АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ СЫРЬЯ ILEX PARAGUARIENSIS ST. HIL. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАВ В ЭКСТРАКТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

Г.В. Раменская[1], Е.А. Родионова[1], О.Ю. Щепочкина[1], Ю.В. Медведев[3], И.Е. Шохин[3], И.Б. Каденаци[3], Л.В. Шустова[3], Л.А. Павлова[2]

1 Кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ПМГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России

2 лаборатория биологически активных соединений НИИ Фармации ГБОУ ВПО ПМГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России

3 отдел разработки лекарственных средств НИИ Фармации ГБОУ ВПО ПМГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России



В ходе исследований изучено 7 объектов: измельченные листья падуба парагвайского, горькие чаи кудин, зеленый чай, черный чай и зерна кофе. Подобраны оптимальные условия экстракции БАВ. Разработана методика определения метилксантинов (теобромина, теофиллина, кофеина) и хлорогеновой кислоты (и ее изомеров) в экстрактах растительного происхождения методом ВЭЖХ с УФ-детектором. Методика валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность. Данная методика может быть рекомендована для анализа сырья и препаратов падуба парагвайского.

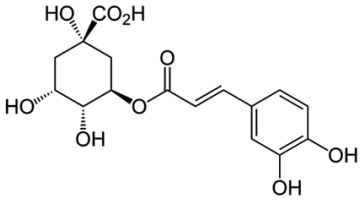
Введение

Падуб парагвайский (Ilex paraguariensis A.St.-Hil.) – растение из рода Падуб (Ilex) семейства Падубовые (Aquifoliaceae) – произрастает в диком виде в субтропических регионах Южной Америки (Аргентине, Бразилии, Уругвае и Парагвае), где также культивируется. Из его измельченных и обработанных особым способом молодых листьев и побегов готовят настой, известный под названием мате. Напиток широко используется в традиционной культуре индейцев вместо кофе, как тонизирующий напиток [1,12].

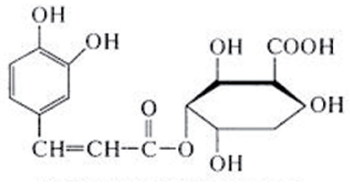
В результате многочисленных исследований было выявлено его психостимулирующее, антиоксидантное, противодиабетическое, антимикробное и гиполипидемическое действие [2,3,7]. Также было выявлено положительное влияния мате на снижение веса и изменение биохимических показателей крови при ожирении [4].

Широкий спектр фармакологической активности обусловлен содержанием фенольных соединений, в основном кофеоилхинных производных (хлорогеновой кислоты) и метилксантинов, таких как теобромин, теофилин и кофеин [5,6].

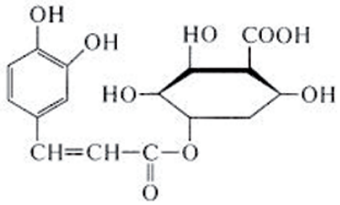
Хлорогеновые кислоты – это обобщенное название продуктов этерификации хинной и кофейной кислот [9-11]. При этом даже среди моноэфиров может быть четыре изомера, из которых обычно отмечают три реально встречающихся: кофеоил-3-хинная (хлорогеновая), кофеоил-4-хинная (криптохлорогеновая) и 5-кофеоилхинная (неохлорогеновая) кислоты (рис. 1).



Хлорогеновая кислота
(кофеил-3-хинная кислота)



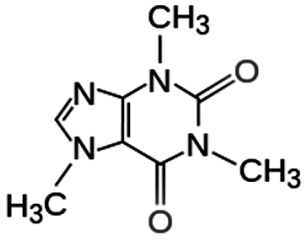
Криптохлорогеновая кислота
(кофеил-4-хинная кислота)



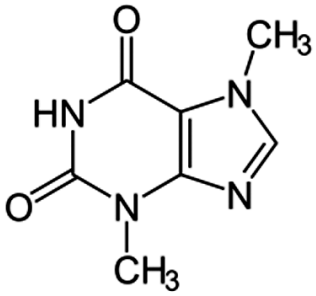
Неохлорогеновая кислота
(кофеил-5-хинная кислота)

Рисунок 1. Структура хлорогеновой, неохлорогеновой и криптохлорогеновой кислот.

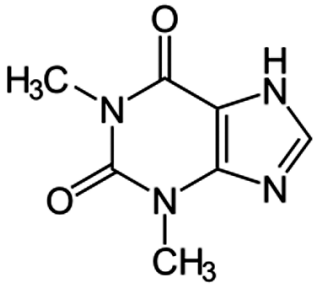
Кофеин, теобромин и теофиллин (рис.2) относятся к группе природных пуриновых алкалоидов ксантинового ряда. Кофеин – наиболее часто используемый в мире природный психостимулятор, одно из самых известных и древнейших биологически активных веществ, применяемых для повышения физической и умственной работоспособности.



Кофеин
(1,3,7-диметилксантин)



Теобромин
(3,7-диметилксантин)



Теофиллин
(1,3-диметилксантин)

Рисунок 2. Структура кофеина, теобромина и теофиллина.

Для одновременного определения кофеина и хлорогеновой кислоты с помощью метода ВЭЖХ, в литературе были представлены различные хроматографические условия: 1) Подвижная фаза - смесь метанола и 0,2 М ацетатного буфера (pH 3,6) (15:85), протекающей со скоростью 1,0 мл/мин, длина волны (λ) детектирования устанавливается при 300 нм; 2) Подвижная фаза - метанол: вода: уксусная кислота (19:81:1,5), протекающей при 1,0 мл/мин, детектирование при λ при 240 нм. 3) В третьем методе использовали линейный градиент, подвижную фазу меняли со 100% растворителя А (вода: уксусная кислота, 95:5) до 100% растворителя В (метанол: уксусная кислота, 95:5) в течение 65 мин при скорости потока 1 мл/мин [12].

Из литературных данных известно, что мате показало более высокое содержание полифенольных соединений 7,73 ± 0,15 мг хлорогеновой кислоты/мл водного экстракта, чем зеленый чай 7,15 ± 0,14 мг хлорогеновой кислоты/мл водного экстракта. [1] Содержание кофеина в листьях падуба парагвайского – 5,7 ± 0,2 мг/г, теобромина – 1,8 ± 0,7 мг/г.

Среди растительных источников, содержащих метилксантины и хлорогеновую кислоту и обладающих психостимулирующим и антиоксидантным действие, следует отметить такие растения как горький чай кудин- Ligustrum robustum и Ilex kudingcha, зеленый и черный чай (The asinensis L.) и зерна кофе (Coffea Arabica L.).

Целью данного исследования является разработка и валидация методики определения качественного и количественного состава БАВ в растительном сырье и продуктах его переработки методом ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1290 четырехканальный насос	G4220A
1290 термостат колонок	G1316C
1290 автосамплер	G4226A
1290 диодно-матричный детектор	G4212A

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18 3,0×100 мм 2,7 мкм.
Температура колонки	40 °C
Скорость потока	0,8 мл/мин
Объем вводимой пробы	1 мкл
Детектирование	272 нм -пурины, 330 нм -гидроксикоричные кислоты

В результате экспериментальных исследований оптимальными условиями разделения биологически активных веществ оказались условия, представленные в таб. 2. Элюирование в этом случае осуществляли смесью 50 мМ фосфатный буфер pH 2,5 («A») и ацетонитрила («B») (градиент ступенчатый).

Время [мин]	A [%]	B [%]
0,00	98,00	2,00
11,00	98,00	2,00
12,00	94,00	6,00
18,00	94,00	6,00
18,10	98,00	2,00
21,00	98,00	2,00

Сначала по тексту идет таблица 2, а потом таблица 1, что не логично.

Детектирование

Для повышения чувствительности методики детектирование проводили при различных длинах волн: для обнаружения метилксантинов (теобромина, теофиллина, кофеина) - 272 нм, а для хлорогеновой кислоты (и ее изомеров) – 330 нм. Выбор длины волны основан на изучении спектров поглащения изучаемых БАВ. Хлорогеновая кислота имеет несколько максимумов поглощения в УФ-области (328-333 нм), однако поглощение при длине волны 330 нм характеризуется наибольшей специфичностью [8].

Программное обеспечение

Agilent ChemStation ver. A.01.04.122

Объекты исследования

Измельченное сырье, представленное в таб. 1.

№ п/п	Наименование образца	Форма выпуска
1	Мате «AndressitoDespalada»	сырье в пачках
2	Мате «Don Lucos»	сырье в пачках
3	Горький чай кудин- Ligustrumrobustum	на развес
4	Горький чай кудин- Ilexkudingcha	на развес
5	Зеленый чай Китайский «Сенча»	на развес
6	Черный чай Цейлонский «HanseTee»	сырье в пачках
7	Обжаренные зерна кофе «Альтура», Куба	на развес

Таблица 1. Данные о наименовании и форме выпуска исследованных образцов.

Стандартные вещества теобромин, теофиллин, кофеин и хлорогеновая кислота были получены от Sigma Chemical Co.

Пробоподготовка

Для пробоподготовки использовались весы электронные аналитические QHAUS Adventurer, ультрозвуковая ванна Bandelin Sonorex DigitecDT 31 H, лабораторный pH-метр pH 827 lab.

Для приготовления подвижно фазы использовали ацетонитрил марки Ultra Gradient Grade, бидистиллированную воду, натрия дигидрофосфат дигидрат, фосфорную кислоту. Для экстракции БАВ применяли дистиллированную воду, этиловый спирт.

Подготовка проб с растворителем - дистиллированная вода: образец сырья тщательно измельчали в ступке, отбирали около 0,5 г (точная навеска), помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, экстрагировали 50 мл дистиллированной водой в течение 60 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Далее пробу обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин, полученный раствор отфильтровывали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Подготовка проб с растворителем – раствор этилового спирта: образец сырья тщательно измельчали в ступке, отбирали около 0,5 г (точная навеска), помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, экстрагировали 50 мл раствором этилового спирта в течение 60 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Далее пробу обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут, полученный раствор отфильтровывали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики проводили методом математической статистики по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность [14].

Селективность

Времена удерживания стандартных растворов совпадают с временами удерживания индивидуальных веществ в извлечениях из растительного сырья.

В качестве примера разделения метилксантинов и хлорогеновой кислоты в предложенных условиях на рис. 3 приведена хроматограмма мате «DonLucos» (70% этанольный экстракт).

Во время подбора условий хроматографирования были обнаружены «критические пары» плохо разделяемых веществ: 5-КХК и теофиллин, а также 3-КХК и кофеин. При низком содержании ацетонитрила (2-10%) в подвижной фазе в условиях изократического элюирования наблюдалось хорошее разделение 5-КХК и теобромина (селективность более 1) и неудовлетворительное разделение 3-КХК и кофеина (селективность менее 1), кроме того, для сильноудерживаемых компонентов наблюдалось значительное размытие пиков и увеличение времени анализа.При высоком содержании ацетонитрила в условиях изократического элюирования наблюдалось неудовлетворительное разделение 5-КХК и теобромина (селективность менее 1) и хорошее разделение 3-КХК и кофеина (селективность более 1). В результате была применена градиентная схема элюирования, позволившая добиться удовлетворительного разделения «критических пар» (селективность для обоих пар стала более 1).

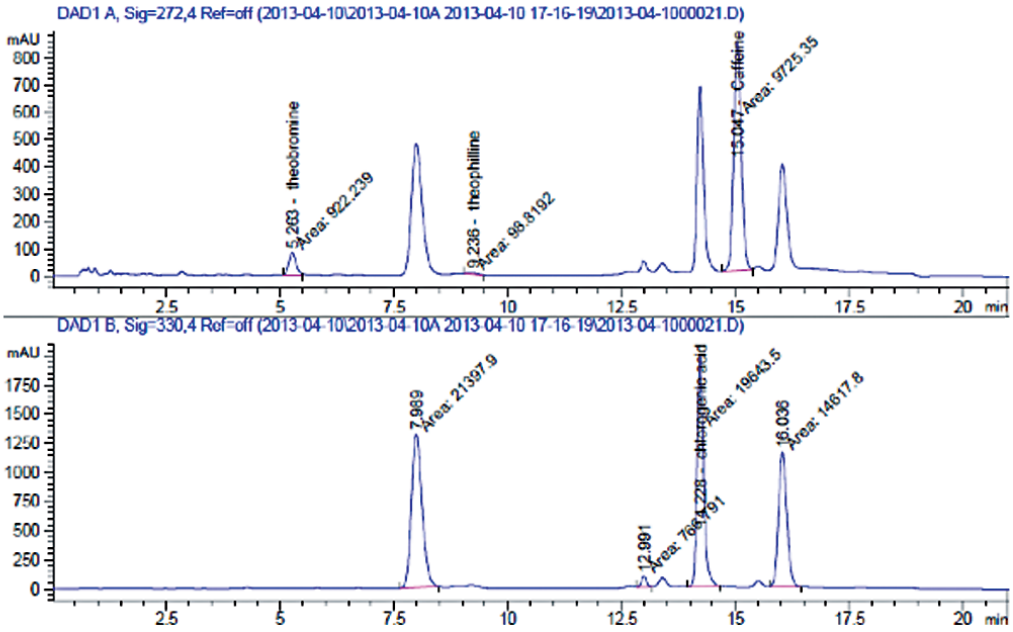


Рисунок 3. Хроматограмма извлечения 70% этиловым спиртом из мате «DonLucos».

Из таб.3 видно, что коэффициенты разделения в извлечении мате составили: теобромина и неохлорогеновая кислота – 4,36; неохлорогеновая кислота и теофиллина– 1,92; теофиллина и хлорогеновая кислота – 7,99, хлорогеновая кислота и кофеин – 1,09; кофеин и криптохлорогеновая кислота– 1,37.

№	Вещество	tуд, мин	Rs
1	Теобромин	5,3	4,36
2	Неохлорогеновая кислота (5-ККК)	7,9	1,92
3	Теофиллин	9,3	7,99
4	Хлорогеновая кислота (3-ККК)	14,3	1,09
5	Кофеин	15,0	1,37
6	Криптохлорогеновая кислота (4-ККК)	16,1	

Таблица 3. Времена удерживания и степени разделения БАВ.

Линейность

Были определены такие параметры как диапазон линейных концентраций и коэффициент корреляции (таб. 4).

Соединение	Диапазон линейных концентраций, мг/мл	Параметры линейной регрессии	
		Уравнение сглаживающей прямой	Коэффициент корреляции
Теобромин	0,001 – 1,5	y = 22635x+610,2	0,9828
Теофиллин	0,001 – 1,5	y = 21318x+42,45	0,9998
Кофеин	0,001 – 1,5	y = 18761x+219,9	0,9978
Хлорогеновая кислота	0,001 – 1,5	y = 20218x+196,1	0,9993

Таблица 4. Параметры количественного определения БАВ.

В ходе определения линейности методики установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации от 0,001 мг/мл до 1,5 мг/мл, а коэффициент корреляции близок к единице (больше 0,982). Это свидетельствует о жесткой линейной зависимости значения площади пика от концентрации действующих веществ в растворе в данном диапазоне концентраций.

Правильность и прецизионность (воспроизводимость)

Для определения прецизионности и правильности методики проводили анализ 3 стандартных растворов теобромина, теофиллина, кофеина и хлорогеновой кислоты с концентрациями: 0,05 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,5 мг/мл. Проводили анализ каждого раствора в 3 повторностях. Для полученых значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной погрешности (ε,%). Результаты исследования представлены в табл. 5.

Введено (мг/мл)	Найдено (мг/мл)	Найдено (мг/мл), среднее значение (n=3)	RSD, % (n = 3)	ε, %
Кофеин				
0,05	0,049	0,047	0,002	7,813
	0,045			
	0,047			
0,5	0,469	0,470	0,005	2,003
	0,476			
	0,466			
1,5	1,461	1,469	0,012	1,449
	1,463			
	1,482			
теобромин				
0,05	0,052	0,052	0,001	2,052
	0,052			
	0,051			
0,5	0,493	0,491	0,002	0,571
	0,49			
	0,491			
1,5	1,479	1,481	0,013	1,626
	1,469			
	1,495			
теофиллин				
0,05	0,048	0,048	0,001	2,193
	0,048			
	0,049			
0,5	0,479	0,481	0,002	0,794
	0,483			
	0,482			
1,5	1,492	1,492	0,001	0,071
	1,493			
	1,492			
хлорогеновая кислота				
0,05	0,052	0,052	0,001	2,052
	0,052			
	0,051			
0,5	0,488	0,499	0,009	3,480
	0,502			
	0,506			
1,5	1,482	1,499	0,019	2,365
	1,495			
	1,52			

Таблица 5. Оценка правильности и прецизионности методики.

Как видно из таблицы, относительная ошибка определения не превышает 7,8%. В процессе работы был проведен подбор условий экстракции из растительного сырья (состав экстрагента, время). При выборе растворителя учитывали растворимость индивидуальных веществ, их совместимость с подвижной фазой. Были исследованы следующие варианты:
- смесь этанол-вода с концентрацией этанола 20%, 70%.
- водное извлечение (настой).

Исследуемый показатель, мг/г	Состав экстрагента		
	водный	20% спирт	70% спирт
Теобромин	0,9 ± 0,03	2,6 ±0,02	4,3 ± 0,02
Теофиллин	0	0	0,1 ± 0,01
Кофеин	14,3 ± 0,03	17,6 ± 0,03	38,5 ± 0,10
Неохлорогеновая кислота	22,2 ± 0,10	20,0 ± 0,03	25,5 ± 0,06
Криптохлорогеновая кислота	17,5± 0.07	15,8± 0,03	20,5± 0,10
Хлорогеновая кислота	28,6± 0,04	23,0± 0,03	45,4± 0,10
Сумма кислот	69,0± 0,10	66,5± 0,10	127,8± 0,05

Таблица 6. Влияние экстрагента на полноту экстракции БАВ.

Как видно из таб. 6 этиловый спирт 70% является более эффективным экстрагентом, в сравнении с 20% этиловым спиртом и водой. Проводились исследование влияния температурного режима на полноту экстракции.

В таблице 7 показано влияние температурного режима экстракции на выход биологически активных веществ (в мг/г) в полученных экстрактах. Анализ полноты экстракции оценивался порезультатам ВЭЖХ.

Исследуемый показатель, мг/г	Температурный режим	
	Заваривание кипящей водой	Кипячение на водяной бане
Теобромин	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,05
Теофиллин	0	0
Кофеин	5,9 ± 0,08	14,3 ± 0,05
Неохлорогеновая кислота	16,6 ± 0,06	22,2 ± 0,07
Криптохлорогеновая кислота	8,3 ± 0,03	17,5 ± 0,02
Хлорогеновая кислота	15,8 ± 0,1	28,6 ± 0,01
Сумма кислот	40,7 ± 0,04	69,0 ± 0,02

Таблица 7. Влияние температурного режима на полноту экстракции БАВ.

Содержание всех индивидуальных веществ при кипячении на водяной бане было более высоким, чем при заваривании. В таб. 8 представлены результаты количественного определения индикаторных веществ экстрагированных 70% этиловым эфиром при кипячении на водяной бане.

№ п/п	Наименование образца	Исследуемый показатель, мг/г					
		Теобромин	Теофиллин	Кофеин	Неохлорогеновая кислота	Хлорогеновая кислота	Криптохлорогеновая кислота
1	Мате «AndressitoDespalada»	0,52	0,04	16,84	87,92	61,53	48,88
2	Мате «Don Lucos»	4,15	0,45	47,36	30,64	28,12	20,93
3	Горький чай кудин - Ligustrumrobustum	0,00	0,00	0,57	1,86	1,53	6,14
4	Горький чай кудин- Ilexkudingcha	16,75	0,00	0,93	18,10	133,93	16,68
5	Зеленый чай Китайский «Сенча»	3,39	0,00	93,72	2,47	3,77	3,68
6	Черный чай Цейлонский «HanseTee»	4,98	0,00	59,65	3,11	5,84	4,45
7	Обжаренные зерна кофе «Альтура», Куба	0,00	0,00	50,66	34,62	83,38	42,53

Таблица 8. Количественное содержание БАВ в сырье.

Как видно из таблицы, что большее содержание теобромина в сырье горький чай кудин- Ilexkudingcha –16,75 мг/г, теофилина в сырье мате (Ilexparaguarien-sis) «DonLucos» - 0,45мг/г, кофеина в сырье китайского зеленого чая «Сенча» - 93,72 мг/г и хлорогеновой кислоты в сырье горького чая кудин (Ilexkudingcha) - 133,93 мг/г.

Заключение

1. Изучено семь объектов растительного происхождения. Подобраны оптимальные условия экстракции биологически активных веществ (извлечение 70% этиловым спиртом при кипячении на водяной бане).

2. Разработана методика определения метилксантинов (кофеин, теобромин, теофиллин) и хлорогеновой кислоты и ее изомеров в образцах растительного сырья падуба парагвайского, зеленом, черном и горьком чаях и зернах кофе методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

3. Методика характеризуется высокой специфичностью, чувствительностью, линейностью, правильностью и прецизионностью, быстротой выполнения.

4. Полученные результаты позволяют оценить качество исследуемого сырья с учетом содержания индикаторных компонентов. Показано, что количественное содержание индикаторных веществ в сырье различается. Было установлено наибольшее содержание теобромина в сырье горький чай кудин- Ilexkudingcha – 16,75 мг/г, теофилина в сырье мате (Ilexparaguariensis) «DonLucos» - 0,45мг/г, кофеина в сырье китайского зеленого чая «Сенча» - 93,72 мг/г и хлорогеновой кислоты в сырье горького чая кудин (Ilexkudingcha) - 133,93 мг/г.Данная методика может быть рекомендована для анализа сырья и препаратов падуба парагвайского.

Список литературы

1. Heck CI, De Mejia EG.
   Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations.
   Journal of food science. 2007. Vol. 72, Nr. 9, 138 –151.
2. Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J et al.
   Protective effects of mate tea (Ilex paraguariensis) on H_2O_2-induced DNA damage and DNA repair in mice.
   Mutagenesis 2008; 23:261–265.
3. Mosimann ALP, Wilhelm-Filho D, Silva EL.
   Aqueous extract of Ilex paraguariensis attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.
   BioFactors 2006; 23:1–12.
4. Pang J, Choi Y, Park T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue.
   Arch BiochemBiophys 2008; 476:178–185.
5. Pomilio, Trajtemberg, Vitale, 2002
6. BCB Boaventura, ANN Murakami, ES Prudêncio and etc.
   Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous axtract of mate (Ilex paraguariensis St.Hil.) through freeze concentration technology.
   Food Research international FRIN-04194, Noof Pages 7. 2012.
7. Actis-Goretta L, Mackenzie GG,
   Comparative study on the antioxidant capacity of wines and other plant-derived beverages.
   Ann NY AcadSci, 2002; 957:279-283.
8. Ю.ВМедведев, О.И. Передеряев, А.П. Арзамасцев, К.И. Эллер, В.И. Прокофьева. Определение гидроксикоречных кислот в лекарственном растительном сырье и объектах растительного происхождения. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. №3.С.25-31.
9. Farah A., Dodadgelo C.M.
   Phenolic compounds in coffee.
   Braz. J. Plant Physiol. 2006. V. 18(1). P. 23–26.
10. Cliffford M.N., Knight S., Surucu B., Kuhnert N.
    Characterization by LC-MS^n of Four New Classes of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans: Dimethoxycinnamoylquinic Acids, Diferuloylquinic Acids, Caffeoyldimethoxycinnamoylquinic Acids, and Feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic Acids.
    J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. P. 1957–1969
11. Cliffford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N.
    Hierarchical Scheme for LC-MS Identification of Chlorogenic Acids M.N.
    J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 2900–2911.
12. D. P. Rivelli, C. D. Ropke, V. V. Silva, D. V. Miranda, R. L. Almeida, T. C. H. Sawada, S. B. M. Barros
    Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of Ilex paraguariensis by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH reduction.
    Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007
13. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под редакцией В.В.Береговых – М.: Литтерра, 2008. – 132с.; 5 с. Цвет. вкл.: - (Обеспечение качества).
14. Руководство для предприятий фармацевтической промышленнсти/ методические рекомендации. Ь.: - Издательство «Спорт и Культура – 2000», 2007. 192 с

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
http://www.your-analytical-solution.com

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in USA, November 1, 2013
5991-3526RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies