



О. Г. Смалюх

Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення ефірних олій м'яти і куркуми в багатокомпонентному лікарському засобі рослинного походження

ПАТ «Галичфарм», м. Львів

Ключові слова:

багатокомпонентний лікарський засіб, ефірна олія, газова хроматографія, ідентифікація, кількісне визначення.

З метою стандартизації багатокомпонентного лікарського засобу, до складу якого входять рослинні екстракти та ефірні олії, розробили методики ідентифікації та кількісного визначення ефірних олій м'яти та куркуми методом газової хроматографії. Для вибору маркерів для ідентифікації та кількісного визначення здійснили огляд фахової літератури й експериментальні дослідження, на основі яких ідентифікаційними та кількісними маркерами запропонували обрати ментол і турмерони. Дослідили умови пробопідготовки та хроматографування, в результаті етанол 96% обрали оптимальним розчинником; виявили, що ультразвук і центрифугування підвищують ефективність пробопідготовки; отримали найкращі хроматографічні характеристики піків речовин, які визначали, на колонці HP-Innowax, 19091N-133. Запропонували кількісний критерій якості капсул: вміст ментолу – від 2,0 мг до 4,5 мг, вміст турмеронів – від 2,0 мг до 5,0 мг із розрахунку на середню масу вмісту капсули.

Разработка методики идентификации и количественного определения эфирных масел мяты и куркумы в многокомпонентном лекарственном средстве растительного происхождения

О. Г. Смалюх

С целью стандартизации многокомпонентного лекарственного средства, в состав которого входят растительные экстракты и эфирные масла, разработали методики идентификации и количественного определения эфирных масел мяты и куркумы методом газовой хроматографии. Для выбора маркеров для идентификации и количественного определения провели обзор специализированной литературы и экспериментальные исследования, на основе которых идентификационными и количественными маркерами предложили выбрать ментол и турмероны. Исследовали условия пробоподготовки и хроматографирования, в результате которых этанол 96% выбрали оптимальным растворителем; установили, что ультразвук и центрифугирование повышают эффективности пробоподготовки; получили лучшие хроматографические характеристики пиков определяемых веществ на колонке HP-Innowax, 19091N-133. Предложили количественный критерий качества исследуемых капсул: содержание ментола – от 2,0 мг до 4,5 мг, содержание турмеронов – от 2,0 мг до 5,0 мг в расчете на среднюю массу содержимого капсулы.

Ключевые слова: многокомпонентный растительный препарат, эфирные масла, газовая хроматография, количественное определение, идентификация.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2015. – № 1 (17). – С. 27–31

The development of method for mint and turmeric essential oils identification and quantitative analysis in complex drug

O. G. Smalyukh

Aim. To standardize complex drug, which includes plant extracts and essential oils methods for essential oils of mint and turmeric identification and quantification by gas chromatography have been developed.

Methods and results. Literature review and experimental studies have been conducted in order to select markers for the identification and quantification. After the review menthol and turmeric have been suggested as the identification and quantitative markers. The conditions of sample preparation and chromatography have been investigated, resulting ethanol 96% has been chosen as optimal solvent. It has been established that ultrasound and centrifugation improve the efficiency of sample preparation, and cause better chromatographic characteristics of peaks determined by substances in column HP-Innowax, 19091N-133.

Conclusion. Quantitative criteria have been proposed for investigated capsules: menthol content of 2.0 mg to 4.5 mg turmeric content of 2.0 mg to 5.0 mg, based on the average weight of the capsule contents.

Key words: Drug Combination, Volatile Oils, Gas Chromatography, Analysis.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 1 (17): 27–31

Для оцінювання якісних і кількісних характеристик рослинних лікарських засобів (РЛЗ), що містять складний комплекс речовин різних хімічних класів, найбільш придатними є високоселективні хроматографічні методи аналізу, за їхньою допомогою можна одночасно здійснити ідентифікацію і кількісне визначення біологічно активних речовин (БАР) чи маркерів [1].

Мета роботи

Розробити методику ідентифікації та кількісного визначення ефірних олій м'яти та куркуми в комплексно-

му лікарському засобі у формі капсул, що містить олії м'яти перцевої, куркуми довгої, суміш екстрактів цмину піщаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench), нагідок (*Caléndula officinális* L), моркви дикої (*Daucus carota*) та куркуми довгої (*Curcuma longa*).

Матеріали і методи дослідження

Використовували зразки ефірних олій куркуми та м'яти та РЛЗ (у формі капсул), який містить ефірні олії куркуми і м'яти та рослинні екстракти.

Для ідентифікації компонентів ефірних олій ви-

користували газовий хроматограф «6890N» із мас-селективним детектором 5975. Методики ідентифікації та кількісного визначення компонентів ефірних олій розробляли на газовому хроматографі Agilent 6890 N, який пройшов відповідну державну метрологічну атестацію та перевірку, а також має необхідну кваліфікацію.

Використовували спиртові розчини стандартних зразків ментолу (Fluka) та куркуми олії (Sami Labs Limited, Індія). Протягом досліджень використовували реактиви згідно з вимогами ДФУ для відповідних методів аналізу, розчини реактивів готували відповідно до вимог ДФУ [2].

Результати та їх обговорення

Комплексний РЛЗ містить сухий екстракт цмину піщаного квітів, екстракт моркви дикої плодів і нагідок квітів густий, сухий екстракт куркуми довгої й ефірні олії м'яти перцевої та куркуми. У нашій попередній роботі [3] обґрунтували вибір основних груп БАР, за якісним складом і кількісним вмістом яких визначатиметься якість цього РЛЗ.

Якість ефірної олії м'яти як активного фармацевтичного інгредієнта нормується вимогами Європейської фармакопеї (ЄФ), згідно з ними хроматографічний профіль має відповідати таким вимогам: лімонену – від 1,0% до 5,0%, цинеолу – від 3,5% до 14,0%, ментону – від 14,0% до 32,0%, ментофурану – від 1,0% до 9,0%, ізоментону – від 1,5% до 10,0%, ментилацетату – від 2,8% до 10,0%, ізопулеголу – не більше ніж 0,2%, ментолу – від 30,0% до 55,0%, пулегону – не більше ніж 4,0%, карвону – не більше ніж 1,0% [9].

Проаналізували різні зразки ефірної олії м'яти, що застосовуються на виробництві ПАТ «Галичфарм». Вміст ментолу за даними хроматографічних визначень і за результатами розрахунків із використанням стандартного зразка ментолу в різних зразках олії коливається від 45% до 50%, що вказує на відповідність використаних зразків олії м'яти за показником «вміст ментолу» вимогам ЄФ [9].

Отже, враховуючи результати дослідження різних зразків олії м'яти та зважаючи на необхідність її ідентифікації і кількісного визначення у готовому багатокомпонентному РЛЗ, вирішили як її аналітичний маркер обрати ментол.

Ефірна олія куркуми не описана у жодній із провідних фармакопей світу. За даними фахової літератури [6–8], основними компонентами олії куркуми є турмерони: α -турмерон, α -турмерон та β -турмерон. Аналізуючи різні зразки ефірної олії куркуми, встановили, що вміст турмеронів коливається від 55% до 78%: вміст α -турмерону становить від 23% до 29%, α -турмерону – від 20% до 26%, β -турмерону – від 22% до 25%.

Тому для встановлення тотожності РЛЗ щодо наявності куркуми олії, запропоновано ідентифікувати її основні компоненти – турмерони: наявність на хроматограмі піків, α -турмерону, α -турмерону та β -турмерону підтверджує ідентичність олії, а їхній сумарний вміст має відповідати кількісному показнику «вміст турмеронів» у специфікації на олію куркуми.

Компонентний склад ефірної олії куркуми дослідили з використанням стандартного зразка ефірної олії куркуми на газовому хроматографі з мас-селективним детектором. Виявили належність хроматографічних піків до основних представників α -, β - і α -турмеронів. На *рис. 1* наведена хроматограма розчину куркуми олії, яку одержали в умовах, що запропоновані в методиці ідентифікації та кількісного визначення ментолу і турмеронів у лікарському засобі.

Дослідження умов пробопідготовки дали змогу запропонувати етанол 96% для вилучення компонентів олії із проби; ультразвукову обробку протягом 5 хв – для підвищення ефективності вилучення з капсульної маси; центрифугування – для покращення осадження видимих твердих частинок і зменшення часу пробопідготовки; використання 1-тридеканолу як внутрішнього стандарту – для підвищення прецизійності вимірювання.

При виборі хроматографічної колонки дослідили характеристики піків ментолу і турмеронів, застосовуючи

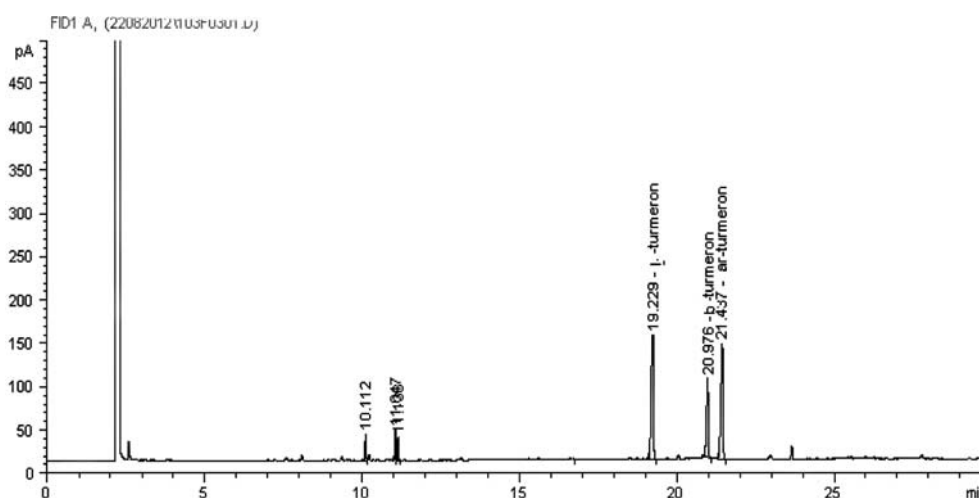


Рис. 1. Хроматограма спиртового розчину олії куркуми в умовах кількісного визначення ефірних олій м'яти перцевої та куркуми.

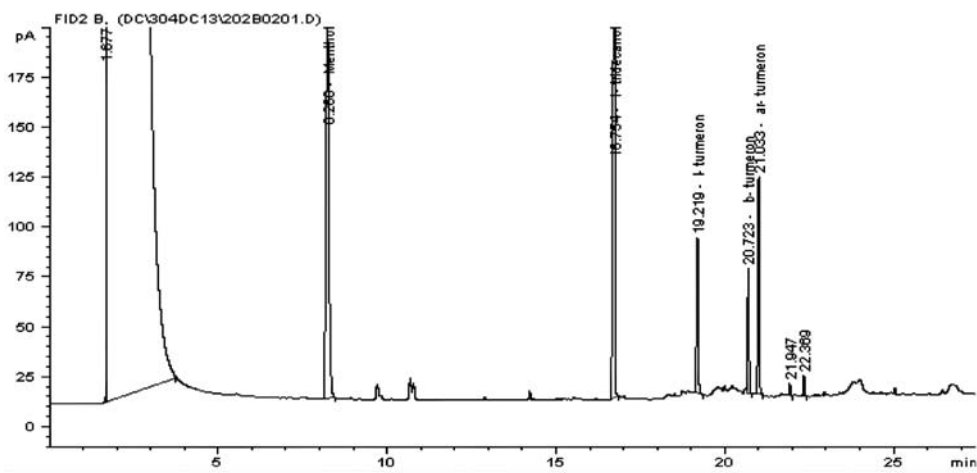


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння в умовах кількісного визначення ефірних олій м'яти перцевої та куркуми.

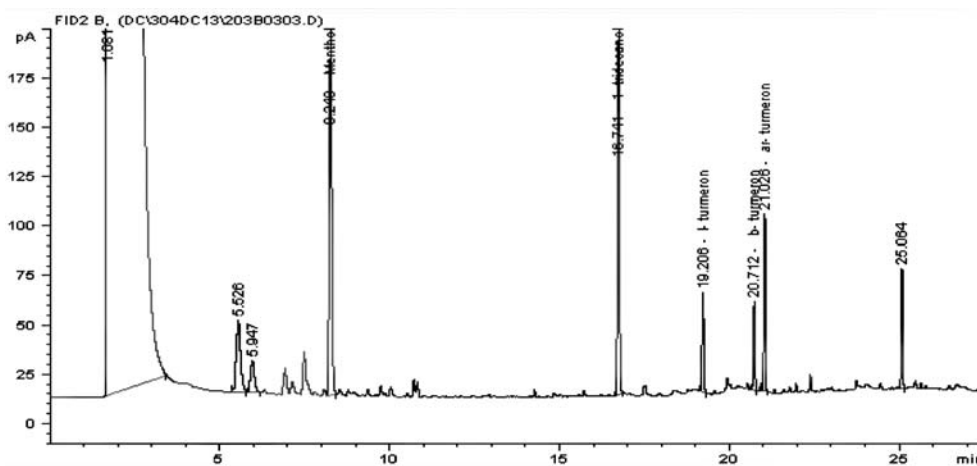


Рис. 3. Хроматограма випробовуваного розчину в умовах кількісного визначення ефірних олій м'яти перцевої та куркуми.

ряд колонок із макрогелом 20000 Р, наприклад, DB-WAX, HP-WAX. Найкращі значення коефіцієнтів розділення піків β-турмерону і α-турмерону, Ag-турмерону і β-турмерону, числа теоретичних тарілок, розрахованого за піком ментолу, параметрів придатності хроматографічної системи отримали на колонці фірми Agilent, HP-Innowax, 19091N-133. На рис. 2, 3 наведені хроматограми розчину порівняння і випробовуваного розчину, що одержані згідно з запропонованою методикою з колоною HP-Innowax, 19091N-133.

За результатами хроматографування розчину порівняння розрахували деякі хроматографічні характеристики піків речовин (табл. 1), що вказують на придатність хроматографічної системи [4].

Таблиця 1

Хроматографічні характеристики піків ментолу, α-турмерону, β-турмерону і Ag-турмерону в умовах кількісного визначення

Речовина	Час утримування, хв	Коефіцієнт розділення	Коефіцієнт симетрії	Число теоретичних тарілок
Ментол	8,3	-	1,1	57850
α-турмерон	19,2	3,8	0,9	601587
β-турмерон	20,7		0,9	984455
β-турмерон	20,7	1,6	0,9	984455
Ag-турмерон	21,0		0,8	1086300

Ефірні олії м'яти та куркуми пропонуємо ідентифікувати в умовах кількісного визначення за збігом часів утримування основних піків на хроматограмі випробовуваного розчину з часами утримування піків ментолу та 3 турмеронів на хроматограмі розчину порівняння.

Отже, для ідентифікації та кількісного визначення ефірних олій м'яти перцевої та куркуми пропонуємо таку методику.

Методика ідентифікації та кількісного визначення ментолу та турмеронів у лікарському засобі

Випробовуваний розчин. У центрифужну пробірку зважували 500 мг порошку розтертої капсульної маси, додавали 10 мл етанолу 96% Р, інтенсивно струшували протягом 5 хв, витримували в ультразвуковій бані протягом 5 хв і центрифугували зі швидкістю 5000 об/хв протягом 5 хв; надосадову рідину фільтрували в мірну колбу місткістю 25 мл через фільтр «біла стрічка» із 3 г натрію сульфату безводного Р, попередньо змоченого етанолом 96% Р. Екстракцію повторювали двічі по 6 мл етанолу 96% Р у цих же умовах, фільтрати об'єднували. Фільтр із натрій сульфатом промивали 2 мл етанолу 96% Р, до отриманого розчину додавали 2,0 мл розчину внутрішнього стандарту, перемішували та доводили до позначки етанолом 96% Р.

Розчин порівняння. 72,0 мг СЗ куркуми олії і 45,0 мг СЗ ментолу розчиняли в етанолі 96% Р і доводили об'єм розчину до 50,0 мл тим же розчинником. 5,0 мл отриманого розчину і 2,0 мл розчину внутрішнього стандарту доводили етанолом 96% Р до 25,0 мл, перемішували.

Розчин внутрішнього стандарту. 100,0 мг 1-тридеканолу розчиняли в етанолі 96% Р і доводили об'єм розчину етанолом 96% Р до 50,0 мл.

Контрольний розчин. Етанол 96% Р.

Колонка:

- матеріал: кварц;
- розмір – 30 м × 0,25 мм;
- нерухома фаза – макрогол 20000 Р (товщина шару 0,25 мкм);
- газ-носії: гелій для хроматографії Р;
- лінійна швидкість газу-носія – 1,5 мл/хв;
- поділ потоку – 1 : 1.
- температуру колонки програмували: початкова – 100°C, потім її підвищували зі швидкістю 5°C/хв до 180°C, витримували протягом 5 хв, згодом підвищували температуру до 220°C зі швидкістю 10°C/хв і витримували протягом 3 хв;
- температура блоку вводу проб – 220°C.;
- температура детектора – 250°C.;
- детектор – полум'яно-іонізаційний.

Хроматографували по 1 мкл контрольного розчину, розчину порівняння і випробовуваного розчину.

Порядок виходу піків на хроматограмі розчину порівняння: етанол, ментол, 1-тридеканол, α-турмерон, β-турмерон, Аг-турмерон.

Придатність хроматографічної системи:

- коефіцієнти розділення піків α-турмерону і β-турмерону, Аг-турмерону і β-турмерону, отримані для розчину порівняння, повинні бути не менше ніж 1,0;
- число теоретичних тарілок, що розраховане за піком ментолу на хроматограмі розчину порівняння, має бути не менше ніж 10 000;
- відносне стандартне відхилення, що розраховане за відношенням площ піків ментолу або суми площ α-турмерону, β-турмерону, і Аг-турмерону до площі піку 1-тридеканолу, повинне відповідати вимогам ДФУ.

Вміст ментолу (X) у капсулі в мг розраховують за формулою:

$$X = \frac{B_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{B_0 \cdot m_1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{B_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{B_0 \cdot m_1 \cdot 1000}$$

де B_1 – середнє значення відношення площі піку ментолу до площі піку 1-тридеканолу (внутрішній стандарт), розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

B_0 – середнє значення відношення площі піку ментолу до площі піку 1-тридеканолу (внутрішній стандарт), розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_1 – маса наважки капсульної маси, мг;

m_0 – маса наважки СЗ ментолу, взятої для приготування розчину порівняння, мг;

P – вміст ментолу (зазначений у сертифікаті), у %;

b – середня маса вмісту капсули, мг.

Вміст суми турмеронів (X) в капсулі в мг розраховують за формулою:

$$X = \frac{\sum B_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{\sum B_0 \cdot m_1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{\sum B_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{\sum B_0 \cdot m_1 \cdot 1000}$$

де $\sum B_1$ – середнє значення відношення суми площ піків Аг-турмерону, α-турмерону і β-турмерону до площі піку 1-тридеканолу (внутрішній стандарт), розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

$\sum B_0$ – середнє значення відношення суми площ піків Аг-турмерону, α-турмерону і β-турмерону до площі піку 1-тридеканолу (внутрішній стандарт), розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки олії куркуми, що взята для приготування розчину порівняння, мг;

m_1 – маса наважки капсульної маси, мг;

P – вміст турмеронів, що вказаний у сертифікаті на СЗ куркуми олії, %;

b – середня маса вмісту капсули, мг.

Для вивчення селективності ідентифікації дослідили поведінку інших компонентів капсули. Встановили, що на хроматограмі розчину плацебо відсутні піки, які за часом утримування збігалися б із піками α-турмерону, β-турмерону, Аг-турмерону, ментолу чи 1-тридеканолу. Отже, інші активні фармацевтичні інгредієнти капсули не впливають на кількісне визначення компонентів ефірних олій м'яти та куркуми, тому запропонована методика є селективною.

У запропонованих умовах проаналізували ефірні олії та капсули, результати визначення компонентів наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати визначення ментолу і турмеронів методом газової хроматографії (P = 0,95, n = 5)

Зразок	Вміст, %	
	Ментол	Сума турмеронів
Олія м'яти перцевої	48,2±0,1	-
Олія куркуми	-	58,1±0,1
Зразок	Вміст, мг/капсулу	
Капсули РЛЗ, серія 10612	3,05±0,04	2,78±0,05
Капсули РЛЗ, серія 20612	3,32±0,05	3,75±0,04
Капсули РЛЗ, серія 10113	2,51±0,04	2,64±0,04
Капсули РЛЗ, серія 20113	2,84±0,03	3,40±0,04
Капсули РЛЗ, серія 30513	3,62±0,04	3,41±0,03

Враховуючи результати визначення вмісту ментолу і турмеронів в ефірних оліях і вмісту цих олій у готовому лікарському засобі, а також результати аналізу РЛЗ, запропоновано кількісний критерій якості капсул, які дослідили: вміст ментолу – від 2,0 мг до 4,5 мг, вміст турмеронів – від 2,0 мг до 5,0 мг із розрахунку на середню масу вмісту капсули.

Висновки

1. Дослідили хроматографічні умови ідентифікації та кількісного визначення ефірних олій м'яти і куркуми у багатокомпонентному лікарському засобі рослинного

походження, визначили оптимальні умови пробопідготовки та аналізу методом газової хроматографії. Як ідентифікаційні маркери при встановленні тотожності лікарського засобу запропонували обрати ментол і турмерони.

2. Розробили методики ідентифікації та кількісного визначення ментолу, α -, β - і Ag-турмеронів у лікарському засобі на основі екстрактів та ефірних олій м'яти і куркуми методом газової хроматографії.

Список літератури

1. Сур С.В. Методологія оцінки якості рослинних лікарських засобів на підставі результатів, одержаних за допомогою сучасних аналітичних методів / С.В. Сур // Фармацевтичний журнал. – 2002. – №6. – С. 64–71.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Х. : PIPEГ, 2001. – 556 с.
3. Смалюх О. Стандартизація багатокомпонентного рослинного лікарського засобу / О. Смалюх, С. Сур // Фармацевтичний часопис. – 2014. – №2(16). – С. 13.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Доповнення 3. – Х. : PIPEГ, 2009. – 32 с.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Х. : PIPEГ, 2008. – 85 с.
6. WHO monographs on selected medicinal plants, Rhizoma Curcumae Longae. – Geneva : World Health Organization, 1999.
7. Patent Application Publicatin. Navarro et al. Pub.No.: US 2005/0208157 A1, Pub. Date Sep.22.2005, United States.
8. Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and chromatography-mass spectrometry / N.Y. Qin, F.Q. Yang, Y.T. Wang, S.P. Li // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2007. – Vol. 43. – С. 486–492.
9. European Pharmacopoeia 7.0. Peppermint oil, monograph 01/2008:0405 – p. 1214.

References

1. Sur, S. (2002). Metodolohiia otsinky yakosti roslynykh likarskykh zasobiv na pidstavi rezultativ, oderzhanykh za dopomohoiu suchasnykh analitychnykh metodiv [Methodology for evaluating the quality of herbal medicines on the basis of the results obtained by using modern analytical methods]. *Farmatsevychnyi zhurnal*, 6, 64–71. [in Ukrainian].
2. (2001) *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]* Kharkiv. [in Ukrainian].
3. Smaliukh, O., & Sur, S. (2014) Standartyzatsiia bahatokomponentnoho roslynnoho likarskoho zasobu [Standardization of complex herbal medicine product]. *Farmatsevychnyi chasopys*, 2(16), 13. [in Ukrainian].
4. (2009). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]* Kharkiv. [in Ukrainian].
5. (2008). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]* Kharkiv. [in Ukrainian].
6. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants, Rhizoma Curcumae Longae. Geneva: World Health Organization.
7. (2005). Patent Application Publicatin. Navarro et al. Pub.No.: US 2005/0208157 A1, Pub. Date Sep.22.2005, United States.
8. Qin, N. Y., Yang, F. Q., Wang, Y. T., & Li, S. P. (2007). Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 486–492. doi: 10.1016/j.jpba.2006.07.034.
9. (2008). European Pharmacopoeia 7.0. Peppermint oil, monograph 01/2008:0405.

Відомості про автора:

Смалюх О.Г., начальник аналітичної лабораторії, дослідний центр ПАТ «Галичфарм», E-mail: osmalyuh@gmail.com.

Сведения об авторе:

Смалюх О.Г., начальник аналитической лаборатории, опытный центр ПАО «Галичфарм», E-mail: osmalyuh@gmail.com.

Information about author:

Smalyuh O.G., Chief of Analytical laboratory, Research Center, AC «Halychpharm», E-mail: osmalyuh@gmail.com.

Надійшла в редакцію 01.12.2014 р.