

УДК 543.544:615.07

*С.В.СУР, канд. хім. наук, О.Г.МАКАРЕНКО, канд. хім. наук,
Т.В.ГЕРАСИМЧУК, канд. фармац. наук*

РОЗРОБКА МЕТОДУ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ВИЗНАЧЕННЯ АЛКАЛОЇДІВ ЛИСТЯ МАТЕ В ДІЄТИЧНОМУ РОСЛИННОМУ ЗБОРІ ЗА ДОПОМОГОЮ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Центральна лабораторія з аналізу якості лікарських засобів

Лікарські рослинні збори звичайно містять кілька видів лікарської рослинної сировини, що значно ускладнює вибір критеріїв для їх стандартизації і розробку методів для ідентифікації та кількісного визначення головних активних компонентів, або маркерів [1]. Оскільки рослинні збори містять складні комплекси біологічно активних речовин різних класів у незначній кількості, то останнім часом для їх ідентифікації та визначення все більше використовують селективні і чутливі хроматографічні методи (тонкошарову (ТШХ), високоефективну рідинну (ВЕРХ) та газорідинну (ГРХ) хроматографію).

Рослинний дієтичний збір (РДЗ) є сумішшю п'яти видів подрібненої висушеної лікарської сировини, до складу якої входять: листя берези 32,45 г, листя мате 27,5 г, трави кропиви 13,5 г, плодів коріандру 13,5 г, плодів ялівцю 13,5 г. Листя берези та мате вважають основними компонентами збору, а решту — допоміжними.

Листя мате (*Folia Paulinae*) містить не менше 0,6 % [2] кофеїну (в середньому 1,0—1,8 % [3]) та 4—10 % дубильних речовин [3]. Згідно з монографією ДАС 1986

© Колектив авторів, 2000

[2] кофеїн і теобромін в листі мате ідентифікують методом ТШХ, кількісне визначення самого кофеїну проводять методом ВЕРХ.

Метою даної роботи була розробка методу ідентифікації кофеїну і теоброміну та визначення кофеїну (а також валідація розробленого методу), який би дав можливість ідентифікувати та кількісно оцінити наявність листя мате в РДЗ.

Прилади, матеріали та реактиви

Для проведення ВЕРХ використовували рідинний хроматограф HP 1050, що, складався з квадратичного насоса, ультрафіолетового діодно-матричного детектора та комп'ютерної станції з програмою збирання та обробки даних HP ChemStation Rev. A.03.01 (Х'юлет-Пакард, США), а також колонку LiChrosorb RP-8 розміром 250 x 4 мм з оберненою нерухомою фазою, розмір часток 5 мкм (Мерк, ФРН). Пробу в колонку вводили за допомогою петлевого інжектора (об'єм петлі 20 мкл).

Реактиви і розчинники для хроматографії, що використовувалися, були придбані у фірм Мерк та Флука, ФРН.

Розробку та апробацію методів ідентифікації та визначення проводили на зразках РСЗ с. Ch.B.01036, наданих фірмою-виробником.

Експериментальна частина

Основними діючими речовинами листя мате вважають [3] пуринові алкалоїди — кофеїн і теобромін, ідентифікацію яких згідно з монографією [2] проводять методом ТШХ. Однак, оскільки визначення кофеїну передбачалося проводити методом ВЕРХ, то для підтвердження наявності у препараті листя мате було вирішено ідентифікацію кофеїну і теоброміну проводити методом ВЕРХ одночасно з кількісним визначенням кофеїну.

Приготування розчину зразка. Точну наважку близько 2,0 г препарату вміщували у круглодонну колбу об'ємом 200 мл, додавали 60 мл води, 0,5 г оксиду магнію і нагрівали до кипіння протягом 10 хв. Після охолодження додавали 8 мл 7 % розчину соляної кислоти і струшували, упродовж 10 хв. Після чого суміш перенесли в мірну колбу об'ємом 100 мл і доводили водою до мітки, фільтрували і перші 20 мл фільтрату відкидали. Наступні 20 мл фільтрату розводили водою в мірній колбі до 100 мл, фільтрували через мембранний фільтр з порами 0,45 мкм, після чого використовували для хроматографування.

Приготування розчинів стандартних речовин. Точну наважку близько 25 мг кофеїну та 10 мг теоброміну розчиняли у воді в мірній колбі об'ємом 250 мл і доводили водою до мітки. 5,0, 10,0, 15,0 та 20,0 мл одержаного розчину доводили до мітки в мірних колбах об'ємом 100 мл.

Оптимізація складу рухомої фази. Умови хроматографування, описані в монографії DAC 1986 для визначення кофеїну в листі мате, у процесі експериментальної апробації не були визнані оптимальними. При використанні рухомої фази із співвідношенням 0,1 % розчину льодяної оцтової кислоти та ацетонітрилу (85:15) час утримання піків компонентів зразка був дуже малим, при цьому не вдавалося досягти необхідного відокремлення піків кофеїну і теоброміну від піків інших речовин.

При використанні рухомої фази з більш низьким вмістом ацетонітрилу час утримання піків збільшувався, при цьому поліпшувалося розділення піків компонентів розчину зразка. Найоптимальнішим виявилось співвідношення 0,1 % розчину льодяної оцтової кислоти та ацетонітрилу (95:5). При швидкості рухомої фази 1,5 мл/хв час утримання піка кофеїну становив близько 10,9 хв, а піки кофеїну і теоброміну відокремлювалися від інших компонентів розчину зразка.

При зберіганні рухомої фази можливе часткове випаровування ацетонітрилу, що призводить до збільшення часу утримання піків на хроматограмі. Тому для аналізу використовували свіжовиготовлену рухому фазу.

Оптимізація довжини хвилі для детектування. Довжина хвилі 275 нм, яка пропонується для детектування в монографії DAC 1986, є близькою до максимуму спектрів поглинання теоброміну і кофеїну, але вона не була найзручнішою для аналізу зразків РДЗ. При цій довжині хвилі в інтервалі між 8 та 10 хвилинами хроматографування детектувалися піки невідомих речовин, які могли б впливати на результати визначення кофеїну.

Для оптимізації умов детектування було використано можливості діодно-матричного детектора для зняття спектрів розділених речовин розчину зразка при детектуванні в діапазоні від 200 до 350 нм. Оптимальну довжину хвилі розраховували за співвідношенням висот піка кофеїну та піків з часом утримання 8,7 і 9,5 хв. Було встановлено, що оптимальною є довжина хвилі 260 нм (рис. 1). В області спектра менше 260 нм співвідношення висот вищезазначених піків і дрейф нульової лінії знову підвищувалися.

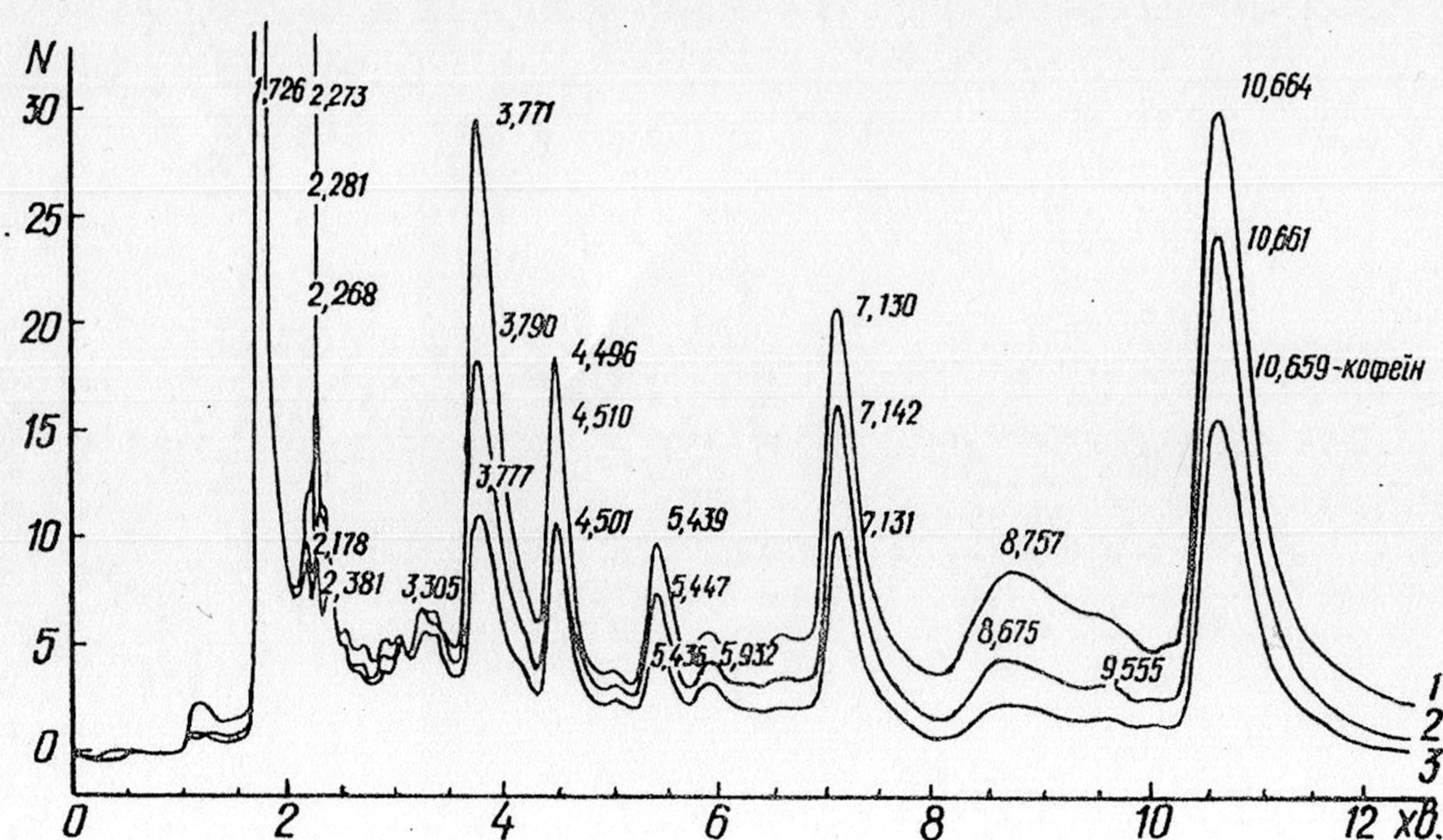


Рис. 1. Хроматограма зразка РДЗ с.Ch.B.01036 при довжинах хвиль:
1 — 275 нм, 2 — 260 нм, 3 — 265 нм

Критерії тесту на придатність хроматографічної системи. З наведених хроматограм було розраховано характеристики хроматографічної системи. Ефективність системи за піком кофеїну становила близько 3200 теоретичних тарілок, коефіцієнт симетрії піка дорівнював 1,89, коефіцієнт розділення — 5,67. Для піка теоброміну ці величини склали відповідно 3784, 1,59 та 1,73.

Виходячи з одержаних даних, було запропоновано встановити наступні мінімальні вимоги тесту на придатність хроматографічної системи:

- число теоретичних тарілок, розраховане за піком кофеїну, — не менше 1500,
- коефіцієнт розділення — не менше 1,5,
- коефіцієнт симетрії піка кофеїну — не більше 2,5.

Оскільки для стандартизації вмісту кофеїну у препараті було використано широкий однограничний діапазон (не менше 0,14 %) [1], то, відповідно [4], було вирішено, що відносне стандартне відхилення площин піків кофеїну на повторних хроматограмах стандартного розчину не повинно перебільшувати 3,0 %.

Результати та їх обговорення

Ідентифікація теоброміну і кофеїну. Ідентифікацію проводили одночасно з кількісним визначенням кофеїну. Теобромін і кофеїн в розчині зразка ідентифікували, порівнюючи час утримання піків на хроматограмі розчину зразка з часом утримання піків кофеїну і теоброміну на хроматограмі стандартного розчину. На

хроматограмі стандартного розчину піки теоброміну і кофеїну мали час утримання відповідно 4,65 і 10,61 хв (рис. 2), на хроматограмі розчину зразка — практично такі ж величини — 4,50 і 10,66 хв відповідно.

Як додатковий спосіб ідентифікації використовували також порівняння спектрів, записаних для піків на хроматограмах розчину зразка та розчину стандартних речовин.

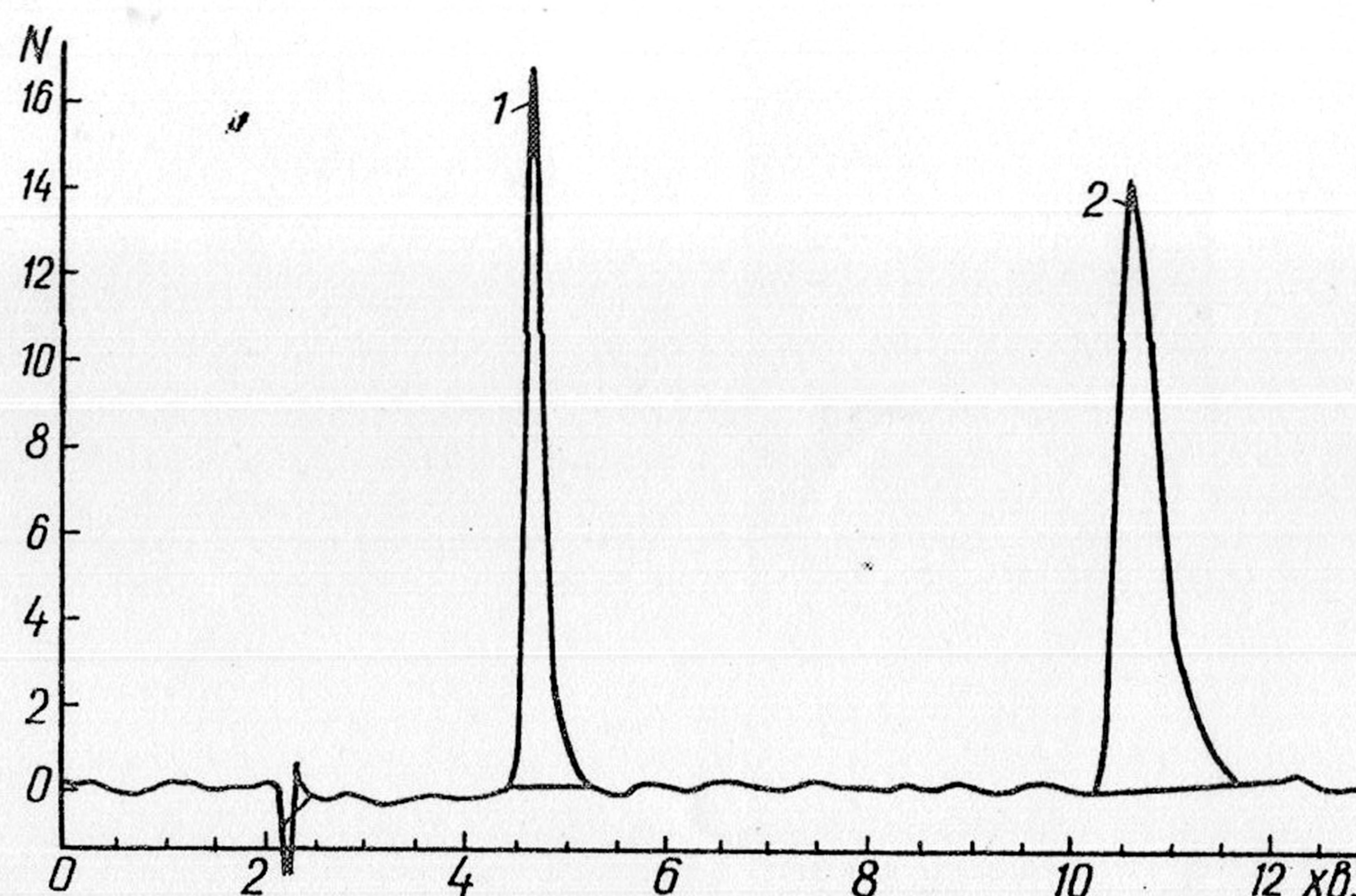


Рис. 2. Хроматограма стандартного розчину:
1 — теоброміну, 2 — кофеїну

Визначення кофеїну. Кожен з чотирьох розчинів стандартних речовин з відомими концентраціями кофеїну по шість разів вводили в колонку і записували значення площин піків кофеїну на кожній хроматограмі. Для кожної точки калібрувальної прямої відносне стандартне відхилення не перевищувало 2,0 %.

За допомогою програми HP ChemStation було побудовано калібрувальну пряму, за якою розраховували вміст кофеїну у зразку РДЗ. Коефіцієнт лінійності калібрувальної прямої становив 0,99951, відносне стандартне відхилення — 0,828 %. Калібрувальна пряма описувалася рівнянням $y = mx + b$, де $m = 31,12308$, $b = -1,05245$.

При хроматографуванні розчину зразка, одержаного з наважки 2,4334 г, було визначено, що вміст кофеїну в РДЗ становив 0,310 % при відносному стандартному відхиленні від середнього значення за шістьма вимірюваннями 1,12 %.

Валідація методу показала його добру лінійність (коефіцієнт лінійності — 0,99906, відносне стандартне відхилення — 1,73 %) і достатню точність (відносне стандартне відхилення від середнього значення для шести повторних тестів становило 1,12 %).

Тест на чистоту піка за допомогою діодно-матричного детектора показав високу селективність методу. Коефіцієнт кореляції спектрів на початку, в середині та в кінці піка становив для кофеїну 984,43, а для піка теоброміну — 999,50 (вважається, що пік не містить домішок інших речовин при коефіцієнті кореляції не менше 980), тобто навіть для такого складного зразка вдалося досягти відокремлення аналізованих речовин від інших компонентів матриці.

Висновок

Розроблено методику ідентифікації головних пуринових алкалоїдів (теоброміну і кофеїну) та визначення вмісту кофеїну за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, яка дозволяє довести присутність та оцінити кількісний вміст листя мате в рослинному дієтичному зборі.

1. Сур С.В. // Фармац. журн. — 2000. — № 1. — С. 64—68.
2. Deutscher Arzneimittel-Codex 1986.
3. Муравьева Д.А. Тропические и субтропические лекарственные растения. — М.: Медицина, 1983. — С. 220.
4. Гризодуб А.И., Левин М.Г., Леонтьев Д.А. и др. // Фармаком. — 1995. — № 7. — С. 8—19.

Надійшла до редакції 16.05.2000.

С.В. Сур, А.Г.Макаренко, Т.В.Герасимчук

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ ЛИСТЬЯ МАТЭ В РАСТИТЕЛЬНОМ ДИЕТИЧЕСКОМ СБОРЕ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Разработан метод идентификации теобромина и кофеина и определения кофеина в растительном диетическом сборе, содержащем в качестве одного из главных компонентов листья матэ. Анализ проводили на хроматографе HP 1050 с колонкой LiChrosorb RP-8 250 x 4 мм. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0,1 % раствора ледяной уксусной кислоты и ацетонитрила (95:5) со скоростью 1,5 мл/мин. Наиболее оптимальной для детектирования оказалась длина волны 260 нм. На основе полученных экспериментальных данных предложены критерии теста на пригодность хроматографической системы. Проведенная валидация показала высокую селективность, линейность и достаточную точность разработанного метода.

S.V.Sur, O.G.Makarenko, T.V.Gerasimchuk

THE DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF MATE LEAFS' ALCALOIDS IN HERBAL DIET TEE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

The method was developed for identification of theobromine and caffeine and determination of caffeine in diet herbal tee included mate leafs as one of main component. The analysis was carried out using HP 1050 chromatograph with column LiChrosorb RP-8 250 mm x 4 mm i.d. The mixture of 0,1 % solution of ice acetic acid and acetonitrile (95:5) was used as mobile phase with flow rate 1,5 ml/min. Most optimal for detecting was found wavelength at 260 nm. The criteria for system suitability test was proposed on the base of received experimental data. The high selectivity, linearity and precision of developed method was been showed during its validation.

