



Определение капсаициноидов и ионола в перцовых пластырях методом микроколоночной ВЭЖХ

Рудаков О.Б., Хорохордина Е.А., Фан Винь Тхинь

Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Подолова Е.А.

Электростальский политехнический институт (филиал МИСиС)

Рудакова Л.В.

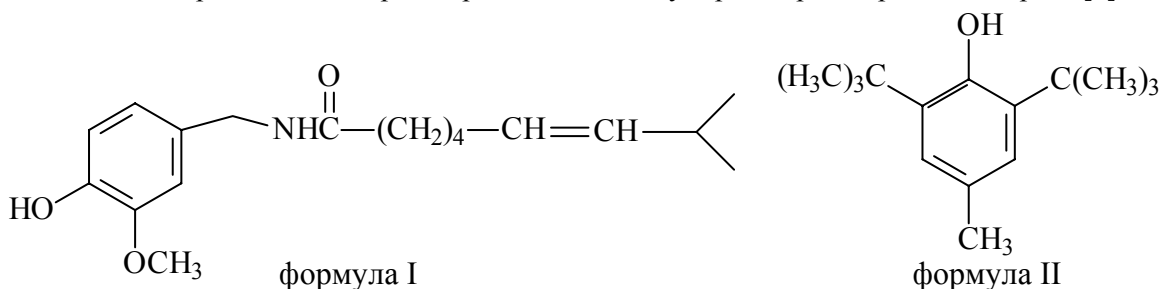
Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

Аннотация

Изучена жидкостная экстракция капсаициноидов и ионола из водно-солевых растворов сульфата аммония изопропиловым спиртом. Оптимизированы условия экстракции этих аналитов из перцового пластыря. Предложена методика микроколоночной ВЭЖХ определения капсаициноидов и ионола в экстрактах

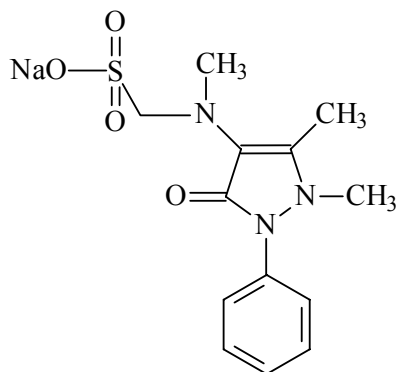
Введение

В состав перцовых пластырей с обезболивающим действием в качестве основных активных компонентов входят капсаициноиды, каротиноиды и анальгин. Для стабилизации каучуковой основы пластырей в него добавляют антиоксидантную присадку – ионол [1,2]. Капсаицин и ионол (формулы I и II) являются гидрофобными *орто*-замещенными производными фенола (критерий гидрофобности капсаицина $lgP = 3,66$ и ионола $lgP = 5,54$). Эти вещества практически не растворимы в воде, но умеренно растворимы в спиртах [3].



Содержание анальгина в пластыре в 40 раз превышает суммарное количество капсаициноидов. Методики ВЭЖХ контроля капсаициноидов разработанные и аттестованные для его анализа в пластыре [1,2], не содержащем анальгин оказались мало пригодны для новой лекарственной формы с его добавкой, так как широкий хроматографический пик анальгина уменьшает надежность определения капсаициноидов. В связи с этим актуальной является задача модификации пробоподготовки с разделением этих компонентов.

Анальгин (формула III) является полярным гетероциклическим соединением, он хорошо растворим в воде и слабо растворим в спиртах [3].



формула III

Цель данного исследования – разработка нового способа пробоподготовки анализируемой пробы из перцового пластыря и подбор условий определения капсаициноидов и ионола методом микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Эксперимент

В работе применяли ионол, изопропанол, ацетонитрил, сульфат аммония квалификации «х.ч.», водный раствор аммиака (масс. доля 25 %), серная кислота ($\rho=1,84$ г/см³), государственный стандартный образец капсаицина (ВФС 42-1753-87), выделенного из красного стручкового перца (*Сарсисит апиум L*) содержащий капсаицин и основную примесь – дигидрокапсаицин, а также микропримеси: нордигидрокапсаицин, гомокапсаицин, гомодигидрокапсаицин (хроматограмма на рис. 1).

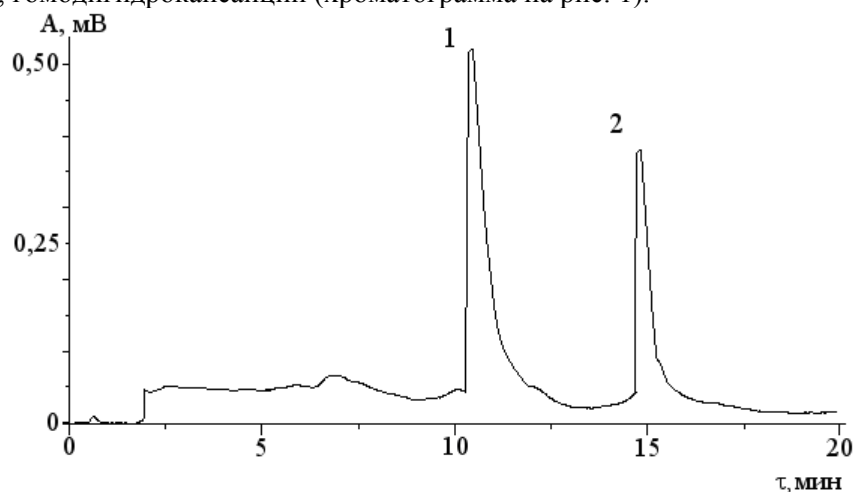


Рис. 1. Хроматограмма раствора стандартного образца капсаицина (ВФС 42-1753-87). Условия анализа приведены в тексте

Методика установления коэффициентов распределения аналитов в системе водно-солевой раствор – органический растворитель: взвешивают на аналитических весах пробу аналита $\sim 0,0050$ г с погрешностью $\pm 0,0002$ г и растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 . После растворения отбирают 100 см^3 водного раствора аналита и помещают в делительную воронку, подкисляют серной кислотой до pH 2-3, добавляют ~ 63 г сульфата аммония, 10 см^3 изопропанола и встряхивают на вибросмесителе в течение 15 мин. После расслаивания фаз (2-3 мин) из органической фазы шприцем отбирают $0,5 \text{ см}^3$ экстракта в контейнер для пробы и выполняют анализ на жидкостном хроматографе «Милихром 5».

Содержание воды в изопропанольной фазе находят по методике [4]. Полученные экстракты перцового пластыря фильтруют через фильтр типа «Миллипор» с размером пор 0,2-0,4 мкм; хроматографирование проводят на приборе «Милихром-5» с УФ- детектором в соответствии с блок-схемой анализа (рис.1).

Обсуждение результатов

В известной методике анализа капсаициноидов в пластыре для пробоподготовки точную навеску пластыря произвольно разрезают на полоски, освобождают полоски от защитного покрытия, помещают в круглодонную колбу, заливают из водным раствором этанола 54% и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. После охлаждения вытяжку количественно переносят в мерную колбу, извлечение капсаициноидов повторяют ещё раз. Полученный водно-этанольный раствора после фильтрации используют для анализа методом ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы применяют этанольный 54% раствор, в качестве неподвижной фазы – Сепарон С18 или аналогичный сорбент. Недостатками методики являются высокая растворимость анальгина в водно-спиртовом экстрагенте, в результате чего его присутствие на хроматограмме затрудняет определение капсаициноидов, высокая вязкость близкой к эквиобъемному составу подвижной фазы этанол-вода приводит к уменьшению надежности работы микроколоночного хроматографа и дополнительному уширению хроматографических пиков.

Нами в качестве экстрагентов испытаны системы ацетонитрил, изопропанол, ацетон, этанол и их смеси с водой и высаливатели. Найдено, что извлекаемые вещества - капсаициноиды и ионол практически полностью экстрагируются изопропанолом (ИПС) при однократной экстракции (степени извлечения 95 и 98 % соответственно), а анальгин не переходит в органическую фазу (степень извлечения ~ 0 %), то есть происходит разделение этих компонентов на стадии экстракции. Экстракт на основе ИПС в присутствии сульфата аммония содержит небольшое (~ 2 об. %) количество воды, которая незначительно разбавляет ИПС, но повышает его экстракционную способность[5].

Ниже приведена усовершенствованная методика контроля капсаициноидов и ионола с учетом требований разрабатываемой вновь фармакопейной статьи на новую лекарственную форму перцового пластыря с обезболивающим эффектом (рис.2).

Пробоподготовка. Отрезают полоску анализируемого пластыря размером 5×5 см, взвешивают на аналитических весах ($\sim 1,0 - 1,5$ г) с точностью $\pm 0,0002$ г и отделяют защитный слой бумаги, взвешивают его и вычитают из первоначальной массы. Навеску пластыря помещают в коническую колбу с притертой пробкой (предварительно можно порезать перцовый пластырь на более мелкие полоски 1×1 см), добавляют $\sim 20 \text{ см}^3$ раствора аммиака в изопропиловом спирте с $(\text{NH}_3) \approx 7$ моль/дм³ и встряхивают 15 мин на вибросмесителе.

Приготовление изопропанольного раствора NH_3 : мерной пробиркой отбирают $\sim 24 \text{ см}^3$ 25 % водного раствора аммиака помещают в мерный цилиндр, вместимостью 100 см^3 и доводят объем раствора изопропанолом до метки.

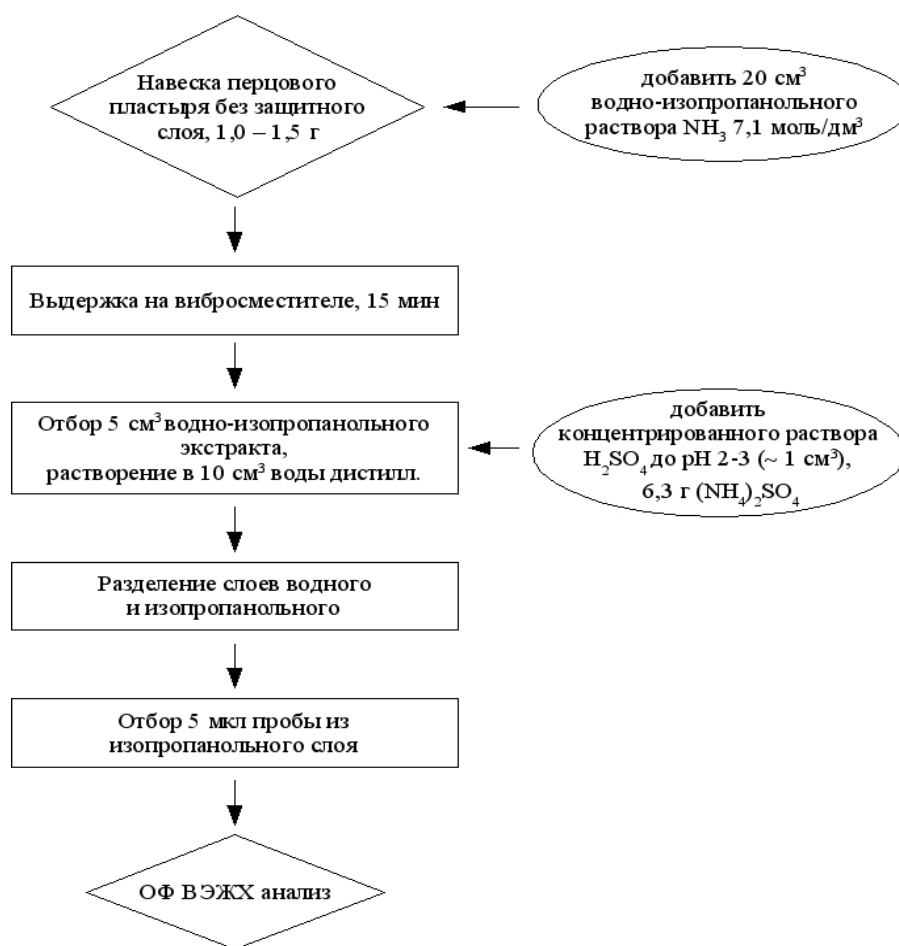


Рис.2. Блок-схема усовершенствованной методики контроля капсаициноидов и ионола

В делительную воронку отбирают пипеткой 5 см³ изопропанольного экстракта перцового пластыря, растворяют в 10 см³ дистиллированной воды и подкисляют серной кислотой до pH~2-3 (~0,8 см³ H₂SO₄ (ρ=1,84 г/см³)). Добавляют ~ 6,3 г сульфата аммония, перемешивают полученный раствор до полного растворения соли и встряхивают на вибросмесителе 15 мин. После расслаивания фаз (~2-3 мин) полученный органический слой отделяют, разбавляют в элюенте (ацетонитрил-вода) в соотношении 1:1 и хроматографируют на жидкостном хроматографе «Милихром 5».

Ход анализа. Условия ВЭЖХ анализа капсаициноидов и ионола не идентичны. Для определения ионола применяют элюент ацетонитрил-вода (в объемном соотношении 4:1), расход элюента 120 мкл/мин, параметры колонки: сорбент Диасорб 130 C₁₆T, размер частиц 7 мкм; размер колонки 2×80 мм, аналитическая длина волны 274 нм; объем анализируемой пробы 5 мкл, время удерживания ионола – 6,0 мин. Для определения капсаициноидов изменяют состав и расход элюента: элюент ацетонитрил:вода (в объемном соотношении 1:1), расход - 70 мкл/мин, параметры колонки те же. Время удерживания 2 основных капсаициноидов 10 или 15 мин.

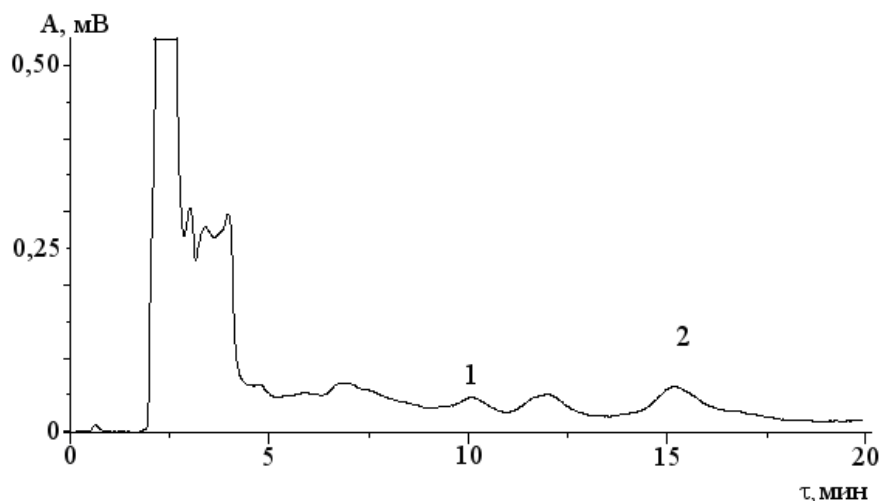


Рис. 3. Хроматограмма экстракта из перцового пластыря с применением изократического режима ОФ ВЭЖХ, ацетонитрил-вода (1:1), расход 70 мкл/мин: 1,2 - пики капсаициноидов

Расчет: содержание суммы капсаициноидов экстракте рассчитывали по линейной градуировочной зависимости суммы площадей пиков капсаициноидов от концентрации без свободного члена:

$$S = k \cdot c \quad (1)$$

где S – сумма площадей хроматографических пиков 1 и 2 (хроматограмма на рис.2); c – суммарная концентрация извлекаемых соединений, мг/дм³; k – эмпирический коэффициент.

Исходная суммарная концентрация капсаициноидов указана в сертификате к стандартному образцу экстракта перца. Выбор диапазона градуировки (0,02-0,2% капсаициноидов) был обусловлен необходимостью оптимального содержания активной лечебной формы в перцовом пластыре (не менее 0,06%). Во время стадии пробоподготовки в изопропанольный экстракт извлекаются капсаициноиды и ионол, а анальгин остается в водно-солевой фазе.

Содержание капсаициноидов в пробе исследуемого перцового пластыря рассчитывают по формуле:

$$\omega = \frac{S \cdot V}{m \cdot k \cdot R \cdot r \cdot 10^2} \quad (2)$$

где S – сумма площадей хроматографических пиков, мВ·мин; V – объем изопропанольного раствора аммиака, см³; k – эмпирический коэффициент из уравнения (1); R – степень извлечения капсаициноидов, %; r – соотношение водно-солевой и органической фаз; m – навеска исследуемого перцового пластыря, г; ω – массовая доля капсаициноидов, %.

Аналогично определяют калибровочный коэффициент для ионола по уравнению (1), где S – площадь хроматографического пика ионола, мВ·мин (хроматограмма на рис. 4).

Достоверность полученных результатов данной методикой проверяли методом «введено-найдено» (табл.1). Полученные результаты надежны ($t_{расч} < t_{табл}$) и воспроизводимы; систематическая погрешность среднего результата незначима, поэтому можно считать, что доверительная граница суммарной погрешности равна доверительной границе случайной погрешности.

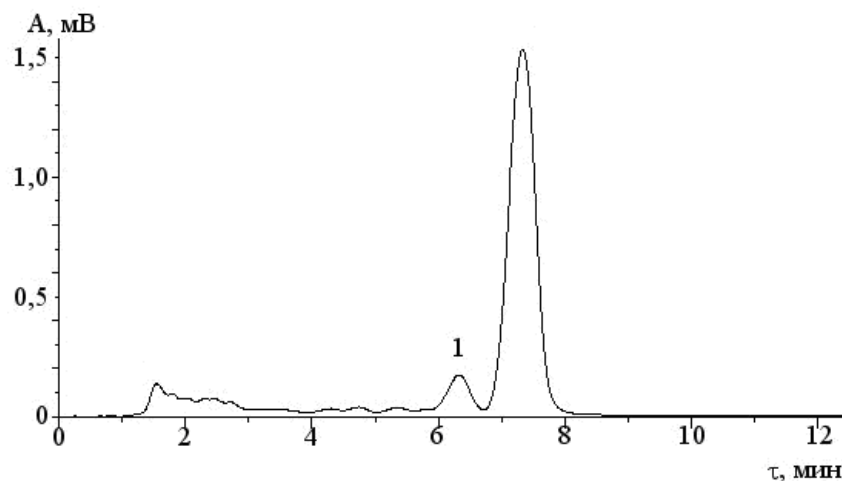


Рис. 4. Хроматограмма экстракта из перцового пластыря с применением изократического режима ОФ ВЭЖХ (элюент - смесь ацетонитрил-вода 4:1 в объёмном соотношения): 1- пик ионола

Таблица 1. Результаты определения ионола, капсаициноидов и анальгина экстракционно-хроматографическим способом ; $n=5$, $P=0,95$, $F_{\text{табл}}=6,4$, $F_{\text{эсп}}=5,2$

Введено, мг/дм ³			Найдено, мг/дм ³				
ионол	капсаициноиды	анальгин	ионол	S_r	капсаициноиды	S_r	анальгин
4,0	1,0	2,0	3,9±0,1	0,099	0,9±0,1	0,099	не обнаружено
0,40	0,1	0,2	0,40±0,02	0,019	0,09±0,01	0,0099	не обнаружено
0,04	0,01	0,02	0,04±0,001	0,001	0,01±0,002	0,0019	не обнаружено

Хроматографическое определение капсаициноидов и ионола с экстракционным разделением анализов характеризуется селективностью, низкими пределами обнаружения, правильностью и воспроизводимостью получаемых результатов. Продолжительность анализа вместе с пробоподготовкой ~ 60 мин.

Таблица 2. Результаты испытания способа определения капсаициноидов и ионола при анализе различных образцов пластырей ; $n=5$, $P=0,95$.

анализируемый пластырь	Найдено, мг/дм ³	
	капсаициноиды	ионол
«новый пластырь»	0,11±0,02	0,36±0,02
«использованный пластырь по способу применения»	не обнаружено	0,14±0,01
«пластырь с просроченным сроком действия»	0,10±0,03	0,36±0,03

Определение капсаициноидов и ионола проводили с пробами: «новый пластырь», «использованный по способу применения» и «пластырь с просроченным сроком» (табл.2). Результаты анализов различных пластырей подтверждают, что основным лечебным свойством обладают капсаициноиды и при использовании пластыря «по способу применения» капсаициноиды практически полностью расходуется [6] и поэтому в таких пробах они не обнаружены. Ионол лишь частично расходуется, так как каучуковая основа пластыря нарушается при его применении. Нами также проанализированы пробы

«пластыря с просроченным сроком», в результате анализа нами не обнаружено изменений концентраций ионола и капсаицина в составе пластырей.

Рассмотренная методика контроля капсаициноидов в перцовом пластыре с обезболивающим эффектом успешно апробирована в ОАО «Верофарм», г.Воронеж и может быть рекомендована для валидации и включения в измененную фармстатью.

Список литературы

1. ТУ 9393-021-45961725-2006. Перцовый пластырь «Доктор перец».
2. Патент РФ № 2133115, Перцовый пластырь. 1999.
3. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Часть III. НПО Профессионал. – СПб. – 2002. – 692 с.
4. Мичелл Дж., Смит Д. Акваметрия. – М.: Химия, 1980. – 600 с.
5. Коренман Я.И., Ермолаева Т.Н., Подолина Е.А.// Журн. аналит. химии. – 1996. – Т.51, №5. – С.486-492.
6. Спиридонов В.К., Воробьева Н.Ф., Толочко З.С., Костина Н.Е., Хощенко О.М. //Бюллетень СО РАМН. – 2004, №2(112). – С.135-140.