

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТИ РОЗМАРИНОВОЇ У ТАБЛЕТКАХ,
ЯКІ МІСТЯТЬ СУХІ ЕКСТРАКТИ ВАЛЕРІАНИ І МЕЛІСИ ТА ГЛІЦИН**

Розроблено методику кількісного визначення кислоти розмаринової в таблетках на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину. Вивчено основні валідаційні характеристики методики. Показано, що методика придатна для контролю вмісту сухого екстракту меліси у таблетках на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: таблетки, сухі екстракти валеріани і меліси, гліцин, кислота розмаринова, високоефективна рідинна хроматографія.

ВСТУП. Порівняльний аналіз фармакопейних вимог вказує на те, що різні країни регламентують якість сировини меліси лікарської за різними критеріями. В Державній Фармакопеї України немає фармакопейної статті ні на траву меліси лікарської, ні на її екстракти. Фармакопея Австрії регламентує якість трави за вмістом ефірної олії. За вимогами Європейської Фармакопеї 5, 6 видань, якість сировини листя меліси контролюють за вмістом суми гідроксицианомових похідних у перерахунку на кислоту розмаринову. В умовах кількісного визначення вони утворюють сполуку рожево-червоного забарвлення з максимумом поглинання 505 нм. Дану методику визначення можна застосовувати при стандартизації трави, листя, екстрактів і настоек меліси. Враховуючи те, що в розробленому лікарському засобі присутня й інша сировина, яка може мати сполуки, що аналогічно реагують з нітрит-молібденовим реактивом, то визначення БАР меліси лікарської не можна проводити методом спектрофотометрії. При валідації аналітичної методики вона не пройде тест на специфічність, вміст фенолкарбонових кислот буде завищеним. Оптимальним методом аналізу комплексного препарату є ВЕРХ – цей метод дозволить розділити й одночасно кількісно визначити фенолкарбонові кислоти, а отже, селективно і достовірно провести аналіз на вміст екстракту меліси за присутності інших компонентів таблеток [3, 5, 6].

Метою роботи було розробити методику кількісного визначення кислоти розмаринової в таблетках, що містять сухі екстракти валеріани і меліси та гліцин.

вої в таблетках, що містять сухі екстракти валеріани і меліси та гліцин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вимірювання проводили на рідинному хроматографі "Agilent". Стандартний розчин кислоти розмаринової готували шляхом розчинення стандартного зразка кислоти розмаринової (фірма "Aldrich") у 50 % етиловому спирті.

Інші використовувані розчини реактивів готували відповідно до вимог ДФУ. Приготування випробуваного розчину та розчину порівняння описано нижче.

Випробуваний розчин. 0,9000 г порошку розтертих таблеток поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл зі шліфом, додають 70 мл 0,85 % розчину кислоти фосфорної Р, перемішують, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 15 хв, охолоджують і переносять кількісно у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину до 100 мл 0,85 % розчином кислоти фосфорної Р. Отриманий розчин фільтрують або центрифугують.

Розчин порівняння кислоти розмаринової. 50 мг стандартного зразка кислоти розмаринової Р розчиняють у 0,85 % розчині кислоти фосфорної і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 3,0 мл отриманого розчину доводять 0,85 % розчином кислоти фосфорної до об'єму 50,0 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:
– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м×4 мм, заповнена *силікагелем октадецил-*

силільним для хроматографії P із розміром частинок 5 мкм;

- рухома фаза: 0,85 % розчин кислоти фосфорної P – метанол P (60:40);
- швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв в ізократичному режимі елюювання;
- детектування за довжини хвилі 320 нм;
- об'єм проби, що вводиться, 10 мкл.

Хроматографують випробуваний розчин і розчин порівняння почергово, отримуючи по п'ять хроматограм для кожного розчину.

Вміст кислоти розмаринової (X), у грамах, рахуючи на середню масу таблетки, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A_2 \cdot m_1 \cdot P \cdot 3}{A_1 \cdot 50 \cdot m_2 \cdot 100} \cdot b,$$

де A_1 – середня площа піку кислоти розмаринової на хроматограмі розчину порівняння;

A_2 – середня площа піку кислоти розмаринової на хроматограмі випробуваного розчину;

m_1 – маса наважки кислоти розмаринової, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;

m_2 – маса наважки порошку розтертих таблеток, у грамах;

P – вміст кислоти розмаринової у стандартному зразку за даними паспорта, у відсотках;

b – середня маса таблетки, у грамах.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При розробці ВЕРХ-методики ідентифікації кислоти розмаринової в складі таблеток нами були проведені попередні дослідження хроматографічної поведінки згаданої речовини у різних хроматографічних умовах. Випробувано різні склади водно-органічних середовищ, які описані в літературі та у ДФУ для ЛРС, що містить фенолкарбоніві кислоти. Оптимальною, виходячи з багатьох міркувань, як аналітичних, так і економічних, на нашу думку, є суміш 0,85 % розчину кислоти фосфорної і метанолу, взятих у співвідношенні 60:40 відповідно. Застосування даної рухомої фази дозволяє провести елюювання в ізократичному режимі при задовільних, відповідно до вимог ДФУ, хроматографічних характеристиках піку.

Окрім цього, проводили дослідження можливості ідентифікації і кількісного визначення кислоти розмаринової за присутності БАР валеріани лікарської. Нами встановлено, що у запропонованих хроматографічних умовах кількісного визначення кислоти розмаринової БАР екстракту валеріани не проявляються жодним хроматографічним піком поблизу піку кислоти розмаринової (час утримування

– близько 6 хв). Це є можливим через те, що при довжині хвилі детектування кислоти розмаринової та інших гідроксикоричних кислот сесквітерпенові кислоти екстракту валеріани є оптично неактивними – не мають смуг поглинання [4, 6].

На рисунках 1, 2 наведено хроматограми розчинів кислоти розмаринової та випробуваного розчину, отриманого з таблеток на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину в умовах кількісного визначення.

Відповідно до вимог ДФУ для розробленої методики необхідно було провести валідацію. Ми вивчали обмежене число валідаційних характеристик: лінійність, правильність і точність (збіжність), діапазон застосування [1, 2].

Нами досліджувалась лінійність методики. Методика повинна бути лінійною в діапазоні від мінімального вмісту до можливого максимального. З огляду на вміст кислоти розмаринової в сухому екстракті та враховуючи те, що використаний сухий екстракт меліси є квантифікованим, нами були виготовлені розчини кислоти розмаринової з різними концентраціями – від 15,40 до 46,30 мкг/мл. Концен-

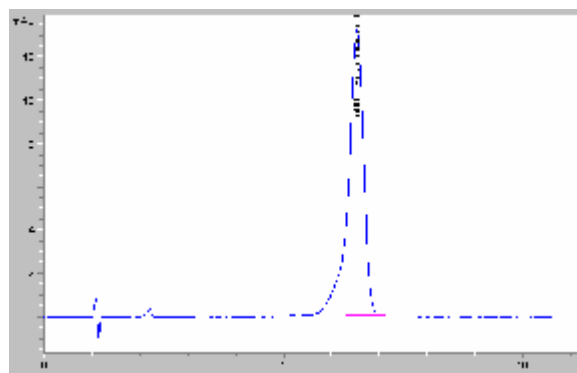


Рис. 1. Хроматограма розчину кислоти розмаринової в умовах кількісного визначення.

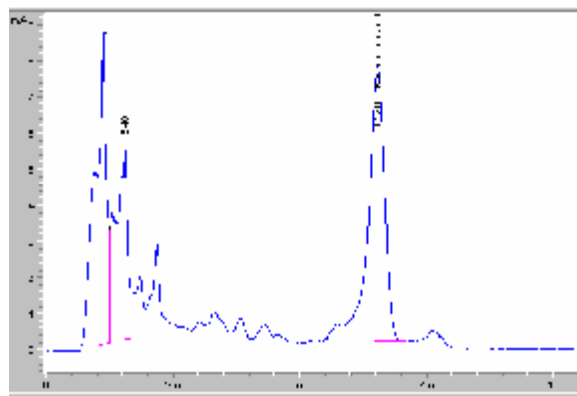


Рис. 2. Хроматограма випробуваного розчину, отриманого з таблеток на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину в умовах кількісного визначення.

трація випробуваного розчину в умовах кількісного визначення перебуває в середині досліджуваного інтервалу – 30 мкг/мл. Результати дослідження лінійності методики наведено в таблиці 1.

У результаті проведених досліджень встановлено, що методика характеризується строгою лінійністю (коефіцієнт кореляції більший 0,99) в широких межах (від 50 до 150 % у нормалізованих координатах). Графік залежності площі піку від концентрації проходить практично через початок координат (точка перетину з віссю ординат 0,2127), що вказує на відсутність впливу фону чи допоміжних речовин на площі піків визначуваної речовини у даних умовах.

У таблиці 2 наведено результати визначення вмісту кислоти розмаринової в таблетках на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину однієї серії та метрологічні характеристики цього визначення.

Результати проведеного випробування свідчать про добру збіжність методики, тобто про її прийнятну точність, оскільки жоден з

результатів за величиною похибки не вийшов більше ніж на 6,4 % (гранично допустима невизначеність за вимогами ДФУ).

Правильність і збіжність методики визначення кислоти розмаринової також досліджували методом “введено–знайдено” на стандартних розчинах кислоти розмаринової. Результати випробувань наведено у таблиці 3. Як бачимо з даних, наведених у таблиці, спостерігається рівномірний розподіл відхилень від введеного як у сторону більшого вмісту, так і в бік меншого вмісту, але при цьому не перевищує 2 %. Таким чином, жоден з результатів не дав відхилення від введеного, більшого від гранично допустимого значення (6,4 %).

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що дана методика кількісного визначення кислоти розмаринової відповідає критеріям специфічності, лінійності, правильності та прецизійності (збіжності) в діапазоні 50–150 % від номінального вмісту. Такі результати повністю відповідають умові валідаційної характеристики “Діапазон застосування”, оскільки методика кількісного визначення,

Таблиця 1 – Результати дослідження лінійності методики кількісного визначення кислоти розмаринової

№ з/п	C _п , мкг/мл	C _{норм} , %	A _{вимір}	A _{норм}	Критеріальні вимоги і прийнятність	
1	15,40	49,9	290,4	49,4	Рівняння прямої: S _{норм} =0,9967·C _{норм} + 0,2127 Тангенс кута нахилу: b=0,9967 Точка перетину з віссю ординат: a=0,2127 Коефіцієнт кореляції: r=0,99996	
2	18,03	58,4	344,0	58,5		
3	20,55	66,6	392,5	66,8		
4	25,71	83,3	490,9	83,5		
5	30,85	100,0	587,7	100,0		
6	35,90	116,4	685,9	116,7		
7	38,52	124,9	730,9	124,4		
8	41,15	133,4	782,0	133,1		
9	46,30	150,1	879,1	149,6		
Коефіцієнт кореляції: r=0,99996					r>0,9984	виконується
Залишкова дисперсія S ₀ ² =0,1129					S ₀ /b≤1,35	виконується
Залишкове стандартне відхилення S ₀ =0,3360						
Довірчий інтервал константи a: Δ _a =0,8205 a=0,2127					> a ≤2,048	виконується за критеріями статистичної і практичної незначущості

Таблиця 2 – Результати визначення вмісту кислоти розмаринової в таблетках на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину

Маса наважки, г	Площа хроматографічного піку	Концентрація кислоти розмаринової в розчині, мкг/мл	Знайдено кислоти розмаринової в одній таблетці, мг	Метрологічні характеристики (p=0,95 n=6)
0,9005	582,6	30,62	1,53	m̄=1,50 мг S=5,39·10 ⁻² t=2,57 Δm=0,06 мг m=(1,50±0,06) мг ε=4,0 %
0,8996	593,5	31,19	1,56	
0,9020	568,4	29,87	1,49	
0,9015	590,8	31,05	1,55	
0,9012	552,6	29,04	1,45	
0,9003	544,5	28,61	1,43	

Таблиця 3 – Результати перевірки правильності й збіжності методики визначення кислоти розмаринової методом ВЕРХ

№ з/п	$C_{i \text{ введено, \%}}$	$C_{i \text{ знайдено, \%}}$	$Z = C_{i \text{ знайдено}} \cdot 100 / C_{i \text{ введено, \%}}$
1	49,9	49,4	99,0
2	58,4	58,5	100,2
3	66,6	66,8	100,3
4	83,3	83,5	100,2
5	100,0	100,0	100,0
6	116,4	116,7	100,3
7	124,9	124,4	99,6
8	133,4	133,1	99,8
9	150,1	149,6	99,7
Середнє арифметичне, \bar{Z}			99,9
Відносне стандартне відхилення, $S, \%$			0,4272
Відносний довірчий інтервал, $\Delta, \%$			0,99
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta, \% \leq 6,4$			виконується
Критерій статистичної незначущості систематичної похибки $\delta\% = \bar{Z} - 100 \leq \Delta_z / \sqrt{n}$		$\leq 0,33$	виконується
Критерій практичної незначущості систематичної похибки $\delta\% = \bar{Z} - 100 \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$		$\leq 2,048$	виконується
Загальний висновок про методику			коректна

відповідно до вимог ДФУ, повинна мати потрібну лінійність, правильність та прецизійність у діапазоні 80–120 % від номінального вмісту.

Таким чином, розроблена нами методика визначення вмісту кислоти розмаринової методом ВЕРХ придатна для аналізу таблеток на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину з метою контролю вмісту сухого екстракту меліси.

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено ВЕРХ-методику кількісного визначення кислоти розмаринової в таблетках на основі сухих екстрактів валеріани і меліси та гліцину.

2. Проведено валідацію методики, зокрема встановлено, що для характеристик специфічності, лінійності, правильності, точності (збіжності) й діапазону застосування виконуються критерії прийнятності відповідно до вимог ДФУ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Доповнення 1. – Х. : Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр", 2004. – 494 с.
2. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. Попова Н. В. Аналіз гідроксикоричних кислот в меліси лікарській / Н. В. Попова, В. І. Литвиненко, О. А. Певнева // Фармакогнозія XXI століття. Досягнення і перспективи : тези доп. Ювілейної наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Х. : Вид-во НФаУ, 2009. – С. 175–176.
4. Чекалюк Л. С. До питання аналізу комплексних лікарських засобів на основі екстрактів валері-

ани та меліси / Л. С. Чекалюк // Матеріали XIV Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених. – Тернопіль, 2010. – С. 313.

5. Чекалюк Л. С. До питання стандартизації трави меліси лікарської / Л. С. Чекалюк, Л. В. Вронська, М. М. Михалків // Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фармацевтичних препаратів : тези доп. Національної наук.-тех. конф. з міжнар. участю. – Л. : Львівська політехніка, 2008. – С. 216.

6. Чекалюк Л. С. Дослідження можливості визначення суми гідроксикоричних кислот в сировині і комплексних лікарських засобах на основі меліси лікарської / Л. С. Чекалюк, Л. В. Вронська // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : міжнар. наук.-практ. конф. – Тернопіль, 2009. – С. 32–33.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТЫ РОЗМАРИНОВОЙ В ТАБЛЕТКАХ, СОДЕРЖАЩИХ СУХИЕ ЭКСТРАКТЫ ВАЛЕРИАНЫ И МЕЛИССЫ И ГЛИЦИН

Резюме

Разработана методика количественного определения кислоты розмариновой в таблетках на основе сухих экстрактов валерианы и мелиссы и глицина. Изучены основные валидационные характеристики методики. Показано, что методика пригодна для контроля содержания сухого экстракта мелиссы в таблетках на основе сухих экстрактов валерианы и мелиссы и глицина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: таблетки, сухие экстракты валерианы и мелиссы, глицин, кислота розмариновая, высокоэффективная жидкостная хроматография.

L. S. Lohoyda, L. V. Vronska
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACID ROSMARINIC IN TABLETS, CONTAINING DRY VALERIAN EXTRACTS AND MELISSA AND GLYCINE

Summary

A method for quantitative determination of acid rosmarinic in tablets on the basis of dry extracts of valerian and lemon balm and glycine has been worked out. The basic characteristics of the validation methods have been studied. It has been shown that the technique is suitable for control of the dry extract of lemon balm in tablets on the basis of dry extracts of valerian and lemon balm and glycine.

KEY WORDS: tablets, dry extracts of valerian and lemon balm, glycine, acid rosmarinic, HPLC.

Отримано 05.09.11

Адреса для листування: Л. С. Логойда, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.