

m_1 – масса навески лекарственного средства в граммах;
 m_0 – масса навески РСО цЦМФ.

2. Содержание прочих примесей
 рассчитывается по формуле:

$$\omega_{\text{прим}} = \frac{S_{\text{прим}} \cdot 100\%}{S_{\text{общ}}} \quad (2)$$

где: $S_{\text{прим}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков примесей на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

$S_{\text{общ}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора.

ВЫВОДЫ

Разработана методика ВЭЖХ определения цЦМФ и примесей, позволяющая надежно разделить действующее вещество и примеси в течение 7 минут. Методика может быть использована в контроле качества субстанций и лекарственных средств на основе цЦМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трухачева Т.В., Кевра М.К., Новикова И.В и др. Противовирусная активность циклоцитидинмонофосфата *in vitro*// Тезисы докладов X Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - Москва, 2003.

2. Трухачева Т.В., Залашко Л.М., Панкратов В.Г. и др. Эффективность мази нуклеавир в лечении заболеваний, вызванных вирусом герпеса// Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - Москва, 2004.

3. Моисеев Д.В., Марченко С.И., Моисеева А.М. Влияние природы растворителя и значения рН на подвижность производных пиримидина и пурина в ТСХ// Материалы 57-й итоговой научной конференции студентов и молодых ученых ВГМУ. – Витебск, 2005. - С. 194-195.

4. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе// Химико-фармацев-

тический журнал. – 2004. – Т. 38, №4. – С. 40-56.

5. Эпштейн Н.А. Оценка максимально допустимых значений относительного стандартного отклонения площадей (высот) пиков при количественном анализе субстанций методом ВЭЖХ// Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – т. 37, №11. – С. 45-46.

6. British Pharmacopeia, London (2001).

7. The United States Pharmacopeia, (The USP 24th Ed.), Easton, Rand Mc Nally: Tounton, MA, 2000.

SUMMARY

T.V.Trukhacheva, D.V.Moiseev, L.M.Zalashko, A.I.Zhebentayev, P.T.Petrov HPLC DETERMINATION OF CCMP AND OTHER DERIVATIVES OF CYTIDINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS
 Fast and simple procedure for the determination of the cCMP in pharmaceutical preparations by HPLC is described. A reversed-phase column (Zorbax SB C-8, 250x4,6 mm, 5 mcm) with isocratic elution by 0,01 M potassium phosphate buffer (pH=3,0) is used to separate cCMP. The calibration graph for cCMP was linear from 20-400 mcg/ml (RSD <1%); graph for impurities was linear from 2-40 mcg/ml (RSD <5%).

Д.В.Моисеев, А.И.Жебентяев,
 П.Т.Петров¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПУРИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ В ЧАЕ, КОФЕ И КАКАО МЕТОДОМ ВЭЖХ

Витебский государственный
 медицинский университет

¹ Научно-фармацевтический центр РУП
 «Белмедпрепараты»

Разработана простая и экспрессная методика определения теобромина, теофиллина и кофеина в чае, кофе и какао методом ВЭЖХ. Определение алкалоидов проводится на обращенно-фазовой

колонке (Zorbax SB C-18, 250x4,6 мм, 5 мкм) с изократическим режимом элюирования ПФ (вода и ацетонитрил 90:10 по объему). Градуировочный график для данных веществ линеен в пределах 1-200 мкг/мл (RSD% <3%).

Алкалоиды, производные пурина (теобромин, теofilлин и кофеин), широко применяются в медицине как психомоторные стимуляторы (кофеин) и спазмолитические средства (теобромин, теofilлин), содержатся в растительном сырье (листья чая, семена кофе, бобы какао), применяются для приготовления напитков.

Для количественного определения пуриновых алкалоидов в растительном сырье применяется как обращено-фазовый [2,3,5-9], так и нормально-фазовый вариант ВЭЖХ [9]. Описанные в литературе методики количественного определения кофеина и других пуриновых алкалоидов имеют определенные недостатки: Belliarо и др. [2] проводят хроматографическое определение на колонке LiChrocart C-18 (250x4,0 мм, 7 мкм) и вводят в подвижную фазу (ПФ) ион-парный реагент (ИПР) (тетраметиламмония бромид). Однако использование ИПР приводит к быстрой порче хроматографической колонки из-за необратимой сорбции ИПР на поверхности сорбента и, как следствие, к снижению эффективности разделения. В методиках [5,7-9] в качестве компонента ПФ используются буферные растворы. На наш взгляд использование буферных растворов со значениями pH в области 2,0...8,0 при разделении веществ с константами ионизации лежащими вне данной области pH нецелесообразно и будет приводить к дополнительной нагрузке на колонку: увеличению времени ее промывания. Использование буферных растворов в присутствии органического модификатора также может приводить к «высаливанию» неорганических солей на колонке. Поэтому для разделения данных веществ в качестве ПФ для обращено-фазового варианта ВЭЖХ достаточно применение смеси воды и органического модификатора необходимой элюирующей силы [1,3,6].

Целью настоящего исследования была разработка методики количественного определения пуриновых алкалоидов (теобромина, теofilлина и кофеина) методом обращено-фазовой ВЭЖХ, позволяющей определять данные вещества в сырье растительного происхождения в условиях изократического элюирования без применения ион-парных реагентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводилась с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Разделение проводилось на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-18 250x4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: вода и ацетонитрил 90:10 (по объему), скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем пробы 10 мкл. Рабочая длина волны 272 нм выбрана на основании анализа спектров поглощения в области максимумов пиков определяемых веществ с помощью фотодиодного детектора Diode-array detector Agilent HP 1100 G1315B и программы Agilent ChemStation for LC 3D. Разделение проводилось при температуре колонки 30°C, давлении в системе около 100 bar. В качестве стандартов использовали образцы теобромина, теofilлина и кофеина фармакопейной чистоты (ГФ X). Вещества считали идентифицированными при совпадении времен удерживания и спектров поглощения со стандартами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальных условий элюирования данных веществ осуществлялся на основании проведенных ранее исследований по закономерностям сорбции произ-

водных метилксантина в ОФ ВЭЖХ при варьировании состава подвижной фазы [1].

Рассчитанные значения относительных стандартных отклонений (RSD%) для пиков основных веществ – не превышают 3% (при концентрации веществ 1-200

мкг/мл. Значения коэффициентов разделения (α) и разрешения (R_s) для двух соседних пиков указывают на хорошее разделение пиков соответствующих веществ (Таблица 1).

Таблица 1

Хроматографические параметры разделяемых веществ

		Время удерживания (t_R)	Эффективность разделения (N)	Коэффициент асимметрии пика (A_s)	Селективность разделения (α)	Коэффициент разрешения пиков (R_s)
1.	Теобромин	4,56	~ 11000	0,69		
2.	Теофиллин	6,46	~ 13000	0,68	6,3 (1 и 2)	9,2 (1 и 2)
3.	Кофеин	12,22	~ 12000	0,58	12,0 (2 и 3)	16,6 (2 и 3)

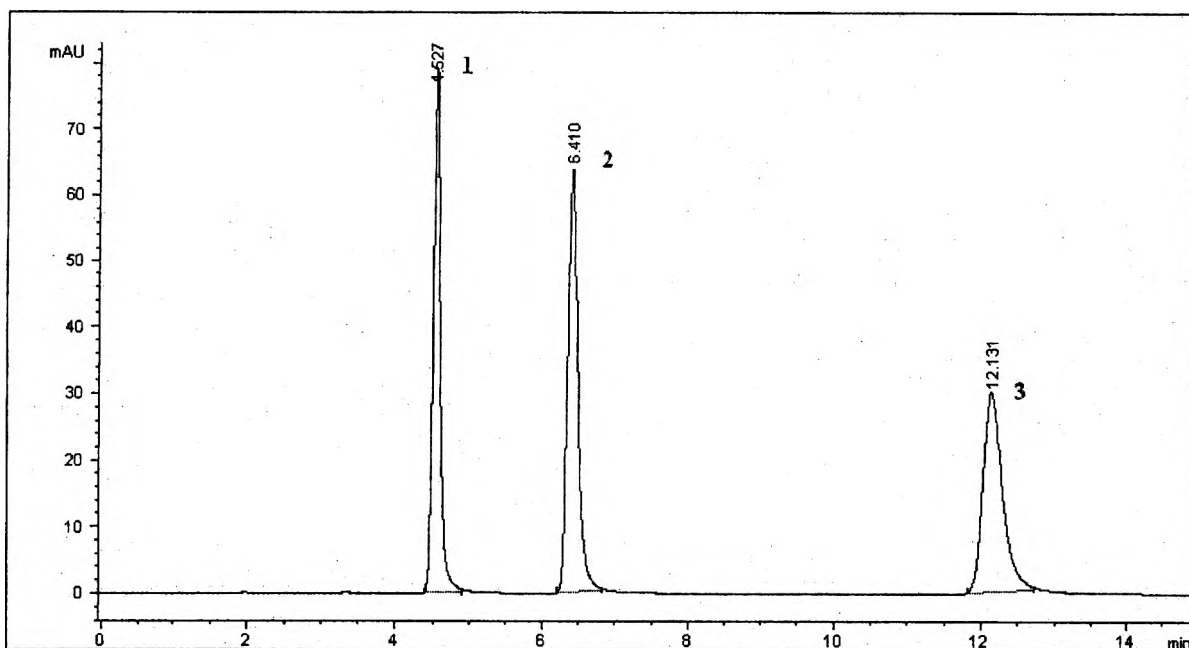


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси теобромина (1), теофиллина (2) и кофеина (3).

Пробоподготовка. В литературе описаны методики подготовки проб, содержащих данные вещества, для высокоэффективной жидкостной хроматографии методами жидкостной или твердофазовой экстракции [7]. В жидкостной экстракции используются: вода (с нейтральным значением pH [4-6], подкисленная хлороводородной кислотой [2]), этиловый спирт [8]

или экстракция из водного слоя хлороформом [3,9].

При разработке методики подготовки пробы для хроматографирования мы сравнивали различные доступные экстрагенты: 0,1 М хлороводородная кислота, дистиллированная вода, дистиллированная вода с добавлением оксида магния и 40% раствор этилового спирта. Проведение

экстракции из водной среды в хлороформ связана с применением высокотоксичного реагента – хлороформа, а также достаточно продолжительна по времени. В результате происходит лишь дополнительная доочистка пробы от балластных веществ. Извлечение алкалоидов водными растворами дает удовлетворительную очистку от примесей, поэтому в дальнейших исследованиях мы отказались от использования хлороформа. При использовании дистиллированной воды, 0,1 М хлороводородной кислоты и 40% раствора этилового спирта при нагревании экстрагируется примерно одинаковое количество кофеина из проб, при использовании дистиллированной воды с добавлением оксида магния улучшается очистка пробы от балластных веществ, однако содержание кофеина в экстрактах снижается примерно на 12%, теобромина на 23%. Остальные экстрагенты позволяют одинаково очищать пробу от балластных веществ и в равной степени экстрагируют кофеин из сырья. При изучении влияния продолжительности времени нагревания на экстракцию кофеина и

теобромина из сырья нами установлено, что оптимальное время экстракции составляет 30-40 минут. Дальнейшее нагревание приводит к незначительному увеличению содержания кофеина и теобромина в экстракте (менее чем на 0,5% при дополнительном нагревании в течение 30 минут).

Методика. Около 1 г кофе или чая (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 250,0 мл, прибавляют 150,0 мл очищенной воды и выдерживают на водяной бане при температуре $85 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 30 минут, периодически встряхивая. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) в мерную колбу вместимостью 200,0 мл, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки водой очищенной. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. Полученные растворы хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора.

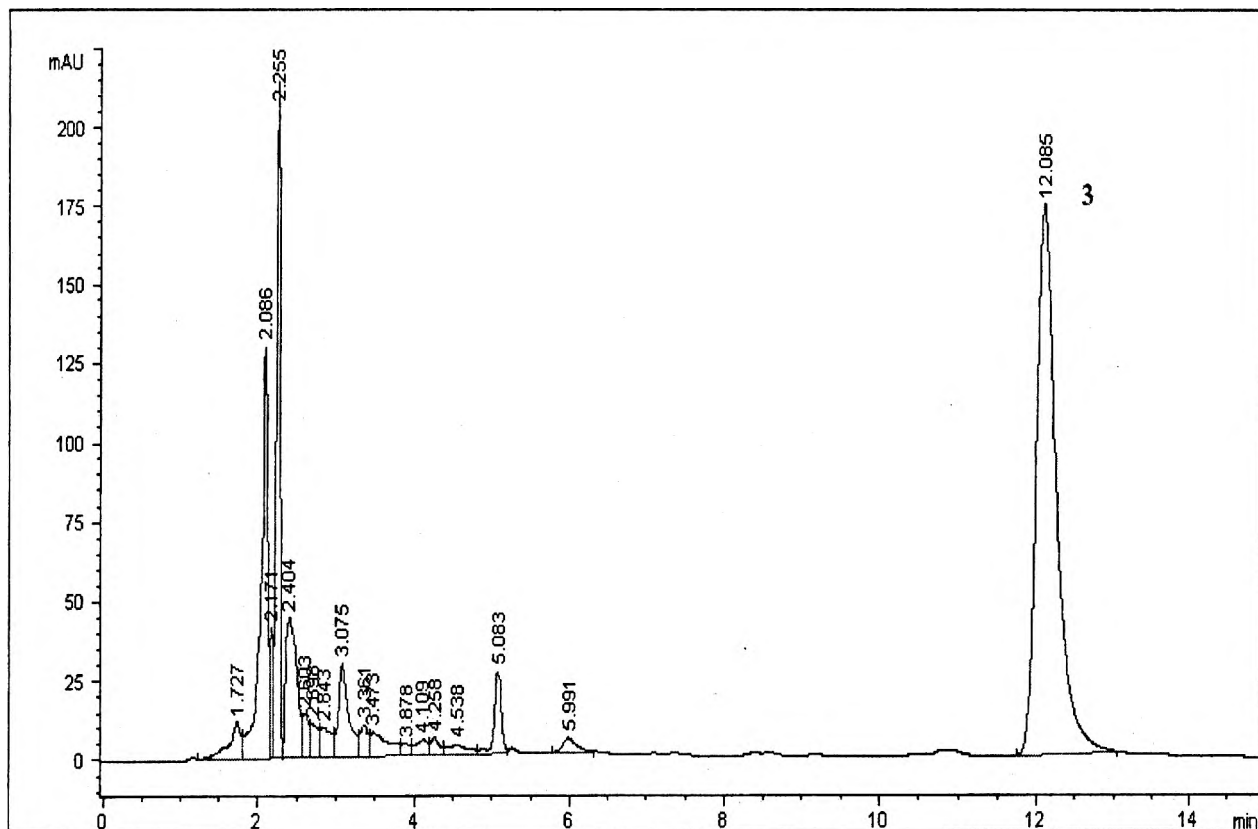


Рис. 2. Хроматограмма образца кофе Carta Noire (Франция) (кофеин (3)).

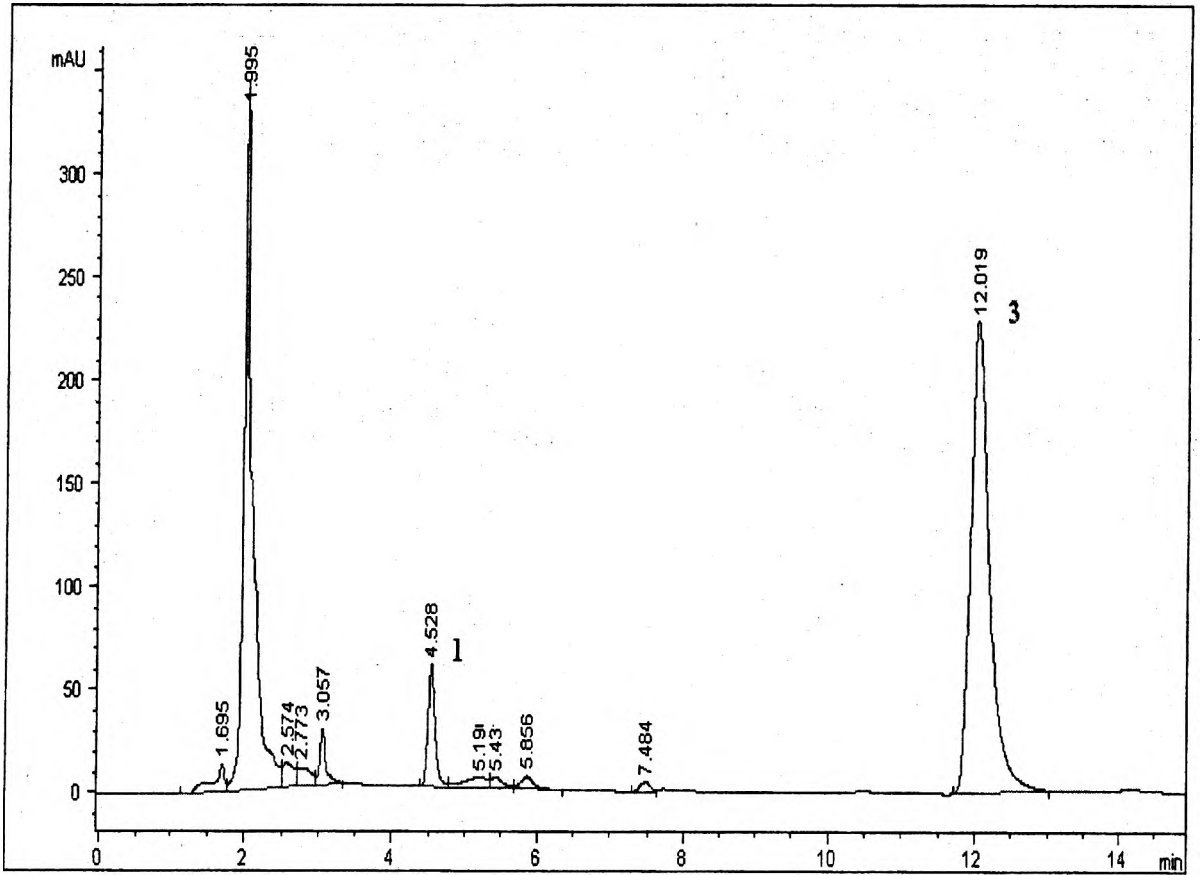


Рис. 3. Хроматограмма образца чая Greenfield Black Tea (Россия) (теобромин (1) и кофеин (3)).

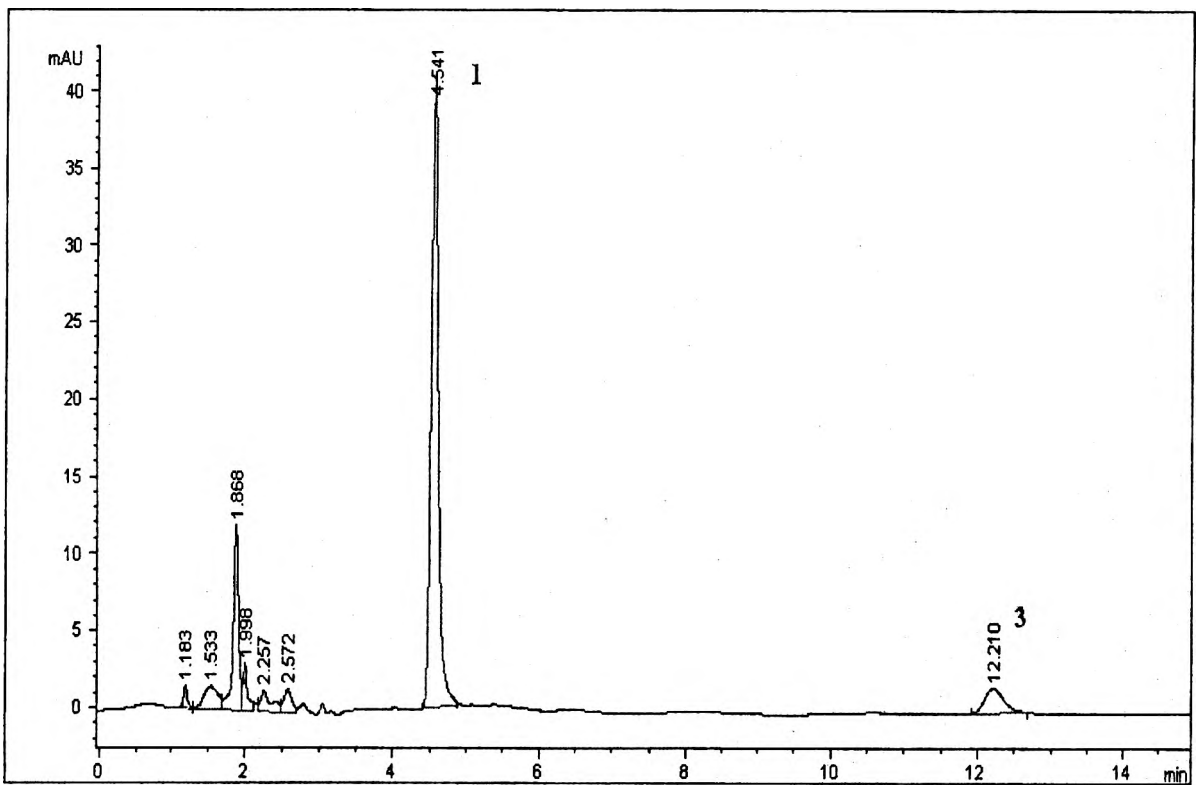


Рис. 4. Хроматограмма образца какао быстрорастворимого Тикли (Россия) (теобромин (1) и кофеин (3)).

Расчет количественного содержания алкалоидов. Расчет количественного содержания теобромина, теофиллина и кофеина осуществляют по градуировочным графикам зависимости концентрации вещества в пробе от площади пика. Содержание каждого алкалоида равно:

$$w = \frac{C \times 200 \times 100\%}{m_{\text{нав}}} \quad (1)$$

где: С – концентрации, определенные из градуировочных графиков для каждого из веществ: для теобромина $C=0,0341 \times S$ ($R=1$), для теофиллина

$C=0,0359 \times S$ ($R=1$), для кофеина $C=0,0321 \times S$ ($R=0,9999$), площадь пика рассчитывается как среднее арифметическое для пяти определений.

$m_{\text{нав}}$ – масса навески образца в граммах.

Количественное содержание пуриновых алкалоидов в некоторых образцах. По данной методике нами были проанализированы семь образцов чая, четыре кофе и один какао. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Содержание пуриновых алкалоидов в чае

Содержание, %	Greenfield Black tea	Greenfield Green tea	Greenfield Herbal tea summer bouquet	Золотая чаша	Lipton taste of London	Dilmah Ceylon Orange	Nadin зеленый чай
Теобромин	0,30	0,18	-	0,18	0,16	0,24	0,04
Кофеин	2,74	2,86	-	2,46	2,48	2,32	1,56

Таблица 3

Содержание пуриновых алкалоидов в кофе и какао

Содержание, %	Almagro Kaffa	Maxwell house	Paulig President	Carta Noire	Тикли какао
Теобромин	-	-	-	-	0,20
Кофеин	2,58	3,48	1,14	2,24	Менее 0,001

Как видно из таблиц 2 и 3 содержание теобромина колеблется в пределах от 0 до 0,30% в различных образцах, содержание кофеина от 0 до 3,48%. Чай «Greenfield Herbal tea summer bouquet» не содержал ни одного из алкалоидов, производных пурина. Наиболее низкое содержание кофеина среди образцов кофе в «Paulig President» натуральный Premium Arabica (Финляндия) 1,14%, среди чаев «Nadin» зеленый чай байховый (Дания) 1,56%.

ВЫВОДЫ

Разработанная методика позволяет определять пуриновые алкалоиды в объектах растительного происхождения методом ВЭЖХ. Продолжительность одного

анализа с учетом пробоподготовки составляет около 1 часа. По данной методике произведен количественный анализ 12 образцов чая, кофе и какао на содержание пуриновых алкалоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеев Д.В., Петров П.Т., Желтяев А.И. Влияние состава подвижной фазы на хроматографические характеристики производных пуринов и пиримидинов при ОФ ВЭЖХ// Вестник фармации. – 2005. – №1. – С. 20-26.

2. Belliaro F., Martelli A., Valle M.G. H.p.l.c. determination of caffeine and theophylline in Paullinia cupana Kunth (Guarana) and Cola spp. samples// Z. Lebensm. Unters. Forsch. – 1985. – 180(5). – С. 398-401.

3. Fukuhara K., Matsuki Y., Nanbara T. Simultaneous determination of theobromine, theophylline and caffeine in foods by high-performance liquid chromatography// Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi. – 1985 – 26 (2). – С. 208-212.
4. Hagenauer Hener U., Hener U., Dettmar F., Mosandl A. LiChrospher 60 RP-select B in HPLC analysis of foods// Kontakte. – 1989. – №1. – С. 24-29.
5. Marx F., Pfeilsticker K., Maia J. G. S. Analysis of guarana (Paullinia cupana var. sorbilis). I. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in guarana seeds by HPLC// Dtsch. Lebensm. Rundsch. – 1985. – 81(12). – С. 390-392.
6. Rubach K., Kirchhoff E. Comparative investigation of conventional and short-time roasted coffee// Kaffee-Tee-Markt – 1984 – 34(4). – С. 3-6.
7. Terada H., Sakabe Y. High-performance liquid-chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products// J. Chromatography – 1984. – С. 291, 453-459.
8. Terada H., Suzuki A., Tanaka H., Yamamoto K.S.O. Determination of catechins and methylxanthines in foodstuffs by semi-micro high-performance liquid chromatography// Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi – 1992. – 33 (4). – С. 347-354.
9. Vergnes M.F., Alary J. Determination of natural xanthines by HPLC. Comparison of methods and applications// Talanta – 1986. – 33(12). – С. 997-1000.

SUMMARY

D.V.Moiseev, A.I.Zhebentayev, P.T.Petrov
 DETERMINATION OF SOME PURINE
 ALKALOIDS IN TEA, COFFEE AND CA-
 CAO BY HPLC

Fast and simple procedure for the determination of theobromine, theophylline and caffeine in tea, coffee and cacao by HPLC is described. A reversed-phase column (Zorbax SB C-18, 250x4,6 mm, 5 mcm) with isocratic elution by MP (water and acetonitrile 90:10 in volume) is used. The calibration graph for this substances was linear from 1-200 mcg/ml (RSD <3%).

Ю.А.Голяк, О.М.Хишова

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИРИДОИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ПУСТЫРНИКА ПЯТИЛОПАСТНОГО

Витебский государственный
 медицинский университет

Изучено накопление иридоидов в различных частях пустырника пятилопастного. Установлен оптимальный период заготовки и подобраны условия сушки листьев пустырника пятилопастного.

Лекарственные средства на основе пустырника применяются в медицинской практике в качестве кардиотонического и регулирующего ритм сердечной деятельности средства при сердечно-сосудистых неврозах, стенокардии и гипертонической болезни [1, 2, 4, 5, 8]. В начале 20 века пустырник стали использовать как седативное средство [8]. В научной медицине сегодня широко применяют пустырник сердечный и пустырник пятилопастной. В качестве лекарственного сырья у этих видов пустырника используется трава [3].

В траве пустырника содержатся флавоноиды (от 0,2 до 0,5 %): рутин, кверцетин, 7-глюкозид кверцетина, кверцетрин, квинквелозид, гиперозид; алкалоиды (0,05 %): стахидрин - бетаин тетрааммониевого основания гириновой кислоты (0,015 %) и леонуриин, причем стахидрин обнаруживается лишь в начале цветения; дитерпеноиды: леокардин; сердечные гликозиды, эфирное масло (от 0,003 до 0,09 %); дубильные вещества (от 2 до 9 %); сапонины; горькие и сахаристые вещества; следы ретинола и аскорбиновой кислоты; паракумаровая кислота [6, 7, 9, 10].

Седативное действие травы пустырника обусловлено присутствием различных групп биологически активных веществ. Однако в настоящее время большинство авторов считают, что седативный эффект травы пустырника и лекарственных средств на ее основе обусловлен иридоидами (аюгол, аюгозид, гарпагид и гарпагида ацетат). Известно, что стебли, цвет-