

УДК 615.07:615.27:543.544

**АНАЛІЗ БІОХІМІЧНОГО СКЛАДУ
ФІТОІМУНОКОРЕКТОРУ «АФЛУФІТ»
МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ
ХРОМАТОГРАФІЇ
Немятих О.Д.**

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Багатовекторність та глибина наслідків, пов'язаних із зсувами імунного статусу у дитини, знаходить відповідне відображення в монотонному зростанні показників загальної захворюваності (11,4%) та розповсюдженості (13,2%) патологій у вітчизняній педіатрії протягом останніх п'яти років. В окресленій площині звертає на себе увагу центральна роль хвороб дихальної системи, що сьогодні складають понад 50% в структурі дитячої захворюваності. При цьому більша частка гострих респіраторних патологій реєструється у віці від 1 до 6 років, коли зростаючий організм переносить у середньому від 3 до 6 хвиль хвороби на рік. Вищенаведене визначає проблему фармакологічної корекції імунологічної реактивності організму дитини як одну з найбільш важливих та актуальних для сучасної медицини [1].

В світлі міркувань щодо розробки ефективних методів відновлення імунного дисбалансу в педіатричній практиці фітопрепарати мають істотні переваги перед синтетичними лікарськими засобами, оскільки при їх застосуванні значно рідше виникають алергічні реакції, токсичні ефекти і явища кумуляції [2].

Попередніми дослідженнями розроблено склад, технологію та підтверджено високу фармакологічну активність дитячого препарату «Афлуфит» у формі сиропу та желе на основі лікарського настою з коренів

Таблиця 1. Схема елюювання

Час, хв.	A% H ₂ O (0,1% H ₃ PO ₄ , 0,3% THF, 0.018% TEA)	B% MeOH
0.0	90	10
8.0	70	30
25.0	20	80
26.0	0	100
30.0	0	100
30.1	90	10
35.0	90	10

Примітки: 1. THF- тетрагідрофуран; 2. TEA- триетиламін; 3. MeOH-метанол.

Дослідження проводили в умовах дотримання параметрів детектування: масштаб вимірів 1,0; час сканування 0,5 с; параметри зняття спектра - 190-600 нм (для кожного піку); довжина хвилі 280, 313, 350, 371, 254 нм.

Для аналізу органічних кислот та цукрів була використана карбогідратна хроматографічна колонка «Supelcogel-C610H» розміром 7,8×300 мм (швидкість подачі рухомої фази 0,5 мл/хв; елюент водний 0,1% розчин H₃PO₄, робочий тиск елюенту 33-36 кПа; температура термостату колонки 30 °С; об'єм інжекції 5 мкл). Речовини визначали при чітких параметрах рефрактометричного (масштаб вимірів 0,5с) та діодноматрично-

ехінацеї пурпурової, плодів горобини звичайної та шишки собачої [3,4].

Метою роботи було запропонувати сучасні, зручні та високоточні методики якісного та кількісного визначення діючих та допоміжних речовин у складі розробленого препарату.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами. Робота виконана відповідно до основного плану НДР ДЗ «Луганський державний медичний університет» в межах тем «Розробка складу та технології лікарських засобів природного походження» (номер державної реєстрації 0112U000535), «Пошук нових біологічно активних речовин, лікарських рослин екосистеми Донбасу, синтетичних сполук, їх хімічне, фізико-хімічне, біологічне вивчення, розробка методів ідентифікації та кількісного визначення» (номер державної реєстрації 0107U004580).

Матеріали та методи дослідження. Аналіз проводили за допомогою системи рідинного хроматографа HP Series 1100 model (фірми Agilent Technologies, Inc., Каліфорнія, США), що укомплектований проточним вакуумним дегазатором, чотирьохканальним насосом градієнту низького тиску, автоматичним інжектором, термостатом колонок та діодноматричним детектором G1316A. Хроматографічне розділення фенольних сполук виконували з використанням колонки «ZORBAX-SB C-18» розміром 2,1×150 мм, що заповнена октадецилсілільним сорбентом з розміром частинок 3,5 мкм. Встановлювали наступний режим хроматографування: швидкість подачі рухомої фази 0,25 мл/хв; робочий тиск елюенту 240-300 кПа; температура термостата колонки 35 °С; об'єм інжекції 2 мкл; градієнтний режим елюювання (табл.1).

го детектування (масштаб вимірів 0,5с; довжина хвилі-210/8, порівняння-360/80 нм).

Ідентифікацію сполук проводили шляхом порівняння часу утримування основного піку та зовнішнього стандарту. В якості стандартів використовували розчини хлорогенової, дікофеїлхіної та численних похідних кавової кислот фірми Sigma-Aldrich.

Хроматографування розчинів стандартних речовин та випробуваних розчинів проводили не менше трьох разів до тих пір, поки не виконувались вимоги до придатності хроматографічної системи [1].

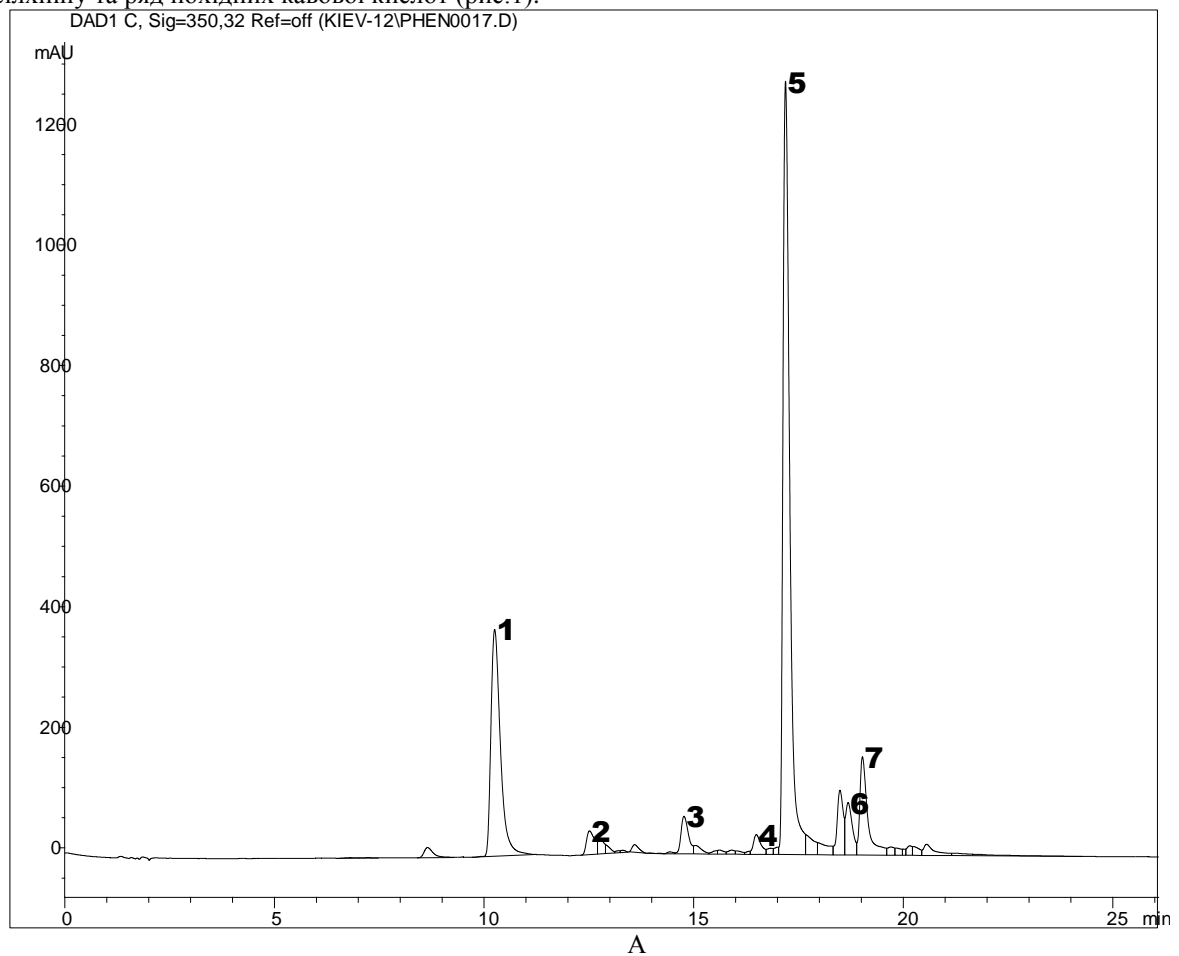
Для кількісного визначення фенольних сполук, органічних кислот і цукрів зважували в мірній пробірці на 12 мл точну наважку зразка желе та доводили до

риски водою (для визначення органічних кислот та цукрів) та 90% етанолом (для фенольних сполук). Сироп для аналізу вмісту органічних кислот і цукрів попередньо розводили водою в 10 разів. Після тридцятихвилинної витримки в ультразвуковій бані зразки настоювали при кімнатній температурі протягом 24 годин, потім знову поміщали в ультразвукову баню на 30 хвилин. Розчини фільтрували через мембранний тефлоновий фільтр із розмірами пор 0,45 мкм у віалу для аналізу. Управління хроматографічною системою, отримання хроматографій та обчислювання результатів проводилось за допомогою ПЗ Agilent software [5-8].

Результати та обговорення

Хроматографічний аналіз щодо визначення фенольних сполук в лікарському препараті дозволив виявити 7 речовин, серед яких ідентифіковано хлорогенову, 1,3-дікофеїлхіну та ряд похідних кавової кислот (рис.1).

Наведені в таблиці 2 дані свідчать, що за вивчаємих умов експерименту відбувається розділення біологічно активних сполук, що підтверджує можливість проведення кількісного визначення діючих речовин в лікарських формах. Варто підкреслити, що експериментально виявлена кількість та розрахована концентрація останніх в препараті «Афлуфіт» цілком корелюють з вмістом рослинного витягу у сиропі та желе. При застосуванні обраного методичного підходу допоміжні речовини не заважають визначенню діючих речовин та не впливають на кінцевий результат.



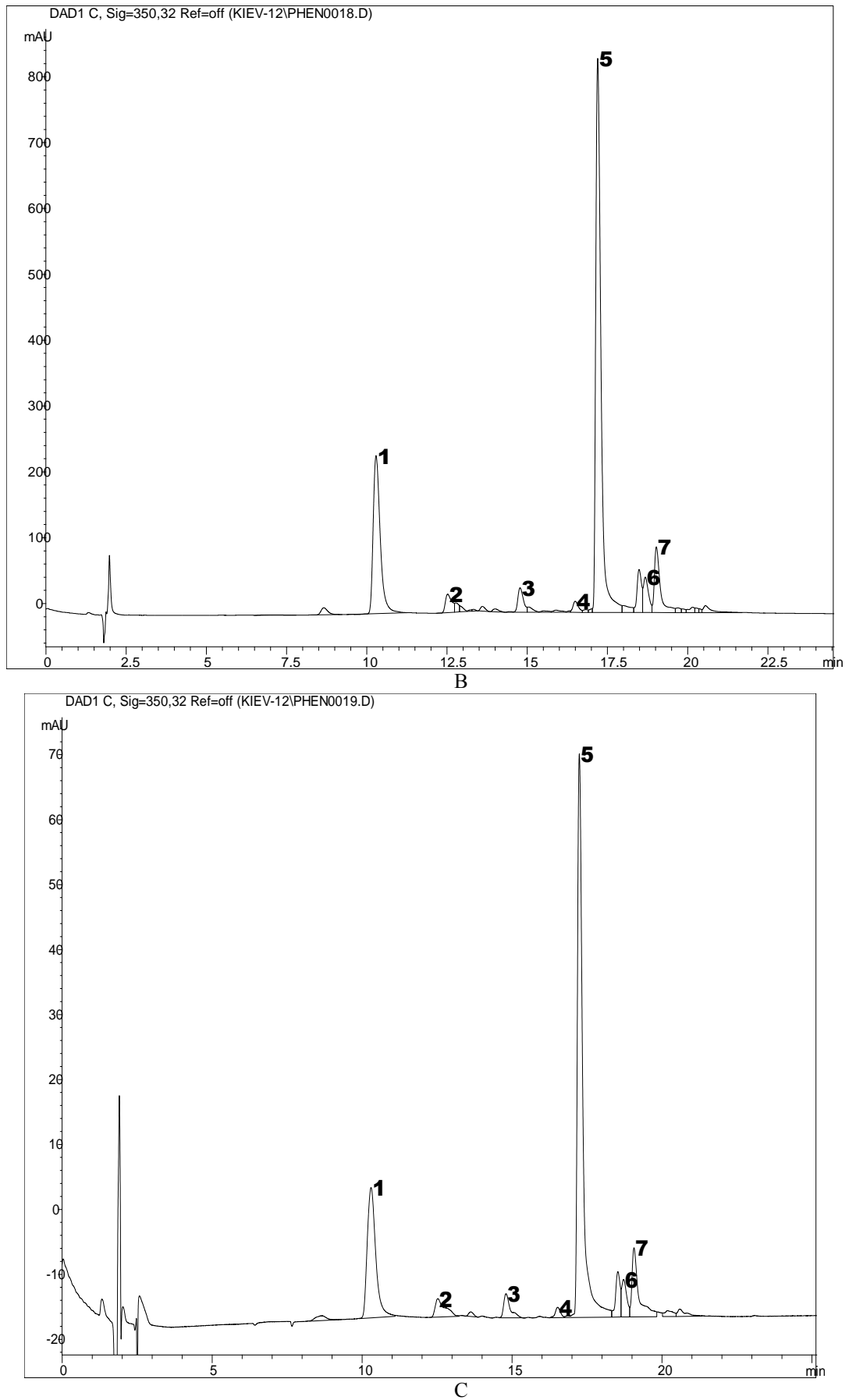


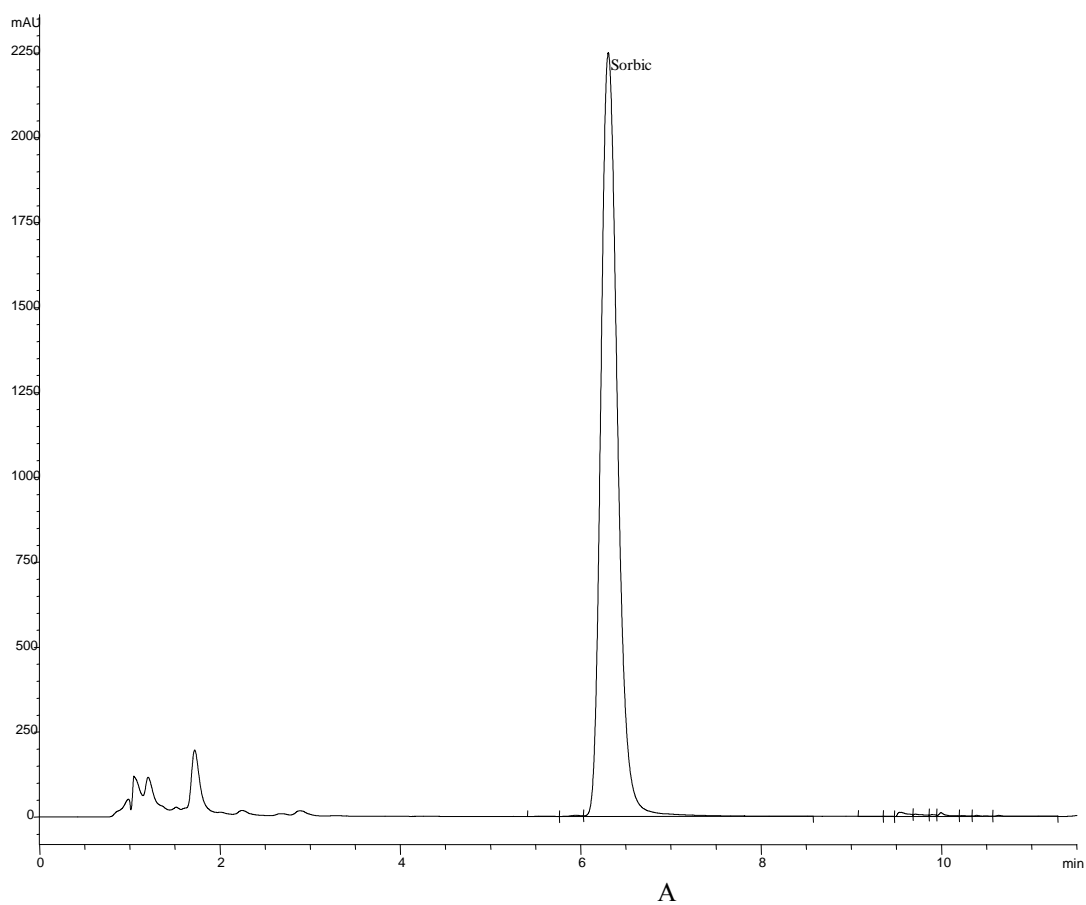
Рис. 1. Хроматограми визначення фенольних сполук в препараті «Афлуфіт» 1. А- рослинний витяг; 2. В- сироп; 3. С- желе.

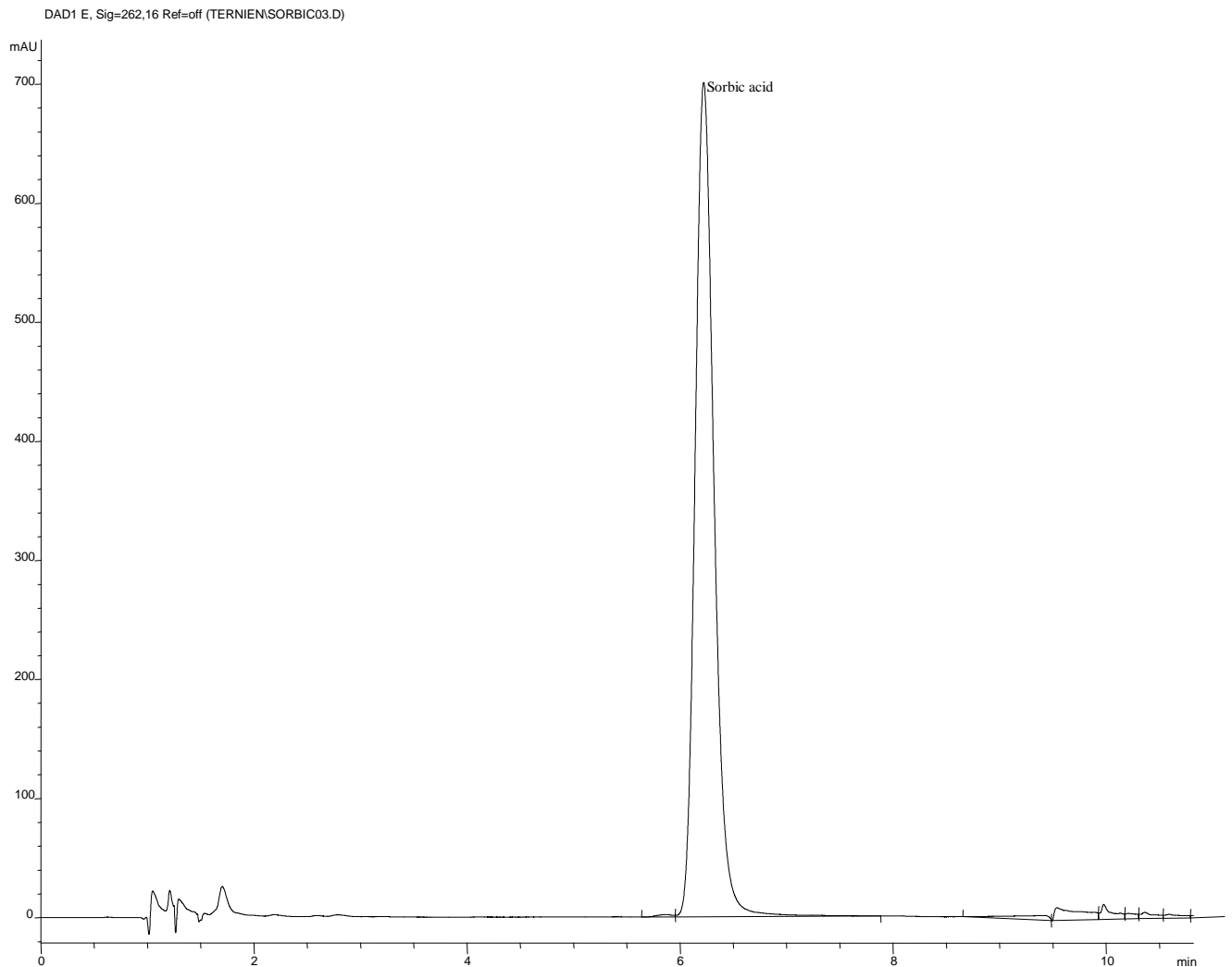
Таблиця 2. Ідентифіковані фенольні сполуки в препараті «Афлуфіт»

Час утримування, хв.	Речовина	Кількісний вміст		
		водний витяг, мг%	сироп, мг%	желе, мг%
10.25	Похідне кавової кислоти	24,6605±0,0003	11,8362±0,0002	4,0001±0,0002
12.52	Хлорогенова кислота	2,3887±0,0001	1,3313±0,0001	0,5003±0,0001
14.77	Похідне кавової кислоти	3,0825±0,0001	1,3772±0,0002	0,5001±0,0001
16.50	Похідне кавової кислоти	1,7544±0,0002	0,6733±0,0001	0,1001±0,0002
17.19	Похідне кавової кислоти	54,0490±0,0002	27,3298±0,0001	10,0040±0,006
18.68	1,3-Дікофеїлхінна кислота	3,8557±0,0002	1,8516±0,0001	0,7004±0,0006
19.03	Похідне кавової кислоти	8,30607±0,0001	3,4812±0,0002	1,2000±0,0008

Встановлено, що на хроматограмі випробуваних розчинів препарату час утримування піку калію сорбату співпадає з аналогічним параметром на хроматограмі розчину порівняння і складає 6,31 (рис. 2). При цьому вміст консерванту складає 0,1524 та 0,1473% у сиропі та желе, відповідно.

тограмі розчину порівняння і складає 6,31 (рис. 2). При цьому вміст консерванту складає 0,1524 та 0,1473% у сиропі та желе, відповідно.





В

Рис. 2. Хроматограми визначення калію сорбату в препараті «Афлуфіт»: 1. А- сироп; 2. В- желе

Дослідження в площині визначення органічних кислот та цукрів в лікарському препараті дозволило виявити 8 речовин, серед яких ідентифіковано малеїнову, лимонну, яблучну кислоти, а також сахарозу, мальтозу, глюкозу, фруктозу, арабінозу (табл. 3).

Таблиця 3. Ідентифіковані органічні кислоти та цукри в препараті «Афлуфіт»

Індекс утримування, хв.	Речовина	Кількісний вміст	
		сироп, %	желе, %
10.47	Кислота малеїнова	0,0009±0,0001	0,0005±0,0001
10.95	Кислота лимонна	0,2588±0,0001	0,4694±0,0003
13.01	Кислота яблучна	0,2430±0,0002	0,0498±0,0007
10.29	Сахароза-мальтоза	46,8713±0,001	50,1388±0,002
11.97	Глюкоза	5,6416±0,0002	5,6482±0,0008
13.18	Фруктоза	2,7827±0,0002	3,3792±0,0003
13.59	Арабіноза	0,0793±0,0004	0,5392±0,0001

Висновки:

1. Розроблено методики якісного та кількісного визначення компонентів у складі препарату «Афлуфіт» з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії.
2. Ідентифіковано та визначено вміст діючих (хлорогенова, 1,3-дікофеїлхіна, похідні кавової кислоти) та допоміжних (сорбінова, малеїнова, лимонна, яблучна

кислоти, сахароза, мальтоза, глюкоза, фруктоза, арабіноза) речовин.

3. Отримані дані є підставою для подальших досліджень щодо розробки та впровадження у фармацевтичне виробництво лікарського препарату.

References

1. State Pharmacopoeia of Ukraine / State enterprise "Scientifically-expert pharmacopoeia center". - 1th ed. - Kharkiv. : PIPEP, 2001. - 556 p.
2. Dmitrievskiy D.I. The invention of drugs for pediatrics: reality and prospects [Text] / D.I. Dmitrievskiy, O.D. Nemyatykh // Pharmaceutical courier. - 2010. - № 3. - С. 58-64
3. Patent 53209 Ukraine, МПК А61 К 36/00 Medical and preventive means on the basis of Echinacea in form jelly / Dmitrievskiy D.I., Nemyatykh O.D.; declarant and patentee Dmitrievskiy D.I., Nemyatykh O.D.; decl. 16.04.2010; publ. 27.09.2010, Bull. № 18
4. Patent 92445 Ukraine, МПК А61К 36/28, А61К 31/194, А61К 36/738, А61К 36/73, А61Р 37/02. The means for the correction of immune status of children "Aflufit" / Gudzenko A.P, Nemyatykh O.D., Yakovleva L.V., Kotov A.G, Bondar S.I; declarant and patentee Gudzenko A.P, Nemyatykh O.D., Yakovleva L.V., Kotov A.G, Bondar S.I; decl. 16.04.2010, publ. 25.10.2010, Bull. №20.
5. Chen L. Structural aspects of antho-cyanin-flavonoid complex formation in plant color [Text] / L. Chen, G. Hrazdina // Phytochemistry. - 1981, Vol.20. – P. 297-303.
6. Court W. A. Reverse phase of naturally occurring phenolic compounds [Text] / W. A. Court // J. Chromatography. – 1977, Vol.130. – P. 287-291.
7. Mabry T. J. The Systematic identification of flavonoids: [monograph] / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas // New York: Springer-Verlag. – 1970. – 437 p.
8. Murrough Mc. I. Quantitative analysis of hop flavonols using [Text] / Mc. I. Murrough, G. P. Hennigan, M. J. Loughrey // H.P.L.C. J. Agric. Food Chem. – 1982, Vol.30. – P. 1102-1106.

УДК 615.07:615.27:543.544

АНАЛІЗ БІОХІМІЧНОГО СКЛАДУ ФІТОІМУНОКОРЕКТОРУ «АФЛУФІТ» МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Немятих О.Д.

Проведені дослідження з розробки методик якісного та кількісного визначення діючих та допоміжних речовин у складі препарату «Афлуфіт» у формі дитячого сиропу та желе з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії. Ідентифіковано та визначено вміст діючих (хлорогенова, 1,3-дікофеїлхіна, похідні кавової кислоти) та допоміжних (сорбінова, малеїнова, лимонна, яблучна кислоти, сахароза, мальтоза, глюкоза, фруктоза, арабіноза) речовин. Розроблені методики характеризуються достатньою простотою, високою селективністю і можуть бути використані для контролю якості лікарського засобу.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, аналіз, «Афлуфіт»

УДК 615.07:615.27:543.544

АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ФИТОИМУНОКОРЕКТОРА «АФЛУФИТ» МЕТОДОМ ВИСОКОЭФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Немятых О.Д.

Проведены исследования по разработке методик качественного и количественного определения действующих и вспомогательных веществ в составе препарата «Афлуфит» в форме детского сиропа и желе с использованием метода високоефективной жидкостной хроматографии. Идентифицировано та определено содержание действующих (хлорогеновая, 1,3-дикофеилхинная, производные кофейной кислоты) и вспомогательных (сорбиновая, малеиновая, лимонная, яблочная кислоты, сахароза, мальтоза, глюкоза, фруктоза, арабиноза) веществ. Разработанные методики характеризуются достаточной простотой, высокой селективностью и могут быть использованы для контроля качества лекарственного средства.

Ключевые слова: високоефективная жидкостная хроматография, анализ, «Афлуфит»

UDC 615.07:615.27:543.544

ANALYSIS OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF FITOIMMUNOKORREKTOR "AFLUFIT" BY METHOD OF HIGH-EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nemyatykh O.D.

The research on development of methodologies of qualitative and quantitative determination of active and auxiliary substances in composition of preparation "Aflufit" in form child's syrup and jelly by method of high-efficiency liquid chromatography have been conducted. Identification and quantitative maintenance of active (chlorogenic, 1,3-dicofeilchic, derivatives of coffee acid) and auxiliary (sorbic, maleinic, lemon, apple acids, saccharose, maltose, glucose, fructose, arabinose) substances have been certained. Worked out methodologies is simple, highly selective and can be used for control of quality of medicine.

Key words: high performance liquid chromatography, analysis, "Aflufit"