимумы поглощения при 372 нм (изосалипурпозид), 284 нм (салипурпозид), 256 нм и 292 (5,7-дигидроксифталид, 5-гидрокси-7-метоксифталид), 330 нм (гидроксикоричные кислоты). Опорная и аналитическая длина волны при разметке пиков – 360 нм, так как целевым анализируемым веществом является изосалипурпозид, имеющий максимум поглощения при длине волны 372 нм (рис. 1).

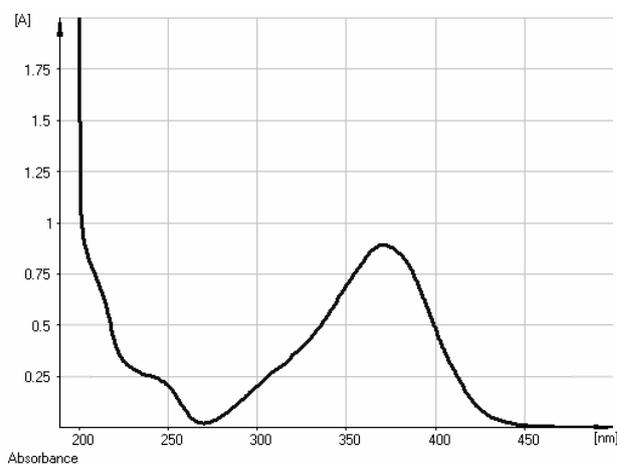


Рис. 1. УФ-спектр раствора изосалипурпозид

Результаты и их обсуждение.

Сравнительное исследование извлечения из цветков бессмертника песчаного (рис. 2) и раствора лекарственного средства «Фламина таблетки» (рис. 3) показало, что, несмотря на некоторые различия в их компонентном составе, в обоих случаях доминирующим компонентом является изосалипурпозид. Сравнение значений времени удерживания пиков веществ (пики 1-5) на ВЭЖХ-хроматограмме извлечения из цветков бессмертника песчаного (рис. 2) и раствора лекарственного средства «Фламина таблетки» (рис. 3), а также времени удерживания пиков индивидуальных веществ (рис. 4-7, табл. 1) позволило идентифицировать четыре соединения (1-4), среди которых доминирующим является изосалипурпозид (1).

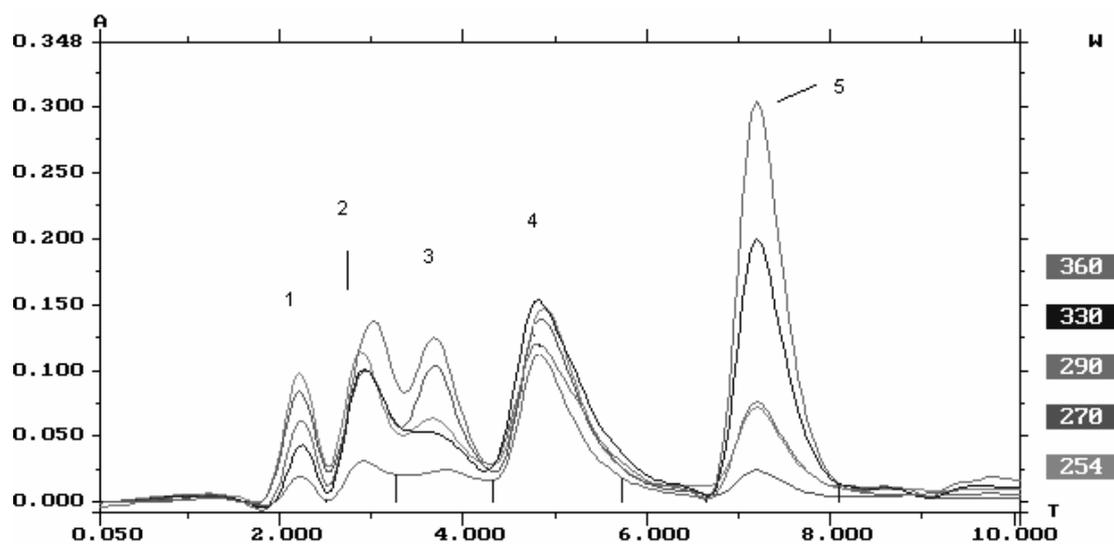


Рис. 2. Схема ВЭЖХ-хроматограммы извлечения из цветков бессмертника песчаного (здесь и далее номера пиков веществ соответствуют таковым в таблице 1)

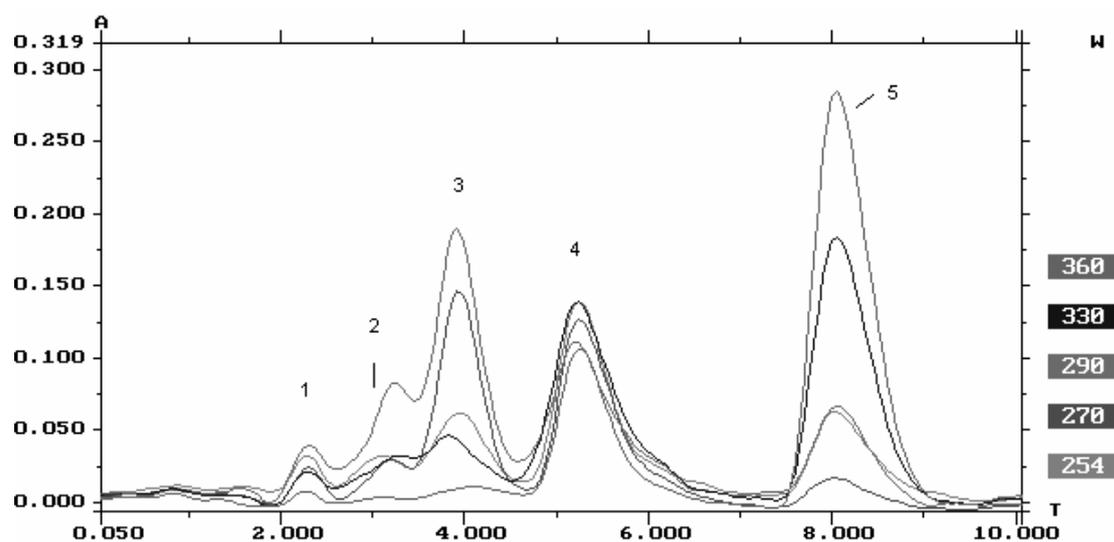


Рис. 3. Схема ВЭЖХ-хроматограммы раствора препарата «Фламина таблетки»

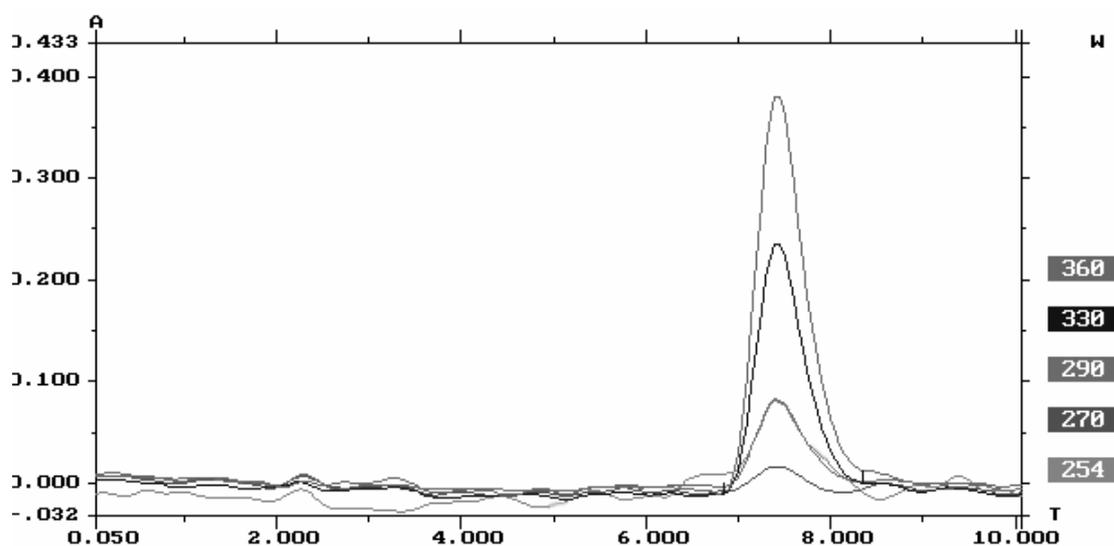


Рис. 4. Схема ВЭЖХ-хроматограммы изосалипурпозиды (1)

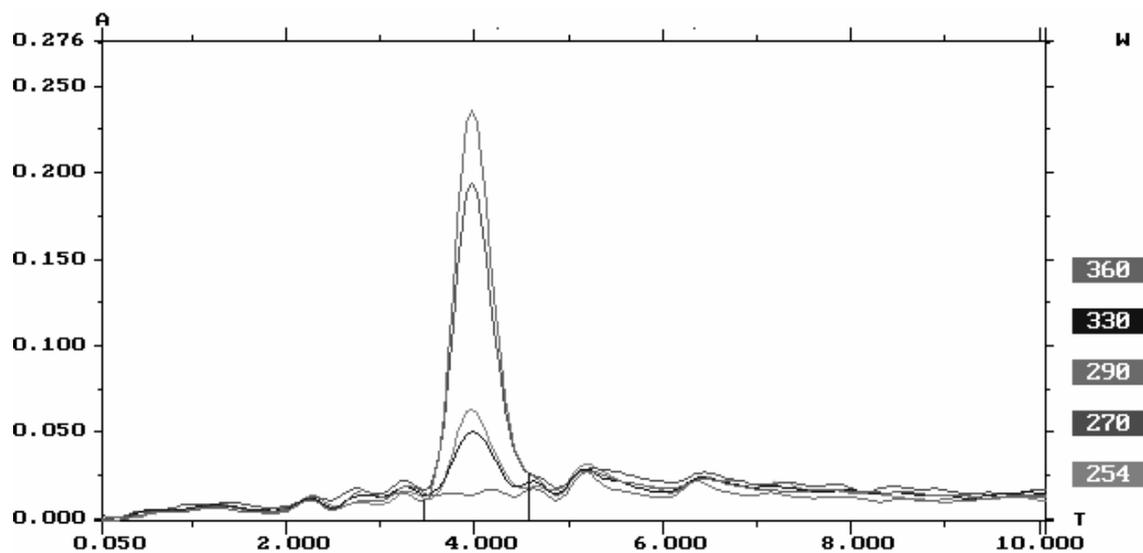


Рис. 5. Схема ВЭЖХ-хроматограммы салициловой кислоты (2)

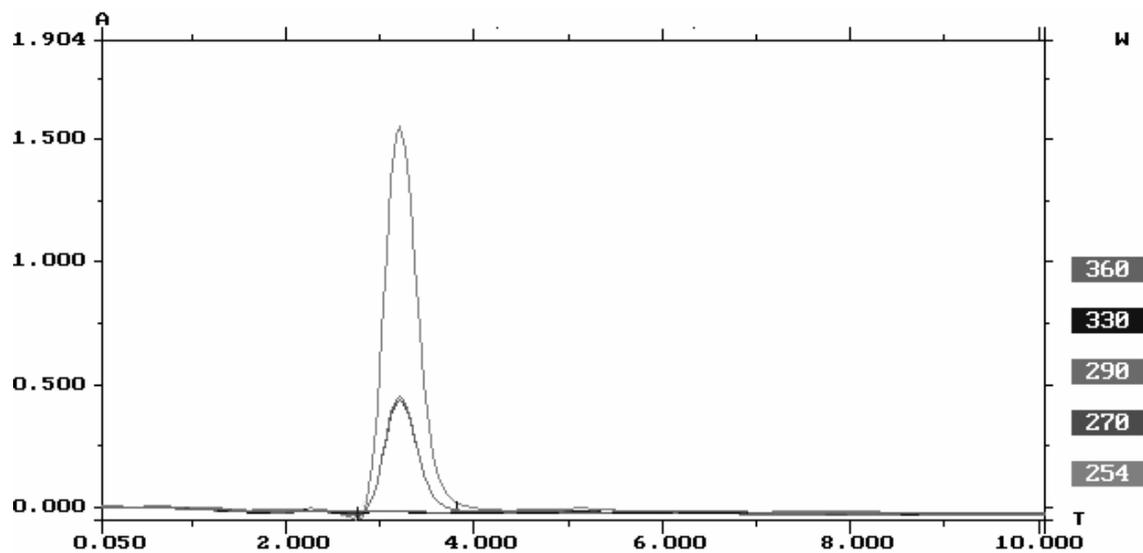


Рис. 6. Схема ВЭЖХ-хроматограммы 5,7-дигидроксикумарина (3)

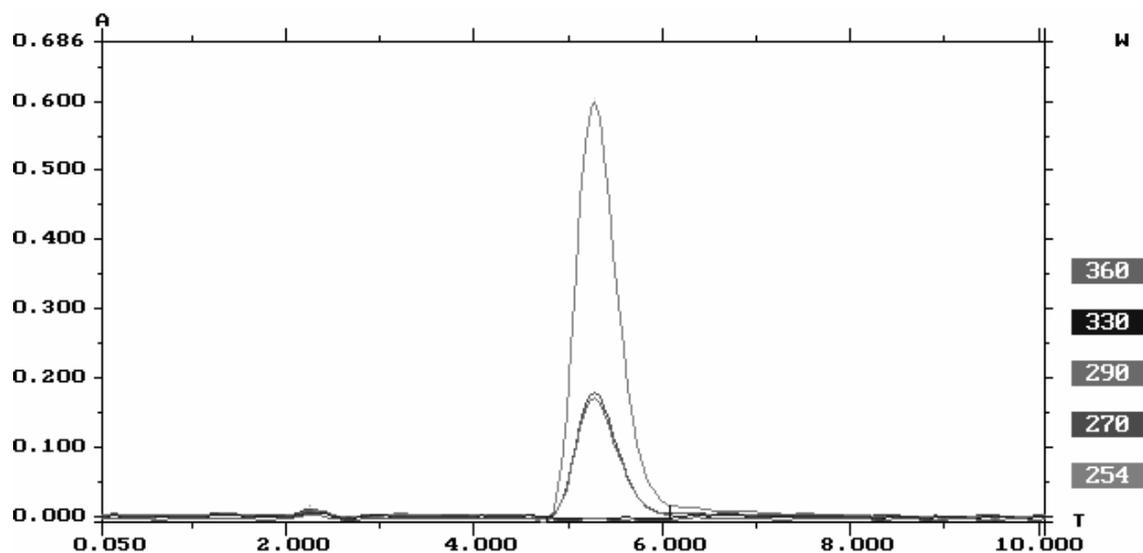


Рис. 7. Схема ВЭЖХ-хроматограммы 5-метокси-7-гидроксикумарина (4)

Таблица 1. Время удерживания пиков веществ цветков бессмертника песчаного и препарата «Фламина таблетки» на хроматограммах

Вещество	№ пика на хроматограмме	Время удерживания на хроматограмме, мин		
		извлечение из сырья	фламин	вещество
изосалипурпозид (1)	5	7,198	7,953	7,399
салипурпозид (2)	3	3,795	3,926	3,976
5,7-дигидроксифталид (3)	2	2,919	2,975	3,221
5-метокси-7-гидроксифталид (4)	4	4,832	5,184	5,285
вещество неидентифицированное	1	2,215	2,265	-

Методика количественного определения изосалипурпозидов в лекарственном средстве «Фламина таблетки». Около 0,3 г

(точная навеска) порошка измельченных таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл 95% спирта, растворяют содержимое колбы при перемешивании в течение 30 мин, доводят объем раствора до метки 95% спиртом и затем фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл (испытуемый раствор). 5 мкл испытуемого раствора вводят в жидкостной хроматограф «Милихром-5» с УФ-детектором. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме: колонка КАХ (2×80 мм), стационарная фаза «Диасорб С-16», элюентная система – ацетонитрил: вода в соотношении 25:75 с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин. Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений. Параллельно 5 мкл раствора ГСО изосалипурпозидов вводят в хроматограф и хроматографируют как описано выше. Проводят определение высоты пика ГСО изосалипурпозидов и рассчитывают среднюю высоту пика по результатам 3-х определений. Определяют время выхода и идентифицируют пик изосалипурпозидов на хроматограмме испытуемого раствора. Измеряют высоту пика изосалипурпозидов на хроматограмме и рассчитывают среднюю высоту пика по трем параллельным определениям.

Содержание изосалипурпозидов в одной таблетке лекарственного средства «Фламина таблетки» в граммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{Hm_0VV_1P_{cp}}{H_0mV_0V_2};$$

где H – среднее значение высоты пика изосалипурпозидов испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца, мм; H_0 – среднее значение высоты пика раствора ГСО изосалипурпозидов, вычисленное из хроматограмм раствора ГСО изосалипурпозидов, мм; V – объем испытуемого раствора, мл; V_1 – объем вводимой пробы испытуемого раствора, мкл; V_0 – объем раствора ГСО изосалипурпозидов, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора ГСО изосалипурпозидов, мкл; m – масса навески, г; m_0 – масса ГСО изосалипурпозидов, г; P_{cp} – средняя масса таблетки, г.

Приготовление раствора изосалипурпозидов-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска) изосалипурпозидов помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20-30 мл 95% этилового спирта, доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки и перемешивают.

Содержание изосалипурпозидов в лекарственном препарате «Фламина таблетки» варьирует в пределах от 10,35 мг до 11,05 мг в одной таблетке.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания изосалипурпозидов лекарственного средства «Фламина таблетки» с доверительной вероятностью 95% составляет ±4,03% (табл. 2). Опыты с добавками ГСО изосалипурпозидов к навеске препарата показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения изосалипурпозидов в одной таблетке лекарственного средства «Фламина таблетки»

f	\bar{X}	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
10	10,35 мг	0,1870	95	2,23	$\pm 0,417$	$\pm 4,03$

Выводы:

1. С использованием ВЭЖХ-анализа изучен компонентный состав цветков бессмертника песчаного и лекарственного средства «Фламина таблетки» и определено, что в обоих случаях доминирующим флавоноидом является изосалипурпозид.

2. Разработана методика количественного определения содержания изосалипурпозидов в лекарственном средстве «Фламина таблетки» и обоснована целесообразность использования в методике ВЭЖХ-анализа ГСО изосалипурпозидов.

3. Содержание изосалипурпозидов в лекарственном препарате «Фламина таблетки» варьирует от 10,35 мг до 11,05 мг в одной таблетке. Ошибка единичного определения изосалипурпозидов в лекарственном средстве «Фламина таблетки» с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,03\%$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Государственная Фармакопея СССР. Одиннадцатое издание. Вып. 2. – М.: Медицина, 1990. 400 с.
2. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд. перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. 1239 с.
3. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. 963 с.
4. Куркина, А.В. Новые подходы к стандартизации сырья бессмертника песчаного - *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. // Традиционная медицина. 2010. № 1. С. 45-49.
5. Куркина, А.В. Определение содержания изосалипурпозидов в цветках бессмертника песчаного / А.В. Куркина, В.М. Рыжов // Фармация. 2011. № 1. С. 12-14.
6. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). – СПб.: Наука, 1993. 352 с.
7. Wagner, H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. – Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag, 1993. 522 s.

PROSPECTS OF USE THE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR STANDARDIZATION OF RAW MATERIALS AND PREPARATIONS OF *HELICHRYSUM ARENARIUM*

© 2011 A.V. Kurkina, V.M. Ryzhov, E.V. Avdeeva

Samara State Medical University

By the method of high performance liquid chromatography (HPLC) it was studied componental structure of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. flowers and a medical product of “Flamin” in tablets and was defined that in both cases dominating flavonoid is isosalipurposide. The method of quantitative definition of isosalipurposide maintenance in medical product of “Flamin” in tablets with the use of HPLC is developed at wave length of 360 nanometers (stationary phase «Diasorb C-16», eluent system – an acetonitrile: water in ratio 25:75 with addition of 1% ice acetic acid). The expediency of use in methods of SSS isosalipurposide analysis is proved. Isosalipurposide maintenance in preparation “Flamin” in tablets varies from 10,35 mg to 11,05 mg in one tablet. Results of statistical processing of the spent experiences testify that an error of isosalipurposide individual definition in medical product “Flamin” in tablets with confidential probability of 95% makes $\pm 4,03\%$.

Key words: *Helichrysum arenarium* (L.) Moench., flavonoids, isosalipurposide, spectrophotometry, high performance liquid chromatography

Anna Kurkina, Candidate of Pharmacy, Assistant at the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: Annushkae@yandex.ru

Vitaliy Ryzhov, Candidate of Pharmacy, Assistant at the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: lavr_rvm@mail.ru

Elena Avdeeva, Doctor of Pharmacy, Professor at the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: avdeeva.ev@gmail.com