

О. М. Хишова, Л. Н. Дунец, Н. А. Алексеев, П. Т. Петров,
Г. Л. Цвилик, Ю. А. Голяк

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ ВАЛЕРИАНЫ, ТРАВЫ ПУСТЫРНИКА И ПЛОДОВ БОЯРЫШНИКА

Витебский государственный медицинский университет;

Научно-фармацевтический центр, ОАО "Белмедпрепараты", Минск

В настоящее время для получения фитопрепаратов используется свежее и высушенное лекарственное растительное сырье (ЛРС). Выпуск лекарственных средств из свежесобранного сырья у нас в стране ограничен в связи с трудностями его хранения и транспортировки. Основная масса высушенного растительного сырья используется в виде сборов, брикетов, чаев и экстракционных лекарственных средств (галеновых и новогаленовых). Еще одной формой переработки растительного сырья являются препараты, в состав которых входит сырье в виде порошка. ЛРС в виде порошка в течение многих веков используется тибетской медициной, народной медициной Китая и др. Создание таких препаратов является одним из перспективных направлений развития фармацевтического производства, так как позволяет максимально использовать весь комплекс биологически активных веществ растений, рационально и комплексно применять растительные ресурсы.

Нами разрабатывается комбинированный фитопрепарат — таблетки и капсулы на основе тонко измельченных порошков корневищ с корнями валерианы, травы пустырника и плодов боярышника. Принципы стандартизации препаратов на основе лекарственного растительного сырья ничем не отличаются от стандартизации лекарственных средств иного происхождения — описание, качественные реакции, средняя масса таблеток и допустимые отклонения от средней массы, прочность на истирание и сжатие, распадаемость, содержание действующих веществ и др.

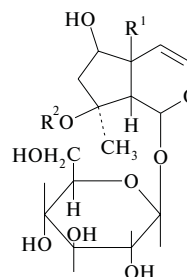
Целью работы является разработка методик качественного и количественного определения биологически активных веществ комбинированного фитопрепарата — таблеток и капсул, содержащих тонко измельченные порошки корневищ с корнями валерианы, травы пустырника и плодов боярышника.

Экспериментальная часть

Определение сложных эфиров (иридоиды и др. БАВ, содержащие сложноэфирную группу).

Представители рода пустырник — перспективные в лекарственном отношении растения, т.к. содержат богатый комплекс биологически активных веществ. Химический состав травы пустырника очень разнообразен и ещё недостаточно изучен. Фармакологическую активность пустырника обуславливает комплекс соединений, в большей степени сумма флавоноидов (ру-

тин, кверцетин, квинквелозид и др.) и иридоидов (аюгол, аюгозид, гарпагида ацетат, гарпагид).



	R ¹	R ²
Гарпагид	ОН	ОН
Гарпагида ацетат	ОН	ОАс
Аюгол	Н	ОН
Аюгозид	Н	ОАс

В настоящее время исследователи достаточно много внимания уделяют изучению содержания иридоидов в траве пустырника [1].

Валериана лекарственная также содержит иридоиды и другие биологически активные вещества, содержащие сложноэфирную группу. Таким образом, для количественной оценки соединений сложных эфиров (иридоидов и БАВ, содержащий сложноэфирную группу) нами использована фотометрическая методика, основанная на образовании комплексов гидроксаматов с ионами Fe³⁺ [1].

Содержание сложных эфиров (иридоидов и БАВ, содержащих сложноэфирную группу) в препарате в пересчете на гарпагида ацетат вычисляли по рассчитанному удельному показателю поглощения гарпагида ацетата ($E_{1\text{см}}^{1\%}$), значение которого составило 56.

Качественное определение иридоидов. Около 7,5 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещали в круглодонную колбу, вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл 40 % спирта этилового и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. Экстракт охлаждали и фильтровали через ватный тампон в мерную колбу вместимостью 100 мл. Раствор доводили до метки 40 % спиртом этиловым.

10 мл полученного раствора упаривали до 5 мл. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу на 10 мл, доводили объем раствора водой до метки и фильтровали через стеклянную колонку диаметром 1 см с 3 г оксида алюминия II степени активности.

На пластинку "Силуфол УФ-254" наносили 0,05 мл полученного раствора. Хроматографировали восходя-

щим способом в системе растворителей хлороформ – метанол – вода (80:2:0,1). После разделения пластинку вынимали и сушили на воздухе до удаления растворителя. Проявляли пластинку реактивом Штала (1,0 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяли в смеси из 50 мл уксусной кислоты, 5 мл фосфорной кислоты и 100 мл воды). Раствор годен в течение 7 дней. На хроматограмме должно появиться не менее 3-х зон сиреневого цвета с R_f около $0,40 \pm 0,05$ (гарпагид), пятно с R_f около $0,60 \pm 0,05$ (аюгозид), пятно с R_f около $0,80 \pm 0,05$ (гарпагида ацетат).

Количественное определение суммы сложных эфиров (иридоидов и др. БАВ, содержащих сложноэфирную группу). Около 5,0 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещали в круглодонную колбу вместимостью 200 мл. Прибавляли 70 мл 40 % спирта этилового и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и фильтровали извлечение в мерную колбу вместимостью 100 мл. К остатку прибавляли 30 мл 40 % спирта этилового и нагревали на водяной бане в течение 15 мин. Охлаждали и фильтровали извлечение в ту же мерную колбу. Доводили объем раствора до метки 40 % спиртом этиловым.

10 мл полученного фильтрата упаривали до 5 мл. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу на 10 мл и доводили объем раствора водой до метки. Фильтровали через стеклянную колонку диаметром 1 см с 3 г оксида алюминия II степени активности.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 5 мл элюата, прибавляли 5 мл щелочного раствора гидроксилamina и выдерживали 5 мин. Затем прибавляли 10 мл 1 М раствора хлороводородной кислоты, доводили 1 % раствором хлорида железа (III) в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной до метки и перемешивали.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 512 нм. В качестве раствора сравнения использовали смесь, приготовленную в мерной колбе вместимостью 25 мл. К 5 мл воды прибавляли 5 мл щелочного раствора гидроксилamina, 10 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводили до метки 1 % раствором хлорида железа (III) в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты.

Содержание суммы сложных эфиров (иридоидов и др. БАВ, содержащих сложноэфирную группу), в од-

ной таблетке в пересчете на гарпагида ацетат (X , мг) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot b}{56 \cdot m_1 \cdot 5},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; 56 — удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) стандартного образца гарпагида ацетата; m_1 — масса навески препарата, мг; b — средняя масса таблетки, мг.

Результаты определения суммы сложных эфиров спектрофотометрическим методом (иридоидов и других БАВ, содержащих сложноэфирную группу), в пересчете на гарпагида ацетат в одной таблетке представлены в табл. 1.

Следует отметить, что при анализе таблеток из корневищ с корнями валерианы и плодов боярышника получены более низкие результаты (сумма БАВ составила 0,8 мг). Это свидетельствует о достаточной селективности предложенной методики по отношению к иридоидам пустырника.

Определение валепотриатов

Известно, что седативное и спазмолитическое действие корневищ с корнями валерианы лекарственной обуславливают валепотриаты и сесквитерпеновые компоненты эфирного масла (валереновая кислота, валеренал, валеранон).

Выявление высокой седативной активности гомобалдриналя — продукта превращения изовалтрата, а также изучение его фармакокинетики дали основание полагать, что фармакологическими свойствами обладают не сами валепотриаты, а продукты их превращения в организме. В связи с этим было предложено не проводить раздельное определение валепотриатов, а ограничиваться определением общего содержания с пересчетом на один из них, например, на валтрат или дигидровалтрат [2].

Для количественного определения валепотриатов в сырье использована методика [3], основанная на способности валепотриатов взаимодействовать со смесью концентрированных хлористоводородной и уксусной кислот с образованием пирилиевых солей интенсивно синего цвета, которые имеют максимум поглощения в области (595 ± 2) нм. В данной методике используется удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$. Экспериментально найдено, что для пирилиевой соли валтрата он равен 91,1 [3].

Качественное определение валепотриатов. Около 2,5 г (точная навеска) порошка растертых таблеток заливали 200 мл хлороформа, взбалтывали на вибрационном аппарате в течение 1 ч. 50 мл извлечения, полученного, как указано ниже в разделе “Количественное определение суммы валепотриатов”, упаривали под вакуумом при температуре не выше 45°C . К сухому остатку прибавляли 50 мл смеси концентрированных хлористоводородной и уксусной кислот. Появляется желто-зеленое окрашивание, постепенно переходящее в интенсивно-синее (валепотриаты).

Таблица 1
Результаты определения суммы сложных эфиров (иридоидов и других БАВ, содержащих сложноэфирную группу), в пересчете на гарпагида ацетат в одной таблетке ($n = 5$, $P = 0,95$)

Серия образца	Содержание гарпагида ацетата, мг	S_r
1	$2,4 \pm 0,2$	0,05
2	$2,4 \pm 0,1$	0,04
3	$2,6 \pm 0,2$	0,04

Количественное определение суммы валепотриатов. Около 2,5 г (точная навеска) порошка растёртых таблеток заливали 200 мл хлороформа, взбалтывали на вибрационном аппарате в течение 1 ч. Затем фильтровали в мерную колбу вместимостью 250 мл. Остаток на фильтре промывали три раза хлороформом (20, 20, 10 мл) и доводили хлороформом до метки. Из 50 мл полученного извлечения полностью удаляли хлороформ в вакууме при температуре не выше 45 °С.

К остатку прибавляли 50 мл смеси концентрированных хлористоводородной и уксусной кислот (соотношение 36 мл + 25 мл), встряхивали в течение 20 мин и оставляли на 16 – 18 ч. После чего фильтровали через стеклянный фильтр и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 595 нм. Раствором сравнения служила вышеуказанная смесь кислот.

При использовании удельного показателя поглощения содержание суммы валепотриатов в одной таблетке в пересчете на пирилевуую соль валтрата (X , мг) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot b}{91,1 \cdot m_1 \cdot 100},$$

где A — оптическая плотность измеряемого раствора; V — объем приготовленного раствора, мл; m_1 — навеска таблеток, мг; b — средняя масса таблетки, мг.

Результаты количественного определения суммы валепотриатов в одной таблетке в пересчете на пирилевуую соль валтрата представлены в табл. 2.

В опытах с пустырником и боярышником оптическая плотность составила 0,03 – 0,04, что свидетельствует о селективности данной методики.

Определение флавоноидов.

Флавоноиды являются наиболее обширной группой фенольных соединений и важной составной частью растительного организма. Рутин — одно из наиболее широко распространенных в растительном мире веществ из класса флавоноидов. Особенно часто он встречается в листьях высших растений. В мировой практике его обычно получают из софоры японской, в цветках и бутонах которой содержится до 25 % рутина.

Рутин обладает удовлетворительными спектральными характеристиками и сохраняет стабильное оптическое поглощение в течение 1 месяца. По этим причинам, а также благодаря своей доступности рутин чаще других γ -пиронов используют в качестве эталонного вещества в анализе лекарственных средств, а также при стандартизации растительного сырья и фитопрепаратов по содержанию суммы фенольных соединений, в частности флавоноидов.

В связи с этим нами разработаны методики качественного и количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в комбинированном препарате, содержащем валериану, пустырник, боярышник.

Качественное определение флавоноидов. В круглодонную колбу ёмкостью 50 мл помещали 1,0 г (точная навеска) порошка растертых таблеток, прибавляли

10 мл 70 % спирта этилового и нагревали при температуре 80 °С в течение 30 мин. Получившуюся вытяжку центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин.

На линию старта хроматографической пластинки “Сорбфил-ПТСХ-П-В-УФ”, размером 10 × 10, наносили в точку на расстоянии 1 см друг от друга 60 мкл полученного испытуемого раствора, 20 мкл (20 мкг) стандартного образца вещества-свидетеля (СОВС) рутина, 20 мкл (20 мкг) раствора стандартного образца вещества-свидетеля (СОВС) кверцетина.

Пластинку с нанесёнными пробами высушивали на воздухе в течение 5 мин, затем помещали в камеру со смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:2:3) и хроматографировали в насыщенной камере восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдёт 9 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, высушивали на воздухе в течение 10 мин и обрабатывали парами 25 % раствора аммиака. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться пятна жёлтого цвета, расположенные на уровне пятен на хроматограммах раствора СОВС кверцетина (кверцетин) и раствора СОВС рутина (рутин).

Приготовление СОВС кверцетина. Около 0,05 г (точная навеска) кверцетина (ФС 42-2508-87), предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещали в колбу на 50 мл, прибавляли 20 мл 70 % спирта этилового и растворяли на водяной бане при температуре 80 °С. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры, переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки 70 % спиртом этиловым. Срок годности раствора 1 месяц.

Приготовление СОВС рутина. Около 0,05 г (точная навеска) рутина (ФС 42-2508-87), предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещали в колбу на 50 мл, прибавляли 20 мл 70 % спирта этилового и растворяли на водяной бане при температуре 80 °С. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры, переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки 70 % спиртом этиловым. Срок годности раствора 1 месяц.

Количественное определение суммы флавоноидов проводилось нами методом спектрофотометрии [4].

Около 0,6 г (точная навеска) порошка растёртых таблеток помещали в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 10 мл 70 % спирта этилового. Нагревали на водяной бане при температуре 80 °С в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и фильтровали извлечение через бумажный беззольный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл, фильтр промывали дважды 5 мл 70 % спирта этилового и доводили объём до 25 мл этим же спиртом.

10 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл 95 % спирта этилового, 0,5 мл 33 % раствора кислоты уксусной, 2 мл 2 % раствора алюминия хлорида и доводили объём до метки водой.

Таблица 2
Результаты количественного определения суммы валепотриатов в одной таблетке в пересчете на пирилевуую соль валтрата ($n = 5, P = 0,95$)

Серия образца	Содержание валепотриатов в пересчете на пирилевуую соль валтрата, мг	S_r
1	$1,10 \pm 0,10$	0,07
2	$1,24 \pm 0,05$	0,03

Через 30 мин измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 407 нм, используя в качестве раствора сравнения контрольный раствор А.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора РСО рутин в 70 % спирте этиловом. Для этого 1 мл раствора РСО рутин (0,02 %) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 9 мл 70 % спирта этилового, 10 мл 95 % спирта этилового, 0,5 мл 33 % раствора кислоты уксусной, 2 мл 2 % раствора алюминия хлорида и доводили объём раствора до метки водой, перемешивали.

В качестве раствора сравнения использовали контрольный раствор Б.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в одной таблетке (X , мг) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot b}{A_0 \cdot 250 \cdot 25 \cdot m_1 \cdot 10} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot b}{A_0 \cdot 100 \cdot m_1},$$

где A_1 — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора РСО рутин; m_0 — масса навески РСО рутин (50 мг); m_1 — масса препарата, мг; b — средняя масса таблетки, мг.

Приготовление РСО рутин. Около 0,05 г (точная навеска) рутин (ФС 42-2508-87), предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 5 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, растворяли и доводили объём до метки 70 % спиртом этиловым.

Приготовление контрольного раствора А. 10 мл раствора препарата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл 95 % спирта этилового, 0,5 мл 33 % раствора кислоты уксусной, доводили объём раствора водой до метки, перемешивали.

Таблица 3
Результаты определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в одной таблетке ($n = 5, P = 0,95$)

Серия образца	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, мг	S_r
1	$0,44 \pm 0,02$	0,03
2	$0,45 \pm 0,03$	0,05
3	$0,45 \pm 0,04$	0,07

Данные количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в одной таблетке представлены в табл. 3.

Приготовление контрольного раствора Б. 1 мл раствора РСО рутин (0,02 %) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 9 мл 70 % спирта этилового, 10 мл 95 % спирта этилового, 0,5 мл 33 % раствора кислоты уксусной, доводили объём раствора до метки водой, перемешивали.

Данные количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в одной таблетке представлены в табл. 3.

Таким образом, установлено содержание действующих веществ в комбинированном препарате (в пересчете на 1 таблетку) — сложных эфиров (иридоидов и других БАВ, содержащих сложноэфирную группу), в пересчете на гарпагида ацетат 2,4–2,6 мг, валепотриатов 1,1–1,2 мг и флавоноидов в пересчете на рутин 0,44–0,45 мг. Предлагаемые методики достаточно селективны, что подтверждено экспериментально.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. В. Федосеева, Д. М. Попов, *Фармация*, № 4, 18–20 (1997).
2. О. А. Коновалова, К. С. Рыбалко, Т. А. Сенина, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(7), 63–65 (1991).
3. О. А. Коновалова, К. С. Рыбалко, Л. П. Толстых, *Хим.-фарм. журн.*, **17**(7), 831–836 (1983).
4. Е. В. Компанцева, А. Ю. Айрапетова, *Фармация*, № 1, 40–41 (2000).

Поступила 22.05.03.