



Разработка методик качественного и количественного анализа суппозиторий с экстрактом маклюры оранжевой

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина,

²Южно-Казахстанская государственная фармацевтическая академия, г. Шымкент, Казахстан

Ключевые слова: стандартизация, фитостерины, тритерпены, изофлавоноиды, суппозитории.

В последние годы широкое применение в терапии заболеваний предстательной железы нашли препараты растительного происхождения. С целью разработки методик качественного и количественного анализа использовали суппозитории с масляным экстрактом маклюры, полученные методом выливания в поливинилхлоридные формы (основа – твердый жир). Использовали физико-химические методы, рекомендованные государственными фармакопеями Украины и Казахстана. В результате разработаны методики, позволяющие провести качественную и количественную оценку действующих веществ суппозиторий с экстрактом маклюры для дальнейшего изучения препарата в качестве простатопротекторного средства. Для идентификации действующих веществ суппозиторий подобраны условия для проведения тонкослойной хроматографии. Разработаны спектрофотометрические методики количественного определения сумм фитостеринов, тритерпенов и изофлавоноидов.

Розробка методик якісного та кількісного аналізу супозиторіїв з екстрактом маклюри помаранчевої

В. А. Коротков, О. С. Кухтенко, Н. Ю. Бевз, В. О. Грудько, Е. В. Гладух

Останніми роками широкого застосування в терапії захворювань передміхурової залози набули препарати рослинного походження. З метою розробки методик якісного й кількісного аналізу використали супозиторії з олійним екстрактом маклюри оранжевої, що отримали методом виливання у полівинілхлоридні форми (основа – твердий жир). Використовували фізико-хімічні методи, що рекомендовані державними фармакопеями України та Казахстану. У результаті розробили методики, котрі дають можливість здійснити якісне і кількісне оцінювання діючих речовин супозиторіїв з екстрактом маклюри для вивчення надалі цього препарату як простатопротекторного засобу. Для ідентифікації діючих речовин супозиторіїв дібрані умови для проведення тонкошарової хроматографії. Розроблені спектрофотометричні методики кількісного визначення сум фітостеринів, тритерпенів і ізофлавоноїдів.

Ключові слова: стандартизація, фитостерины, тритерпены, изофлавоноиды, супозитории.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 27–30

The development of quantitative and qualitative analysis methods of suppositories with *Maclura Pomifera* extract

V. A. Korotkov, A. S. Kukhtenko, N. Yu. Bevez, V. A. Grudko, E. V. Gladuh

Aim. In this study the methods that allow to perform qualitative and quantitative assessment of suppositories with *Maclura Pomifera* extract have been developed, in order to study this medication as a prostate protector in future.

Conclusion. Conditions for identification of suppositories by carrying out thin layer chromatography have been selected. Spectrophotometric methods of quantitative assessment of phytosterols, triterpenes and isoflavones amount have been developed.

Key words: Standards, Phytosterols, Triterpenes, Isoflavones, Suppositories.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 2 (15): 27–30

Хронический простатит и аденома простаты остаются весьма распространенными заболеваниями. Высокая социальная значимость этой проблемы обусловлена тем, что эти патологии отмечают во всех возрастных и этнических группах мужского населения, они негативно влияют на половую, репродуктивную функции и психоэмоциональную сферу и сопровождаются существенным ухудшением качества жизни мужчин [1,2].

В последние годы широкое применение в терапии заболеваний предстательной железы нашли препараты растительного происхождения. Это связано с тем, что благодаря наличию в них различных групп биологически активных веществ (БАВ) обеспечивается всестороннее влияние на несколько звеньев патогенеза заболевания, кроме того, возникает меньшее количество побочных эффектов, чем при использовании синтетических лекарственных средств.

Эффективность фитопрепаратов, полученных из маклюры оранжевой, прежде всего связывают с содержанием в них фитостеринов и тритерпенов. Они обладают многофункциональным механизмом действия: ингибируют простагландины, обеспечивая противовоспалительный эффект, цитотоксически влияют на гиперплазированные клетки предстательной железы, проявляют блокирующее действие на гормональные рецепторы и ряд других механизмов [3,4].

Масляный экстракт плодов маклюры (МЭМ) оранжевой (*Maclurapomifera*, *Moraceae*), который мы получили, – богатый источник тритерпенов и фитостеринов. В предыдущих исследованиях отмечено содержание в нем таких веществ, как лупеол и β-ситостерин, известных своими простатопротекторными свойствами, а также наличие изофлавонов, обладающих противовоспалительными и антиоксидантными свойствами [5–8].

На основании этого мы разработали фитосуппозитории с экстрактом маклюры, для дальнейшего медицинского применения которых необходимо разработать методики стандартизации.

Цель работы

Разработка методик качественного и количественного анализа суппозиторий с масляным экстрактом маклюры оранжевой.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – суппозитории с масляным экстрактом маклюры, полученные методом выливания в поливинилхлоридные формы. В качестве основы использован твердый жир.

При разработке методик качественного и количественного анализа суппозиторий использовали физико-химические методы, рекомендованные государственными фармакопеями Украины и Казахстана [9,10].

Для идентификации ингредиентов суппозиторий применена хроматография в тонком слое сорбента. Определение проводили на хроматографических пластинах марки «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ 10×15. Содержание в анализируемых суппозиториях веществ флавоноидной структуры дополнительно подтверждали хромогенными реакциями.

Количественное определение действующих веществ проводили спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой и видимой области. Для анализа использовали спектрофотометры марки Thermo Scientific Evolution S60 (США) и Apel PD303S (Япония).

Определение суммы фитостеринов и тритерпенов проводили в пересчете на достоверный образец лупеол («Santa Cruz Biotechnology», США; CAS: 545-47-1). Определение суммы изофлавоноидов проводили в пересчете на достоверный образец осайин («BioBioPhaCo., Ltd.», Китай; CAS:482-53-1). Эти вещества выбрали в связи с их преобладающим содержанием в исследуемом объекте.

Действующие вещества из суппозиторной массы извлекали спиртом. Определение проводили на хроматографической пластине восходящим методом.

5 суппозиторий растворяли в 10 мл спирта при нагревании 50°C, после охлаждения фильтровали. Спиртовое извлечение наносили на пластину, помещали в насыщенную элюентом хроматографическую камеру и хроматографировали восходящим методом. Пластинки детектировали 1% спиртовым раствором ванилина. Затем высушивали в течение 5–7 мин при температуре 105°C.

Результаты и их обсуждение

Ранее мы установили, что масляный экстракт маклюры содержит фитостерины и изофлавоны. Для их идентификации в составе суппозиторий разработали методику идентификации при совместном наличии методом тонкослойной хроматографии. Для этого экспериментально подобрали оптимальную систему растворителей: гексан-этилацетат (9:2).

В спиртовом извлечении из суппозиторной массы отмечают 2 пятна фиолетового цвета с Rf 0,8 и 0,57 на уровне пятен раствора сравнения (лупеол и β-ситостерин) и

2 пятна желтого цвета с Rf 0,45 и 0,21 на уровне пятен раствора сравнения (осайин и помиферин)

Это же спиртовое извлечение давало положительные реакции на изофлавоны с 2% раствором алюминия хлорида при нагревании (желтое окрашивание), с 1% раствором железа хлорида (темно-зеленое окрашивание), с 0,1 М раствором калия гидроксида (зеленое окрашивание).

Для разработки методики количественного определения суммы тритерпенов и фитостеринов в суппозиториях использовали их способность переходить в неполярные растворители из неомыляемой фракции и далее давать окрашенные комплексы при взаимодействии с концентрированной серной кислотой. Оптическую плотность полученного окрашенного раствора определяли на спектрофотометре при длине волны 309 нм (рис. 1).

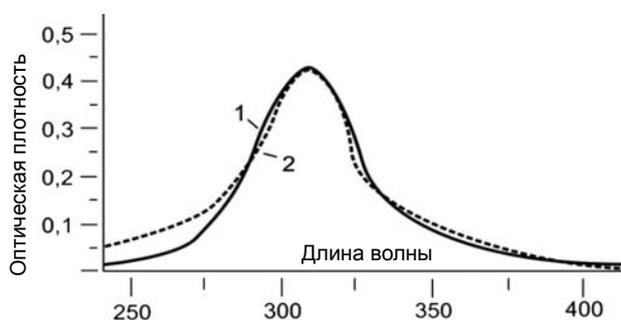


Рис. 1. Спектры поглощения суммы фитостеринов и тритерпенов из суппозиторной массы (1) и лупеола (2) после реакции взаимодействия с серной кислотой.

Методика анализа: около 4 г измельченных суппозиторий (точная навеска) помещаются в колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником. Прибавляют 50 мл 2 М раствора калия гидроксида спиртового и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, часто перемешивая содержимое колбы круговыми движениями. Охлаждают до комнатной температуры и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку, содержащую 100 мл воды и 10 г натрия хлорида. Осторожно взбалтывают с 50 мл гексана в течение 5 минут. Экстракцию гексана проводят еще дважды, используя 50 мл гексана. Гексановые фракции собирают в другой делительной воронке и встряхивают с несколькими порциями воды по 40 мл до отрицательной щелочной реакции. Далее гексановое извлечение упаривают под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в концентрированной серной кислоте и количественно переносят в мерную колбу на 25 мл. Объем раствора доводят до метки концентрированной серной кислотой (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем до метки концентрированной серной кислотой. Измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 309 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве компенсационного раствора используя концентрированную серную кислоту.

Содержание суммы тритерпеноидов и фитостеринов (в пересчете на лупеол) в 1 суппозитории рассчитывают (в мг) по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot m_{st} \cdot b \cdot 1000}{A_{st} \cdot m \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A \cdot m_{st} \cdot b \cdot 250}{A_{st} \cdot m}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; b – средняя масса суппозитория, г; m – масса навески препарата, г; A_{st} – оптическая плотность раствора стандартного образца; m_{st} – масса стандартного образца, г.

Приготовление раствора стандартного образца лупеола. 0,01 г (точная навеска) лупеола растворяют в 60 мл спирта этилового при нагревании и после охлаждения доводят до 100 мл (раствор А). 1 мл раствора А переносят в выпарительную чашку и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в концентрированной серной кислоте и количественно переносят в мерную колбу на 25 мл, после чего доводят концентрированной серной кислотой до метки.

Для количественного определения суммы изофлавоноидов использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на избирательном взаимодействии раствора алюминия хлорида с соединениями флавоноидной структуры. В результате образуется раствор насыщенного желтого цвета, что позволяет определить его оптическую плотность в видимой области спектра.

Методика анализа: около 10 г измельченных суппозиторий (точная навеска) отвешивают в коническую колбу, прибавляют 20 мл 95% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин при перемешивании. Полученный раствор охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 50 мл и доводят спиртом этиловым до метки (раствор А).

5 мл раствора А переносят в мерную колбу на 25 мл, добавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида и нагревают при температуре 80°C в течение 30 мин. Раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки. Раствор сравнения готовят аналогично, без добавления алюминия хлорида. Измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 419 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения (рис. 2).

Содержание суммы изофлавоноидов (в пересчете на осайин) в 1 суппозитории рассчитывают (в мг) по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 5 \cdot m_{st} \cdot b \cdot 1000}{A_{st} \cdot m \cdot 100 \cdot 5 \cdot 25} = \frac{A \cdot m_{st} \cdot b \cdot 500}{A_{st} \cdot m}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; b – средняя масса суппозитория, г; m – масса навески препарата, г; A_{st} – оптическая плотность раствора стандартного образца; m_{st} – масса стандартного образца, г.

Список литературы

1. Переверзев А.С. Заболевания предстательной железы [Текст] / А.С. Переверзев, Н.Ф. Сергиенко, Ю.А. Илюхин. – Х. : Наукова думка, 2005. – 260 с.
2. Аль-шукри С.Х. Современные методы лечения хронического простатита (обзор литературы) / С.Х. Аль-шукри, Д.Н. Солихов // Нефрология. – 2009. – Т. 13. – № 2. – С. 86–91.

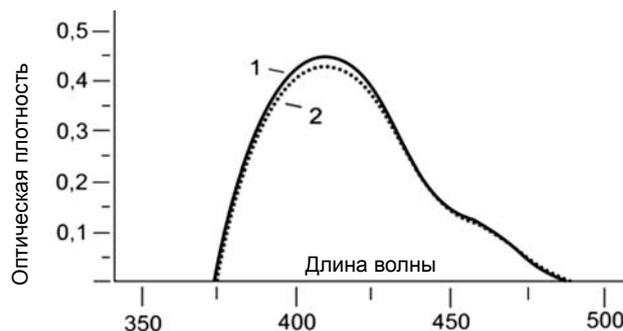


Рис. 2. Спектры поглощения суммы изофлавоноидов в суппозиториях (1) и осайина (2) при взаимодействии с раствором алюминия хлорида.

Приготовление раствора стандартного образца осайина. Около 0,025 г (точная навеска) осайина растворяют в 40 мл спирта этилового при нагревании и после охлаждения доводят до 100 мл (раствор А). 5 мл раствора А переносят в мерную колбу на 25 мл, добавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида и нагревают вместе с исследуемым образцом при температуре 80°C в течение 30 мин. Далее раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки. Раствор сравнения готовят аналогично, без добавления алюминия хлорида.

Статистически обработанные результаты количественных определений приведены в таблице 1.

Таблица 1

Метрологические характеристики количественного определения основных групп БАВ в суппозиториях с экстрактом маклюры $t(95,6) = 2,45$

| БАВ | \bar{x} | S | $S_{\bar{x}}$ | $\Delta\bar{x}$ | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ | $\bar{\epsilon}$ |
|----------------------------------|-----------|--------|---------------|-----------------|-----------------------------|------------------|
| Сумма фитостеринов и тритерпенов | 1,5311 | 0,0458 | 0,0187 | 0,0480 | 1,5311 \pm 0,0480 | 3,13% |
| Сумма изофлавоноидов | 2,4112 | 0,0539 | 0,0220 | 0,0540 | 2,4112 \pm 0,0540 | 2,24% |

Таким образом, разработали методики, позволяющие проводить качественную и количественную оценку суппозиторий с экстрактом маклюры. Относительная погрешность не превышала для суммы фитостеринов и тритерпенов $\pm 3,13\%$, для суммы изофлавоноидов – $\pm 2,24\%$.

Выводы

Разработана методика идентификации суппозиторий с экстрактом маклюры методом тонкослойной хроматографии.

Разработана методика количественного определения в суппозиториях суммы фитостеринов и тритерпенов в пересчете на лупеол. Ошибка метода не превышает $\pm 3,13\%$.

Разработана методика количественного определения в суппозиториях суммы изофлавоноидов в пересчете на осайин. Ошибка метода не превышает $\pm 2,24\%$.

- масляного экстракту плодів маклюри / В.А. Коротков, О.С. Кухтенко, Е.В. Гладух // Фармацевтичний журнал. – 2013. – №. 6. – С. 24–29.
6. Saloua F. Chemical composition and profile characteristics of Osage orange (*Maclurapomifera*) / F. Saloua, N.I. Eddine, Z. Hedi // *Industrial crops and products*. – 2009. – Vol. 29. – № 1. – P. 1–8.
 7. Gallo M.B.C. Biological activities of lupeol / M.B.C. Gallo, M.J. Sarachine // *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* – 2009. – Vol. 3. – № 1. – P. 44–66.
 8. Tsao R. Antioxidant isoflavones in osage orange, *Maclurapomifera* (Raf.) Schneid / R. Tsao, R. Yang, J.C. Young // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – №. 22. – P. 6445–6451.
 9. Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Астана. – 1-е изд. – 2008. – 591 с.
 10. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – X. : PIPEГ, 2001. – 531 с.
- References**
1. Pereverzev, A. S., Sergienko, N. F., & Ilyuhin Yu. A. (2005) *Zabolevaniya predstate'noj zhelezy [Diseases of the prostate]*. Kharkiv: Naukova dumka. [in Ukrainian].
 2. Al-Shukri, S. H., & Solihov, D. N. (2009) *Sovremennye metody lecheniya khronicheskogo prostatita (obzor literatury) [Modern methods of treatment of chronic prostatitis]*. *Nephrologiya*, 13(2), 86–91. [in Russian].
 3. Korotkov, V. A. (2013) *Sravnitel'nyj analiz rynka prostatoprotektorov Kazahstana, Rossii i Ukrainy [Comparative Market Analysis prostatoprotektorov Kazakhstan, Russia and Ukraine]*. *Vestnik JuKGFA*, 3(64), 6–10. [in Kazakhstan].
 4. Miroschnikov, V. (2005) *Lekarstvennye rasteniya i preparaty rastitel'nogo proiskhozhdeniya v urologii [Medicinal plants and herbal drugs in urology]*. Moscow: *MEDpress-Inform*. [in Russian].
 5. Korotkov, V. A., Kukhtenko, O. S., Gladuh, E. V. (2013) *Vybir optymalnoi tekhnologii otrymannia maslianoho ekstraktu plodiv makliury [Choice Optimal technology for the oil extract of makliury]*. *Farmatsevtichni zhurnal*, 6, 24–29. [in Ukrainian].
 6. Saloua, F., Eddine, N. I., & Hedi, Z. (2009) *Chemical composition and profile characteristics of Osage orange (Maclurapomifera)*. *Industrial crops and products*, 29(1), 1–8. doi: 10.1016/j.indcrop.2008.04.013.
 7. Gallo, M. B. C., & Sarachine, M. J. (2009) *Biological activities of lupeol*. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.*, 3(1), 44–66.
 8. Tsao, R., Yang, R., & Young, J. C. (2003) *Antioxidant isoflavones in osage orange, Maclurapomifera (Raf.) Schneid*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(22), 6445–6451. doi: 10.1021/jf0342369.
 9. (2008) *State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan*. Astana. [in Kazakhstan].
 10. (2001) *Derzhavna farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]*. Kharkiv: RIREH. [in Ukrainian].

Сведения об авторах:

Коротков В.А., преподаватель каф. фармацевтической химии, Южно-Казахстанская фармацевтическая академия, аспирант каф. промышленной фармации, Национальный фармацевтический университет, E-mail: farmacevt.vk@gmail.com.
Кухтенко А.С., к. фарм. н., доцент каф. промышленной фармации, Национальный фармацевтический университет.
Бевз Н.Ю., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтической химии, Национальный фармацевтический университет.
Грудько В.А., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтической химии, Национальный фармацевтический университет.
Гладух Е.В., д. фарм. н., профессор, зав. каф. промышленной фармации, Национальный фармацевтический университет.

Надійшла в редакцію 22.01.2014 р.