

ВНЕШНИЕ ФАКТОРЫ И СОХРАННОСТЬ АРБУТИНА В ЛИСТЬЯХ БАДАНА ТОЛСТОЛИСТНОГО ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

Д.В. Моисеев^{1*}, канд. фарм. наук,
Г.П. Яковлев², докт. биол. наук, профессор

¹Витебский государственный медицинский университет; 210023,
Республика Беларусь, Витебск, пр. Фрунзе, д. 27

²Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия;
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14

*E-mail: ussr80@yandex.ru

Изучено влияние способа упаковки, влажности и температурного фактора на сохранность арбутина для цельных и измельченных листьев бадана обыкновенного в условиях длительного хранения. При 3-летнем хранении в негерметичной упаковке при температуре 20°C происходит снижение содержания арбутина на 7 и 11% (для цельного и измельченного сырья соответственно). В герметичной упаковке арбутин лучше сохраняется в измельченном сырье. Рассчитаны основные кинетические параметры протекающих реакций деструкции арбутина.

Ключевые слова: бадан толстолистный, *Bergenia crussifolia* (L.) Fritsch, ВЭЖХ, арбутин, хранение, упаковка, ускоренные испытания.

Листья бадана толстолистного — *Bergenia crussifolia* (L.) Fritsch. — оказывают кровоостанавливающее, противовоспалительное, желчегонное, вяжущее, антигипоксическое действие, обладают антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий. Лекарственные средства из листьев бадана применяются при болезнях пищеварительной системы (колитах, энтероколитах, гипосекреторном гастрите), аллергии, для нормализации обмена веществ, в гинекологической практике при различных кровотечениях. Листья бадана содержат до 22% арбутина и 2–4% свободной галловой кислоты и гидрохинона. По наличию арбутина проводится стандартизация листьев бадана толстолистного, его содержание регламентируется на уровне не менее 5% [1].

При стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) по количественному содержанию биологически активных веществ (БАВ) в нормативной документации указывается не «коридор» допустимых значений, как для большинства синтетических лекарственных средств и фармацевтических

субстанций, а только нижняя граница содержания («не менее...»). Содержание БАВ и фармакологическая активность для разных серий одного и того же ЛРС могут различаться до нескольких раз. Кроме того, при хранении ЛРС деструкция БАВ, по которым проводится стандартизация, в течение срока годности может достигать 50%. Согласно руководящим документам Комитета по лекарственным растениям Европейского медицинского агентства (ЕМЕА/НРМС), приемлемым отклонением в количественном содержании вещества, по которому проводится стандартизация (аналитический маркер), считается $\pm 10\%$ от начальной величины в течение предполагаемого срока годности [2]. Поэтому первостепенную важность для увеличения сроков годности ЛРС приобретает упаковка, в максимальной степени обеспечивающая сохранность БАВ в ЛРС при хранении.

Для оценки влияния внешних факторов на стабильность синтетических фармацевтических субстанций и выработки решений по упаковке используются стресс-тесты: кислотный и щелочной гидролиз, нагревание, окисление, действие катионов железа и меди, а также облучения [3]. Для оценки стабильности синтетических лекарственных средств при хранении используются ускоренные испытания. Для стран Европейского региона, согласно действующей редакции WHO Technical Report Series, 953. «Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products», они проводятся при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности $70 \pm 5\%$ в период не менее 6 мес. Методология проведения испытаний лекарственных средств на основе растительного сырья представ-

лена в работах З.А. Темердашева и Н. Khalid [6, 7]. Результаты оценки деструкции активных веществ в ЛРС на примере листьев левзеи сафлоровидной и листьев брусники обыкновенной рассмотрены в наших работах [4, 5].

Цель настоящего исследования – изучение влияния деструктирующих факторов (температура и влажность) на сохранность арбутина в листьях бадана толстолистного для цельного и измельченного сырья при длительном хранении.

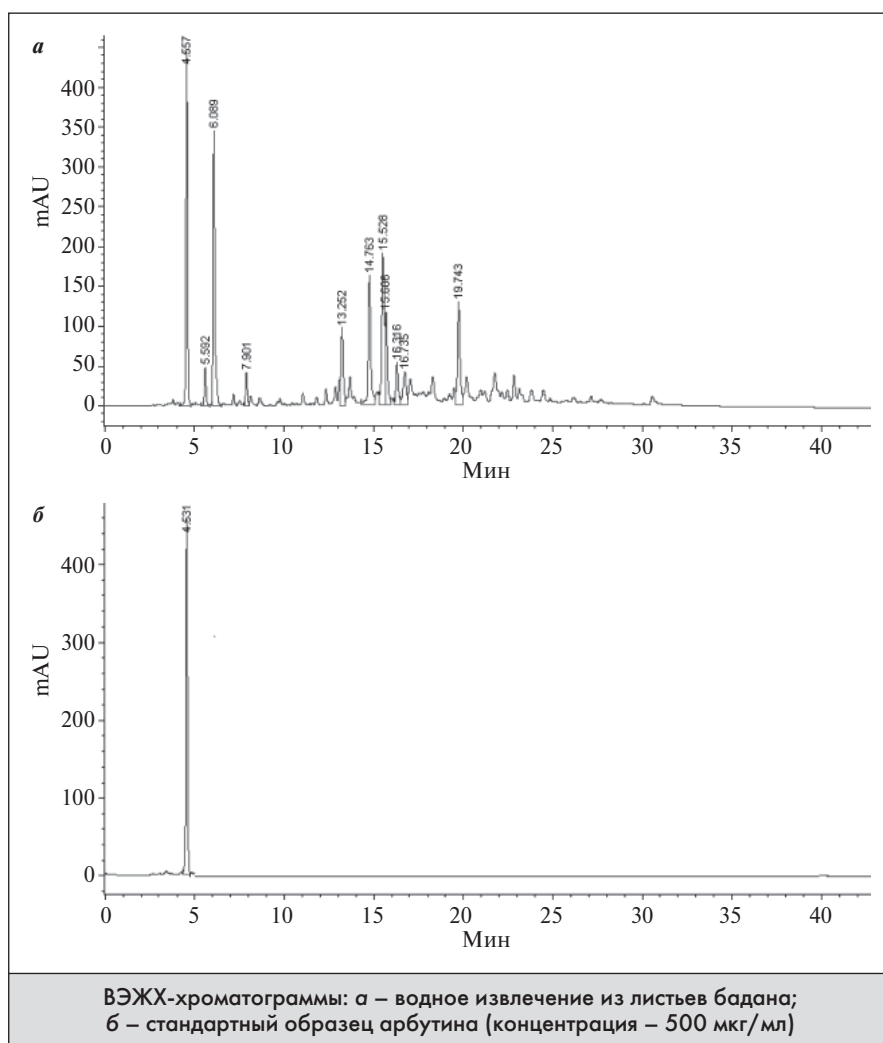
Экспериментальная часть

Объектом исследования служили листья бадана толстолистного, заготовленные в ботаническом саду Витебского государственного медицинского университета в июле 2015 г. в соответствии с рекомендациями GACP (Надлежащая практика сельскохозяйственного производства лекарственного растительного сырья).

Для инактивации ферментов листья высушивали при температуре 85°C с принудительной вентиляцией в течение 2 ч, а затем использовали воздушно-

тенивую сушку. Часть полученного сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (размер крупного порошка, используемого в фильтр-пакетах), другую оставляли цельной. Сырье помещали в контейнеры (стеклянные флаконы), как допускающие газообмен с внешней средой, так и герметично закупоренные (резиновая пробка под обкатку). Для оценки влияния влажности на сохранность БАВ в герметично закупоренных контейнерах искусственным путем создавали влажность сырья около 9% (кратковременно подсушивали сырье при температуре 85°C с принудительной вентиляцией), около 12% (естественная влажность после сушки) и 25% (к взвешенной массе сырья с установленной влажностью добавляли рассчитанный объем воды, перемешивали на вортекшейкере и герметично закупоривали). Для оценки влияния температуры на ускорение процессов деструкции использовали метод «ускоренного старения». Хранение с периодическим переконтролем осуществляли в естественных условиях (20±5°C в течение 3 лет), а также при 40°C (270 сут) и при 60°C (68 сут), что соответствовало 3 годам при допущении, что при увеличении температуры хранения на каждые 10°C скорость химических реакций увеличивается в 2 раза.

Определение содержания арбутина в образцах выполняли на жидкостном хроматографе Agilent 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на 4 растворителях G1311A, а также диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D. Анализы осуществляли на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-18 250×4,6 мм, размер частиц – 5 мкм. Подвижная фаза: ацетонитрил и 0,01 М КН₂РО₄ рН 3,0 (градиентный режим), скорость подачи подвижной фазы – 1 мл/мин, рабочая длина волны – 280 нм выбрана на основании анализа спектра поглощения арбутина в области максимума его пика на хроматограмме (см. ри-



сунок). Разделение проводили при температуре колонки 30°C [5].

Анализируемую пробу готовили следующим образом: точную навеску измельченных листьев бадана помещали в герметично закрывающийся стеклянный флакон, добавляли воду очищенную в соотношении 1:80, укупоривали и взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,005 г. Флакон помещали на кипящую водяную баню и экстрагировали в течение 40 мин, периодически встряхивая. Затем охлаждали, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы водой очищенной. Около 1 мл извлечения центрифугировали при 5000g в течение 5 мин. Отбирали 0,50 мл надосадочной жидкости в виалу, прибавляли 0,5 мл воды очищенной, перемешивали на вортекс-шейкере и 10 мкл инжестрировали в хроматограф.

Исследования проводили со стандартным образцом арбутина. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций растворов арбутина 12,5–2000 мкг/мл. Вещество считали идентифицированным при совпадении времени удерживания и спектра поглощения со стандартом. В каждой серии анализов использовали рабочий раствор стандартного образца (РСО) с точно известной концентрацией, примерно соответствующей ожидаемой концентрации арбутина в образцах.

Порядок реакций определяли графическим методом [8]. Для реакции нулевого порядка прямолинейная зависимость соблюдается для уравнения: $k \cdot t = C_0 - C$ (1); для реакции 1-го порядка: $k \cdot t = \ln(C_0/C)$ (2); для реакции 2-го порядка: $k \cdot t = (1/C - 1/C_0)$ (3); где k – константа скорости реакции, t – время от начала реакции (сут), C_0 – концентрация вещества в начале реакции, C – концентрация вещества в текущий момент времени.

Константу скорости реакции (k) рассчитывали по интегральной форме уравнения Аррениуса: $k = Ae^{E_a/RT}$ (4); энергию активации (E_a , Дж/моль) и предэкспоненциальный множитель (A) – при помощи логарифмической формы уравнения Аррениуса: $\ln k = \ln A - E_a/RT$ (5), где T – температура (в градусах Кельвина), R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/мольК).

Исходное содержание арбутина в листьях бадана составляло 18% в пересчете на абсолютно сухое сырье. Для удобства расчетов исходное содержание арбутина в сырье принимали за 100%, а убывание считали как отношение содержания для опыта, выполненного в текущий момент времени, к значению исходного содержания, выраженному в процентах. При хранении измельченных и цельных листьев бадана во всех случаях при повышении температуры содержание арбутина в образцах уменьшалось. Наиболее полная сохранность арбутина обеспечивалась при хранении сырья в услови-

ях, допускающих возможность газообмена с внешней средой. Деструкция арбутина увеличивалась с повышением влажности сырья. При герметичном укупоривании в измельченном сырье арбутин сохранялся лучше. При наличии газообмена с внешней средой арбутин сохранялся лучше в цельном сырье.

Как показало сравнение полученных результатов с таковыми для листьев брусники обыкновенной, в листьях бадана при повышенной влажности сырья (25%) содержание арбутина в конце срока хранения колебалось от 67 до 81% от исходного в зависимости от температуры хранения. Для листьев брусники данный показатель находился в диапазоне от 3,9 до 62,2% [5]. Наибольшая деструкция арбутина в листьях брусники происходит в измельченном сырье при температуре 20° и 40°C. При среднем и низком уровнях влажности процессы деструкции арбутина в листьях брусники в основном протекают на 10–30% быстрее, по сравнению с листьями бадана. Основной причиной данного явления, на наш взгляд, является процесс сушки заготовленного сырья: для листьев брусники использовалась воздушно-теньевая сушка, для листьев бадана – кратковременная при температуре 85°C, что привело к инактивации ферментов, гидролизующих арбутин. Поэтому при хранении листьев брусники основным фактором, приводящим к деструкции арбутина, становится внутренний фактор (ферментативный гидролиз), чего удается избежать при хранении листьев бадана. Если говорить о содержании арбутина в сырье, то для длительного хранения можно рекомендовать краткосрочную сушку (2–3 ч) при более высокой температуре и дальнейшее воздушно-теньевое досушивание сырья.

Для определения порядка реакции деструкции арбутина в сырье были рассчитаны графическим способом константы скоростей для реакций нулевого, 1-го и 2-го порядков. При этом коэффициенты корреляции уравнений не всегда позволяли четко отнести реакцию к определенному порядку. При расчете методом подстановки значения констант скоростей реакций нулевого, 1-го и 2-го порядка для сырья, хранящегося при одинаковых условиях, практически не отличались друг от друга (отклонение от среднего значения составляло менее 20%, что, на наш взгляд, приемлемо для прогностических расчетов). Поэтому для расчета энергии активации использовали средние значения констант скоростей (табл. 1, 2).

Для прогнозирования сроков годности ЛРС при хранении при различных температурах необходимо знать порядок реакции и рассчитать параметры протекающих реакций: энергию активации и предэкспоненциальный множитель.

Таблица 1

СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИЙ НУЛЕВОГО, 1-ГО И 2-ГО ПОРЯДКОВ ($k_{\text{сред}} \pm \Delta k$) · 10⁻³

Температура	Измельченное сырье, %				Цельное сырье, %			
	открытое	9	13	25	открытое	9	13	25
20°C	3,3±0,2	2,9±0,2	3,9±0,2	5,1±0,4	2,3±0,1	4,8±0,4	4,9±0,4	8,3±1,0
40°C	4,1±0,2	3,9±0,2	4,2±0,3	8,0±1,0	2,9±0,1	5,9±0,5	6,1±0,5	9,0±1,2
60°C	5,3±0,4	5,4±0,4	6,7±0,6	10,4±2,0	4,1±0,3	6,9±0,7	7,5±0,8	11,0±1,8

Таблица 2

ОПРЕДЕЛЕННЫЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ КОЭФФИЦИЕНТЫ УРАВНЕНИЯ (5)

Параметры протекающих реакций	Измельченное сырье, %				Цельное сырье, %			
	открытое	9	13	25	открытое	9	13	25
Энергия активации (Ea)	0,95 · 10 ⁴	1,23 · 10 ⁴	1,07 · 10 ⁴	1,46 · 10 ⁴	1,15 · 10 ⁴	0,73 · 10 ⁴	0,85 · 10 ⁴	0,57 · 10 ⁴
Предэкспоненциальный множитель (A)	0,16	0,46	0,30	2,07	0,26	0,10	0,16	0,08
Коэффициент корреляции графика зависимости ln k от 1/T	0,9944	0,9971	0,9139	0,9919	0,9848	0,9992	0,9990	0,9656

В качестве примера приведем расчеты, через какой промежуток времени содержание арбутина в цельном ЛРС снизится на 5% при хранении в негерметичной упаковке при температуре 22°C. Расчеты проведем для нулевого, 1-го и 2-го порядков с использованием констант реакций, рассчитанных для каждого из порядков реакций, а также с использованием среднего значения константы реакции. По уравнению (5) находим значение констант скорости реакции при температуре 22°C (295K): для нулевого порядка – 0,0047, 1-го порядка – 0,0050, 2-го порядка – 0,0054. Среднее значение константы скорости равно 0,0050. По уравнениям (1, 2 и 3) находим срок годности: для нулевого порядка: $t = (1 - 0,95)/(0,0047) = 10,6$ мес (при использовании в расчетах усредненной константы скорости 10,0 мес); для 1-го порядка: $t = (\ln(1/0,95 - 1))/(0,005) = 10,3$ мес (также 10,3 мес); для 2-го порядка: $t = (1/0,95 - 1)/(0,0054) = 9,7$ мес (10,5 мес).

Таким образом, используя в расчетах константы скорости нулевой, 1-й и 2-й реакций, а также усредненное значение константы скорости реакции, получили результаты, которые отличались в пределах 5%, что, на наш взгляд, вполне приемлемо для прогнозирования сроков годности.

Выводы

1. Экспериментально доказано, что при длительном хранении цельных листьев бадана толстолистного предпочтительнее использовать негерметичную упаковку, в измельченном сырье (крупный порошок для фильтр-пакетов) арбутин лучше сохраняется в герметичной упаковке.

2. Предложена методика прогнозирования сроков годности лекарственного растительного сырья на

основе метода хранения при повышенной температуре («ускоренного старения»). На примере листьев бадана показано, что порядок реакции не оказывает существенного влияния (до 5%) на точность прогноза срока годности.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения (под ред. Г.П. Яковлева). СПб.: СпецЛит, 2010; 863. (Pharmacognosy. Medicinal raw materials of plant and animal. (ed. G.P. Jakovlev). SPb.: SpecLit, 2010; 863) (in Russian).
2. Guideline on quality of herbal medicinal products/ traditional herbal medicinal products EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2. London, September, 2011; 13.
3. Klick S. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. Pharmaceutical Technology, 2005; 2: 48–66.
4. Моисеев Д.В. Новый метод определения сроков годности лекарственного растительного сырья (листья *Rhaponticum Carthamoides*) на основе стресс-теста «ускоренное старение». Рецепт, 2012; 2: 47–54. (Moiseev D.V. A new method for determining the shelf life of medicinal vegetative raw materials (leaves of *Rhaponticum Carthamoides*), on the basis of the stress test «accelerated aging». Recept, 2012; 2: 47–54) (in Russian).
5. Темердашев З.А., Фролова Н.А., Цюпко Т.Г., Чупрынина Д.А. Оценка стабильности фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях в процессе их хранения. Химия растительного сырья, 2011; 4: 193–198. (Temerdashev Z.A., Frolova N.A., Cjupko T.G., Chuprynina D.A. Evaluation of stability of phenolic compounds and flavonoids in medicinal plants in the process of storage. Himija rastitel'nogo syr'ja, 2011; 4: 193–198) (in Russian).
6. Khalid H. Accelerated Stability and Chemical Kinetics of Ethanol Extracts of Fruit of *Piper sarmentosum* Using High Performance Liquid Chromatography. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2011; 10 (3): 403–413.
7. Поленов Ю.В., Егорова Е.В. Кинетика химических реакций. Иваново: Иван. гос. хим.-технол. ун-т, 2010; 68. (Polenov Yu.V., Egorova E.V. Kinetics of chemical reactions. Ivanovo: Ivanovskiy State chem.-technol. university, 2010; 68) (in Russian).

Поступила 16 октября 2015 г.