

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ «СПОРТ-АКТИВ» МЕТОДОМ ВЭЖХ

© 2011 Е.В. Компанцева¹, Д.В. Компанцев², Я.И. Биляч², В.Н. Леонова¹

¹Пятигорская государственная фармацевтическая академия

²ООО «НПП Демиург», г. Пятигорск

Поступила в редакцию 19.05.2011

Разработана методика определения фитоэкдистероидов в лекарственном средстве «Спорт-актив, гранулы». Найдены условия и разработана ВЭЖХ-методика количественного определения ФЭС с применением в качестве внутреннего стандарта парацетамола. Это дает возможность оценки качества гранул, содержащих экстракт левзеи, при одновременном присутствии других компонентов гранул. Установлено, что данная методика специфичная, воспроизводимая и не отягощена систематической ошибкой.

Ключевые слова: *экстракт левзеи сафлоровидной, фитоэкдизоны, гранулы «Спорт-актив»*

Проблема повышения физической работоспособности и ускорения протекания восстановительных процессов после физических нагрузок всегда представляла большой интерес для медицинской науки. В последние годы эта проблема не только не разрешается, но и усугубляется в связи с изменением характера человеческого труда, распространением психоэмоциональных стрессов; вредными воздействиями окружающей среды и интенсификацией производственной деятельности. Это, в первую очередь, касается лиц, занятых в тех сферах деятельности, где физическая работоспособность является неотъемлемым условием выполнения поставленных задач. В настоящее время существует возможность создания лекарственных средств (ЛС), которые позволяют добиться нужного эффекта и не относятся к «допингу». Ключевое положение в группе ЛС, которые не являются допингами и могут быть рекомендованы для повышения физической работоспособности, занимают нестероидные вещества растительного происхождения – представители так называемых фитоэкдизонов, выделяемых из корней левзеи сафлоровидной. Еще одним ЛС является калия оротат, применяемый в целях профилактики нарушений со стороны миокарда при напряженных физических нагрузках. Определенный практический интерес в плане влияния на физическую работоспособность представляет ЛС кальция глицерофосфат, проявляющий как общеукрепляющее и тонизирующее действие, так и усиливающий метаболические

процессы. Кроме того, включение глюкозамина сульфата в состав комбинированного ЛС также оправдано, так как физические нагрузки могут привести к функциональным перегрузкам, травмам и заболеваниям опорно-двигательного аппарата, в решении данной задачи хондропротекторные ЛС занимают ведущее место.

Цель работы: разработка методики количественного определения одного из главных компонентов ЛС «Спорт-актив» – фитоэкдистероидов (ФЭС) экстракта левзеи.

Для количественного определения ФЭС экстракта левзеи в ФС 42-1995-99 используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и внешний стандарт – экдистерон. Но наиболее эффективным является вариант ВЭЖХ в сочетании с методом внутреннего стандарта (ВС), позволяющий существенно повысить точность количественного определения индивидуальных соединений при анализе сложных по составу образцов [1]. В качестве ВС предлагается использовать парацетамол (ФС 42-0268-07), содержащий фенильный хромофор с максимумом полосы поглощения в области 238 нм, что практически совпадает с максимумом полосы поглощения хромофора (C = C – C = O) в структуре ФЭС (242 нм). В условиях, предлагаемых по ФС 42-1995-99, на хроматограмме раствора содержащего стандартный образец (СО) экдистерона и парацетамола фиксировали 2 пика, при этом коэффициент разделения пиков составил 0,11. Также оказались неудовлетворительными такие показатели, как эффективность (не более 10³ теоретических тарелок), время удерживания парацетамола (2 мин) и коэффициент асимметрии пика (3-4). Таким образом, предлагаемая система по ФС 42-1995-99 оказалась непригодной для определения суммы ФЭС с использованием внутреннего стандарта.

Компанцева Евгения Владимировна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии

Компанцев Дмитрий Владиславович, кандидат фармацевтических наук, директор. E-mail: sustavit@yandex.ru

Биляч Ярослав Иванович, кандидат фармацевтических наук, младший научный сотрудник

Леонова Виктория Нодарьевна, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры фармацевтической химии

Материал и методика. Для определения ФЭС в экстракте левзеи нами предложена следующая методика: 5,0 мл экстракта левзеи жидкого помещали в колбу вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл спирта этилового 60%, тщательно перемешивали в течение 10-15 мин, фильтровали через бумажный фильтр, пропускали через концентрирующий патрон «Диапак 130-С 16-Т» со скоростью 0,5-1,0 мл/мин. Сумму ФЭС селективно элюировали с сорбента 10 мл спирта этилового 60%. Элюат собирали в мерную колбу емкостью 25 мл, вносили 2 мл раствора парацетамола в элюенте ($C \approx 0,675$ мг/мл) и доводили до метки спиртом этиловым 60%. 3 мкл полученного раствора испытуемого образца подвергали хроматографированию. ВЭЖХ-анализ каждого образца проводили 3 раза.

Условия проведения анализа суммы ФЭС в жидком экстракте левзеи с использованием внутреннего стандарта: внутренний стандарт: парацетамол (п-ацетаминифенол); колонка: 80 x 2 мм сорбент «Диасорб 130-С16-Т»; размер частиц сорбента: 6 мкм; длина волны 242 нм; состав подвижной фазы: вода-этанол-бутанол (72,4: 26,8: 0,8); скорость потока элюента: 50 мкл/мин; объем вводимой пробы: 3 мкл; режим: изократическое элюирование; общее время анализа: 15 мин. Регистрацию и математическую обработку результатов ВЭЖХ-анализа осуществляли с помощью универсальной компьютерной системы сбора и обработки хроматографической информации «Полихром для Window».

Приготовление раствора парацетамола. Около 0,675 г (точная навеска) парацетамола – стандартного образца ФС 42-0268-07, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл подвижной фазы и перемешивали в течение 15 мин. Затем доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали. 10 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор хранят в темном месте в колбе с притертой пробкой. Срок годности 1 мес.

Приготовление СО экидистерона: около 0,15 г (точная навеска) экидистерона – стандартного образца (ВФС 42-1713-87) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 20 мл спирта этилового 95% и перемешивали. Затем доводили объем раствора спирта этилового 95% до метки и перемешивали. 7 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор хранили в темном месте в колбе с притертой пробкой. Срок годности 1 мес.

Далее для исследования линейности готовили растворы с концентрациями 0,1-1,1 мг/мл экидистерона и 0,01-0,11 мг/мл парацетамола. Зависимость площади пика от концентрации носила линейный характер для обоих компонентов в

указанных областях концентраций. Уравнения имели следующий вид: $y=2892x-109,5$ и $y=1303x-32$ для экидистерона и парацетамола соответственно. На основании данных, полученных при определении линейности, вычисляли калибровочный коэффициент ($K_{x/cm}$) по формуле:

$$K_{x/cm} = \frac{S_{cm} a_x}{S_x a_{cm}} = \frac{S_{cm}}{S_x} \times 10$$

где S_x – площадь хроматографического пика экидистерона, мВ x с; S_{cm} – площадь пика ВС, мВ x с; a_x – масса экидистерона в пробе, г; a_{cm} – масса парацетамола в пробе, г.

Содержание ФЭС в экстракте левзеи в % (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{\sum S \times a_{cm} \times V1_{cm} \times V2_{cm} \times K}{S_{cm} \times a \times W_{cm1} \times W_{cm2}} 100\% = \frac{\sum S \times a_{cm} \times K}{S_{cm} \times 25};$$

где $\sum S$ – площадь хроматографического пика ФЭС, мВ x с; S_{cm} – площадь пика парацетамола, мВ x с; a – количество экстракта левзеи взятого на анализ; K – калибровочный коэффициент ФЭС.

Методика количественного определения ФЭС экстракта левзеи в лекарственном средстве «Спорт-актив»: около 5,0 г гранул (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 60%, тщательно перемешивали в течение 10-15 мин, фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат (раствор А) анализировали в опийсанных выше условиях. Содержание ФЭС в модельных смесях и в гранулах в г (X) в пересчете на одну дозу гранул вычисляли по формуле:

$$X = \frac{\sum S \cdot a_{cm} \cdot V_{1cm} \cdot V_{2cm} \cdot K \cdot P}{S_{cm} \cdot a \cdot W_{cm1} \cdot W_{cm2}},$$

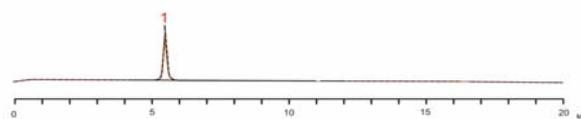
где $\sum S$ – сумма площадей хроматографических пиков ФЭС, мВ x с; S_{cm} – площадь пика парацетамола, мВ x с; a – количество модельной смеси, взятой на анализ; a_{cm} – масса СО парацетамола, мг; K – калибровочный коэффициент; P – масса одной дозы гранул.

Для проверки специфичности методики готовили модельную смесь плацебо. Проверку правильности методики проводили на трехуровневом эксперименте по 9 последовательным определениям точно известной концентрации суммы ФЭС экстракта левзеи, находящейся в пределах аналитической зоны 50-150%. Для этого использовали растворы модельных смесей гранул с содержанием экстракта левзеи соответственно 2,5 мл, 5,0 мл, 7,5 мл. Объемы экстракта левзеи помещали в колбы вместимостью

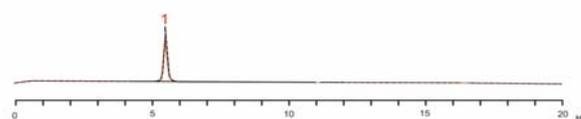
100 мл, добавляли 2,0000 г кальция глицерофосфата (точная навеска), 2,0000 г калия оротата (точная навеска), 0,7500 г глюкозамина сульфата, 50 мл спирта этилового 60%, тщательно перемешивали в течение 10-15 мин, фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат (раствор А) использовали для анализа. Параллельно готовили модельную смесь гранул без экстракта левзеи (плацебо). Полученный раствор А пропускали через концентрирующий патрон «Диапак 130-С 16-Т» со скоростью 0,5-1,0 мл/мин и далее поступали как описано в методике определения ФЭС экстракта левзеи жидкого. Для определения линейности данной методики строили градуировочный график из усредненных значений оптической плотности, полученных при определении правильности методики.

Результаты и их обсуждение. При использовании внешнего стандарта (0,1-1,1 мг/мл экидистерона) и внутреннего стандарта (0,01-0,11 мг/мл парацетамола) поправочный коэффициент составил $5,17 \pm 0,14$, что позволяет использовать его для расчета содержания суммы ФЭС в экстракте левзеи жидком с использованием внутреннего стандарта – парацетамола.

Хроматограммы определения суммы ФЭС в модельной смеси гранул и плацебо, полученные по вышеизложенной методике, представлены на рис. 1а и 1б. Как следует из рис. 1а в модельной смеси плацебо отсутствуют пики экидистерона и других ингредиентов модельной смеси, что позволяет проводить количественное определение суммы ФЭС в присутствии глюкозамина сульфата, калия оротата, кальция глицерофосфата и вспомогательных веществ при их совместном присутствии, т.е. методика специфична.



а



б

Рис. 1. Хроматограмма экидистероидов в составе модельной смеси плацебо (а) и модельной смеси №1 (б): 1 – парацетамол, 2 – экидистерон, 3 – неидентифицированный компонент

Определение правильности методики проводили методом добавок. Предварительно по вышеописанной методике определили сумму ФЭС в экстракте левзеи жидком, которая оказалась равной 1,28% (по ФС 42-1995-99 не менее 1%). Таким образом, в одной дозе гранул, исходя из полученных данных, содержание суммы ФЭС оказалось равным 0,064 г. Результаты определения правильности методики представлены в табл. 1. Как следует из таблицы 1 с помощью метода добавок установлено, что данная методика неотягощена систематической ошибкой. Определение воспроизводимости методики проводили на одной серии гранул (табл. 2).

Таблица 1. Установление правильности результатов определения ФЭС методом ВЭЖХ (Внешний стандарт СО парацетамол $S_{ст}, mV \cdot сек = 850,35; a = 0,6751$)

	Внесено добавки, г	Sx, mV*сек	Найдено добавки экидистерона		Метрологические характеристики
			%	г	
50	0,032	11444,9	94,2	0,0301	$X_{ср} = 97,69$ $S_{ср} = 3,94$ $\Delta X_{ср} = 3,94$ $RSD = 4,03$ $\epsilon, \% = 3,17$ $t_{расч} = 1,76$ $t_{табл} = 2,36$
	0,032	11479,2	94,3	0,0302	
	0,032	11463,1	93,5	0,0299	
100	0,064	15705,2	101,2	0,0648	
	0,064	15188,9	94,5	0,0605	
	0,064	15759,2	101,9	0,0652	
150	0,096	19770,1	102,1	0,0980	
	0,096	19786,3	102	0,0979	
	0,096	19601,3	95,5	0,0917	

Таблица 2. Результаты количественного определения ФЭС в лекарственном препарате (Внешний стандарт СО парацетамол $S_{ст}, mV \cdot сек = 850,35; a = 0,6751$)

Взято, г	Sx, mV*сек	Найдено ФЭС, г	Метрологические характеристики
5,0231	8135,0088	0,0668	$X_{ср} = 0,0645$ $S_{ср} = 0,0007$ $\Delta X_{ср} = 0,0019$ $RSD = 2,97$ $\epsilon, \% = 3,1$
5,0140	7532,5573	0,0618	
5,0012	7668,6568	0,0630	
5,0113	7910,4876	0,0649	
5,0042	8008,5768	0,0657	
5,0041	7863,4236	0,0646	

Как следует из таблицы 2, предлагаемая методика характеризуется хорошей воспроизводимостью – RSD не превышает 3% [2]. Хроматографическая система пригодна для анализа с использованием разработанной методики при условии эффективности хроматографической колонки по пику экидистерона не менее 5000 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии пиков близок к 1. Нами также установлено, что линейная зависимость наблюдается в интервале концентрации от 0,005 до 0,022 мг/в пробе. Уравнение имеет вид: $y=119607x+359,86$. Коэффициент корреляции равен 0,998.

Выводы: разработана методика ВЭЖХ-анализа, которая дает возможность оценки качества гранул, содержащих экстракт левзеи, при одновременном присутствии кальция глицерофосфата,

калия оротата и глюкозамина сульфата. С помощью валидации установлено, что данная методика специфичная, воспроизводимая и не отягощена систематической ошибкой. Она характеризуется достаточно высокой чувствительностью и рекомендуется для выполнения массовых анализов, а также для технологического контроля при производстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Сапрыкин, Л.В. Динамическое модифицирование в практике ВЭЖХ // Химический анализ. 2005. №1. С. 20-36.
2. Эштейн, Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фармац. журн. 2004. Т.38, № 4. С. 40-56.

DEFINITION OF PHYTOECDISTEROIDS MAINTENANCE IN THE MEDICAL PRODUCT "SPORT ACTIVE" BY HELC-METHOD

© 2011 E.V. Kompantseva¹, D.V. Kompantsev², Yu.I. Bilyach², V.N. Leonova¹

¹Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy

²LLC «SPE Demiurge», Pyatigorsk

The technique of phytoecdisteroids (PES) definition in the medical product «Sport active, granules» is developed. Conditions are found and HELC-method of quantitative definition of PES with application as the internal standard of paracetamol is developed. It gives the chance of estimations the quality of granules containing *Rhaponticum carthamoides* extract, at simultaneous presence of other components of granules. It is established that the given technique specific, reproduced and isn't burdened by a regular error.

Key words: *Rhaponticum carthamoides* extract, phytoecdizones, "Sport active" granules

Evgeniya Kompantseva, Doctor of Pharmacy, Professor at the Pharmaceutical Chemistry Department

Dmitriy Kompantsev, Candidate of Pharmacy, Director.

E-mail: sustavit@yandex.ru

Yaroslav Bilyach, Candidate of Pharmacy, Minor Research Fellow

Viktoriya Leonova, Candidate of Pharmacy, Lecturer at the Pharmaceutical Chemistry Department