

Determination of the Dry Extract of Ginkgo Biloba Leaves Residues on Pharmaceutical Equipment Surfaces by High Performance Thin Layer Chromatography

A.V. Yegorova^{1*}, G.A. Fedosenko², G.V. Maltsev², S.N. Kashutskyy², V. P. Antonovich¹

¹ A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, Ukraine, 65080; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

² «INTERCHEM SLC», Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, Ukraine, 65080

Received: November 17, 2015; Accepted: December 23, 2015

High-performance thin-layer chromatography method for determination of residual amounts of dry extract of Ginkgo biloba leaves (from content of quercetin) in washings from surfaces of pharmaceutical equipment by was developed. Detection was performed by densitometric scanning by measuring of absorbance at a wavelength 380 nm. It was found that intensity of analytical signal from quercetin in adsorbent phase has time-dependent character. This effect can be due to interaction of quercetin with fluorescent indicator UF 254 (zinc silicate) that presents in the adsorbent phase. It was demonstrated that addition of protonic prevents the complex formation and thus stabilize the signal. Sufficient stability of the signal is observed at next reagents ratio - quercetin (µg): phosphoric acid, 85% (µL) = 1:1. The method was validated on the following parameters: specificity, linearity, precision, limit of detection and limit of quantification. The calibration curve was linear over the concentration range of quercetin 10.0–50.0 ng/spot, the limit of detection - 4.5 ng/spot. The degree of recovery of the dry extract of ginkgo biloba leaves from the surface of the pharmaceutical equipment is greater than 95%.

Keywords: high performance thin layer chromatography, dry extract of ginkgo biloba leaves, quercetin, cleaning of pharmaceutical equipment

Определение остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба на поверхностях фармацевтического оборудования методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

A.B. Egorova^{1*}, A.A. Fedosenko², G.V. Maltsev², S.N. Kashutskyy², V.P. Antonovich¹

¹ Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, Украина, 65080; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

² ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, Украина, 65080

Поступила: 17 ноября 2015 г; Принята: 23 декабря 2015 г

Предложена методика определения остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба (по содержанию кверцетина) методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии в смывах при очистке фармацевтического оборудования. Детектирование осуществляли методом денситометрического сканирования на длине волны 380 нм. Было обнаружено, что интенсивность аналитического сигнала от кверцетина изменяется в зависимости от времени нахождения соединения в фазе адсорбента. Причину этого эффекта мы видим во взаимодействии кверцетина с флуоресцентным индикатором UF 254 (силикат цинка), находящимся в фазе кремнезема. Показано, что добавка протонной кислоты препятствует комплексообразованию кверцетина с ионами цинка и стабилизирует аналитический сигнал. Достаточная стабильность сигнала достигается при соотношении реагентов кверцетин (мкг): фосфорная кислота, 85% (мкл) = 1:1. Методика валидирована по следующим показателям: специфичность, линейность, точность, предел обнаружения и предел количественного определения. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций кверцетина 10.0–50.0 нг/пятно, предел обнаружения составляет – 4.5 нг/пятно. Степень извлечения сухого экстракта листьев гинкго билоба с поверхности фармацевтического оборудования составляет более 95%.

Ключевые слова: высокоэффективная тонкослойная хроматография, сухой экстракт листьев гинкго билоба, кверцетин, очистка фармацевтического оборудования

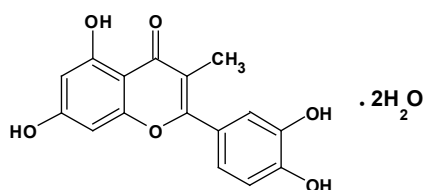
При производстве лекарств важнейшим требованием надлежащей производственной практики является очистка оборудования, которая проводится для предотвращения его перекрестной контаминации при переходе от одного лекарственного препарата к другому [1, 2].

В случае контроля качества очистки фармацевтического оборудования необходимо также научно обосновать и рассчитать допустимые пределы содержания остатков активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) на поверхности оборудования после очистки (критерии приемлемости чистоты) с учетом терапевтической дозы АФИ, токсичности, объема серии, площади поверхности используемого оборудования и др [3]. На основании установленных критериев приемлемости чистоты разрабатывают методики определения остаточных количеств АФИ и проводят их валидацию.

Важным параметром, отражающим качество очистки оборудования после производства лекарственных форм и биодобавок, содержащих АФИ растительного происхождения, является содержание мажорного компонента на поверхности соответствующей установки (в случае сухого экстракта листьев гинкго билоба - кверцетина).

В состав сухого экстракта листьев гинкго билоба входят различные биологически активные вещества (БАВ), в том числе флавоноиды, терпеновые трилактоны, алкалоиды, органические кислоты и микроэлементы. Эти БАВ оказывают антиоксидантное, противоишемическое, противоотечное, антиагрегантное, диуретическое и нейропротективное действие.

Кверцетин (Кв) - 3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон дигидрат.



В настоящее время для определения кверцетина в фитопрепаратах используют люминесценцию [4-5, 6], масс-спектрометрию [7], ВЭЖХ с УФ-детектированием [8, 9]. При этом время анализа, как правило, составляет 2-3 часа.

Критичным этапом при определении флавоноидов в лекарственном растительном сырье, в частности, в сухом экстракте листьев гинкго билоба, является пробоподготовка, включающая извлечение аналитов. По фармакопейной методике [9] извлечение флавоноидов осуществляют водно-метанольным раствором в среде 0.1М раствора хлористоводородной кислоты при кипячении пробы в течение 30 мин. Далее после хроматографирования содержание флавоноидов устанавливают в пересчете на

кверцетин. При разработке методики определения Кв в смывах с поверхностей фармооборудования такая пробоподготовка невозможна.

С учетом необходимости проведения многочисленных анализов смывов перспективным методом определения в них кверцетина может стать высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) [10], которая, в отличие от ВЭЖХ, позволяет быстро проводить одновременный анализ серии образцов в идентичных условиях и широко применяется для определения кверцетина в растительном сырье [11-12, 13, 14].

Целью данной статьи была разработка и валидация простой и селективной ВЭТСХ-методики определения остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба (по содержанию кверцетина) в смывах с поверхностей фармооборудования после производства лекарственных форм, содержащих данный АФИ.

Экспериментальная часть

Реагенты. Для приготовления подвижных фаз, растворов сравнения исследуемого АФИ и смывов применяли метанол, толуол, этилацетат, муравьиную и концентрированную фосфорную кислоты (MERCK).

Смывы с поверхности фармооборудования отбирали хлопковыми аппликаторами (свабами) Alpha® Sampling Swab марки TX 715, смоченными в 96% этаноле.

В качестве стандартных образцов использовали фармацевтическую субстанцию сухого экстракта листьев гинкго билоба, соответствующую требованиям Европейской фармакопеи [9] и *кверцетина дигидрат* (Alfa Aesar, Великобритания).

В качестве подвижной фазы для элюирования использовали смесь растворителей толуол - этилацетат - кислота муравьиная (50:40:2).

Раствор для пробоподготовки: 100 мл метанола смешивают с 0.1 мл концентрированной фосфорной кислоты (85%), перемешивают.

Аппаратура. Нанесение модельных растворов и растворов проб на пластины для ВЭТСХ осуществляют с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцария).

Хроматографическое разделение проводили в вертикальной камере (CAMAG, Швейцария).

После высушивания проводят денситометрическое измерение абсорбции при длине волны 380 нм с помощью сканера для тонкослойной хроматографии TLC Scanner 3 (CAMAG, Швейцария) с использованием дейтериевой и ртутной ламп.

Обработку результатов проводят с использованием программного обеспечения опции WinCATS "Quantitative Chromatogram Evaluation" версия 1.4.8 (CAMAG, Швейцария).

В работе использовали весы лабораторные электронные AX 124 фирмы SARTORIUS (Германия) и магнитную мешалку ARE (VELP Scientifica, Италия).

Результаты и их обсуждение

Расчет теоретического предельно допустимого содержания АФИ на фармацевтическом оборудовании. При расчете предела содержания АФИ (сухого экстракта листьев гинкго билоба) на оборудовании после производства и очистки использовался подход, который основан на принципе «наихудшего случая» по активности и который основан на допущении переноса определенной дозы предшествующего АФИ в последующий препарат с учетом суточных доз.

Препарат «ГИНКГО БИЛОБА» выпускается в капсулах по 40, 80 и 120 мг АФИ на одну дозированную единицу (ДЕ). Согласно инструкции по медицинскому применению в сутки принимается 2 ДЕ. Средняя суточная терапевтическая доза (ТД) предшествующего препарата составит:

$$TD = 2 \times \frac{40 + 80 + 120}{3} = 160 \text{ мг.}$$

Предельно допустимая масса предшествующего продукта в максимальной суточной дозе последующего, D (мг), составит:

$$D = \frac{TD \times SF}{100} = \frac{160 \times 0.1}{100} = 0.16 \text{ мг,}$$

где: SF – фактор безопасности предшествующего АФИ: допустимая доля предшествующего продукта от его терапевтической дозы в максимальной суточной дозе последующего, $SF = 0.1\%$.

В качестве «наихудшего» случая был выбран последующий препарат с наибольшей максимальной суточной дозой, производимый на производственном участке ОДО «ИНТЕРХИМ» – а именно МЕБИКАР IC, таблетки по 0.5г, максимальное число дозированных форм в суточной дозе которого составляет $N_2 = 20$ шт, а наименьшая загрузка таблетмассы серии $N_1 = 0.150$ кг, номинальная масса одной таблетки $m_0 = 0.550$ г.

Теоретическое предельно допустимое значение остатков предыдущего продукта на всем оборудовании после очистки, E_T (мг):

$$E_T = \frac{D \times N_1}{m_0 \times N_2} \times 10^3 = \frac{0.16 \times 0.15 \times 1000}{0.55 \times 20} = 2.18 \text{ мг.}$$

С учетом того, что на всей площади, контактируемой с продуктом $S_2 = 20.05$ дм², должно находиться E_T мг

предшествующего продукта, в пробе, взятой с участка оборудования с поверхностью пробоотбора площадью S_1 , должно находиться теоретическое предельно допустимое значение массы остатка предыдущего продукта (сухого экстракта листьев гинкго билоба) в пробе (в смыве с площади $S_1 = 1$ дм²) – X_{crit} (мкг):

$$X_{crit} = \frac{E_T \times S_1}{S_2} \times 10^3 = \frac{2.18 \times 1 \times 1000}{20.05} = 108.73 \text{ мкг.}$$

Обоснование диапазона масс стандартного образца и объема испытываемой пробы для нанесения на один хроматографический трэк. Определение экстракта ведется по сигналу кверцетина, содержание которого в сухом экстракте листьев гинкго билоба было определено предварительно методом ВЭЖХ и составило $P = 4.25\%$.

Установлено, что минимально обнаруживаемая масса кверцетина методом ВЭТСХ составляет около 5 нг на пятно. Поэтому нижней массой нанесения было выбрано 10 мкг на пятно, а диапазон масс нанесения для построения градуировочного графика был распределен следующим образом: 10, 20, 30, 40 и 50 нг/пятно, соответственно.

В качестве номинального нанесения, т. е. нанесения, масса которого будет соответствовать в дальнейшем критическому значению в смыве, была установлена точка $m_{crit} = 40$ нг/пятно. Т. о. в процентном соотношении диапазон распределится следующим образом: 25%, 50%, 75%, 100% и 125%.

Один испытываемый сваб подвергается обработке объемом растворителя $V_s = 5$ мл. Расчетная критическая концентрация кверцетина в испытываемой пробе, с учетом его содержания в экстракте $P = 4.25\%$, составит:

$$C_{crit} = \frac{X_{crit} \times P_Q}{V_s \times 100} = \frac{108.73 \times 4.25}{5 \times 100} \approx 0.92 \text{ мкг/мл.}$$

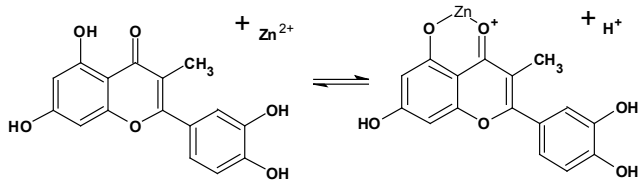
Тогда объем наносимой пробы для испытываемого раствора составит:

$$V_i = \frac{m_{crit}}{C_{crit}} = \frac{40}{0.92} = 43.48 \approx 40 \text{ мкл.}$$

Хроматографическое определение кверцетина. При разработке методики в соответствии с литературными данными [15], в качестве растворителя для приготовления растворов был использован метанол. При построении градуировочного графика зависимости площади пика от массы кверцетина на пластинке было обнаружено, что величина свободного члена уравнения градуировочной зависимости ($y = 32.094 \cdot x - 1294.3$) имеет очень большое

отрицательное значение и нижнее детектируемое нанесение соответствует массе 50 нг/пятно.

Мы предположили, что это связано с взаимодействием кверцетина с компонентами сорбента. В связи с этим была исследована робастность методики по зависимости интенсивности сигнала от времени нахождения вещества на пластинке. Для этого на пластинку наносили по 100 нг кверцетина с интервалом 15 мин между каждой аппликацией, всего 5 нанесений. Было обнаружено монотонное изменение сигнала в зависимости от времени нахождения вещества на поверхности сорбента. Поскольку в анализе используются пластины с флуоресцентным индикатором UF 254, а в качестве индикатора используется силикат цинка (II) [16], было предположено, что на поверхности сорбента в месте нанесения происходит обратимое взаимодействие кверцетина с солью цинка (II) по следующей схеме:



Принципиально важно, что для альтернативных схем взаимодействия (по ортооксикарбонильной или дифенольной группировкам) реакция идет с вытеснением протона.

Для подтверждения этой гипотезы был проведен эксперимент по изучению зависимости интенсивности сигнала от времени нахождения вещества на пластинке с сорбентом без флуоресцентного индикатора. Было обнаружено, что в этом случае не наблюдается статистически значимого изменения площади пика кверцетина в зависимости от времени нахождения вещества на пластинке. Из предполагаемой схемы взаимодействия следует, что добавка протонной кислоты будет смещать равновесие влево и препятствовать комплексообразованию. Для подтверждения этого были приготовлены растворы кверцетина в метаноле с добавлением концентрированной фосфорной кислоты (85%) в соотношении 2:1, 1:1 и 1:2 (мкг вещества на мкл кислоты) и изучена стабильность кверцетина на поверхности сорбента с флуоресцентным индикатором. Было обнаружено, что стабильность сигнала (интенсивности абсорбции) достигается при соотношении кверцетин - концентрированная фосфорная кислота (85%) = 1:1 (рис.1).

Методика основана на изменении площади пика кверцетина на хроматограмме в зависимости от концентрации сухого экстракта листьев гинкго билоба (при необходимости раствор пробы разбавляют до концентрации, лежащей

в интервале градуировочного графика). Содержание Кв в смывах (мкг/смыв) определяют по градуировочному графику.

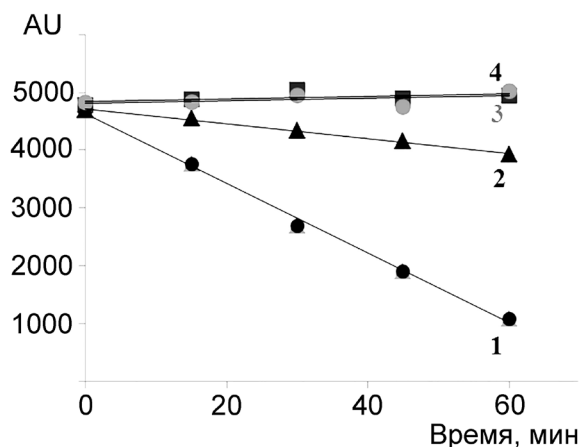


Рис.1. Зависимость площади пика кверцетина от времени нахождения вещества на пластинке и количества фосфорной кислоты: 1 – без кислоты, 2 – кверцетин – фосфорная кислота 2:1, 3 – кверцетин-фосфорная кислота 1:1, 4 – кверцетин-фосфорная кислота 1:2.

Построение градуировочного графика.

Раствор сравнения. 10 мг кверцетина помещают в мерную колбу вместимостью 50.0 мл, растворяют в 20 мл метанола и доводят до метки метанолом. 1.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 20.0 мл, прибавляют 0.2 мл концентрированной фосфорной кислоты (85%) и доводят до метки метанолом.

На линию старта хроматографической пластинки с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 наносят 1, 2, 3, 4, 5 мкл (10, 20, 30, 40, 50 нг кверцетина, соответственно) раствора сравнения. Пластинку помещают в камеру со смесью растворителей толуол - этилацетат - кислота муравьиная (50:40:2). Когда фронт растворителей пройдет 5 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в потоке теплого воздуха в течение 20 мин и сканируют на хроматоденситометре при длине волны 380 нм.

Аппликацию образцов проводят в следующих условиях: объем шприца, мкл – 100; объем преддозировки, мкл – 2; расстояние от края пластинки до центра первого трека, мм – 15; расстояние от нижнего края пластинки до старта, мм – 15; длина полосы нанесения, мм – 6; расстояние между центрами треков, мм – не меньше 10; скорость дозирования, нл/сек – 200.

Сканирование хроматограммы проводят при условиях: размер щели, мм×мм – 4.00×0.30; скорость сканирования, мм/сек – 20; разрешение, мкм/шаг – 100; длина волны сканирования, нм – 380; минимальная высота пика, AU – 5; минимальная площадь пика, AU – 20.

Измеряют площади полученных пятен на

хроматограмме. По полученным результатам строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс значения массы кверцетина (нг/пятно), а по оси ординат – значения площадь пика, AU (интенсивности абсорбции при 380 нм).

Линейная зависимость, описывается уравнением: $S = -12.573 + 82.928 \cdot x$, где: x – масса Кв на хроматограмме, в нг/пятно; S – площадь пика, AU. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций кверцетина 10.0–50.0 нг/пятно, предел обнаружения (ПО) составляет – 4.5 нг/пятно.

$$ПО = 3.3 \cdot \sigma/b = 3.3 \cdot 112.13/82.928 = 4.5 \text{ нг/пятно,}$$

где: σ – стандартное отклонение свободного члена; b – тангенс угла наклона градуировочной прямой.

Предел обнаружения кверцетина – 0.56 мкг/смыв (т.е. 0.56 мкг на сваб, которым сделан смыв с поверхности 100.0 см²).

На рисунке 2 приведены 3D хроматограммы: 1 – промывного раствора с чистого аппликатора; 2-6 – стандартного раствора кверцетина (10, 20, 30, 40, 50 нг/пятно); 7,8 – растворов после обработки свабов, которыми делали смывы с поверхности фармацевтического оборудования (кверцетин не обнаружен).

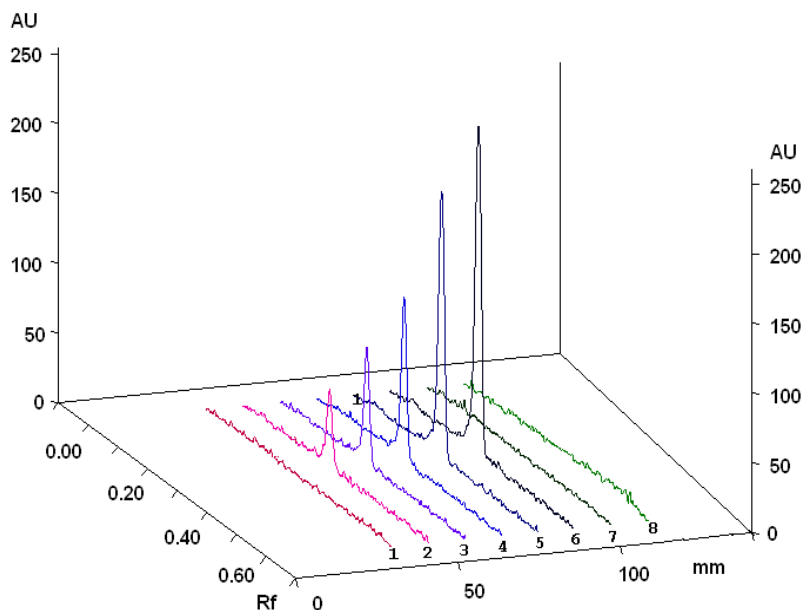


Рис.2. 3D хроматограммы: 1 – промывного раствора с чистого аппликатора; 2-6 стандартного раствора кверцетина (10, 20, 30, 40, 50 нг/пятно); 7,8 – растворов после обработки свабов, которыми делали смывы с поверхности.

Методика определения. Сваб со смывом загрязнения оборудования (площадь смыва – 100.0 см²) помещают в лабораторный стакан вместимостью 25 мл, добавляют 5.0 мл раствора для пробоподготовки и проводят десорбцию в течение 10 мин и наносят 40 мкл полученного раствора на хроматографическую пластинку с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5. Далее поступают как при построении градуировочного графика.

Содержание сухого экстракта листьев гинкго билоба (X), в мкг/смыв рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{m_q \times 5 \times 10000}{40 \times P} = \frac{m_q \times 1250}{P},$$

где: m_q – масса кверцетина на хроматограмме испытуемого раствора, полученная по градуировочному графику, нг/пятно; P – содержание кверцетина в данной серии АФИ сухого экстракта

листьев гинкго-билоба, %.

Определение степени извлечения. В модельных опытах в ходе валидации методики делали смывы смоченным этиловым спиртом свабом с поверхности (100.0 см²), на которую искусственно наносили по 0.5 мл раствора 200 мкг/мл АФИ сухого экстракта листьев гинкго билоба (что соответствует 100 мкг экстракта или 4.25 мкг кверцетина) и высушивали. Далее проводили извлечение 5.0 мл раствора для пробоподготовки (0.85 мкг/мл кверцетина) и наносили 40 мкл полученного раствора на хроматографическую пластинку с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (рис. 3). Далее поступают как при построении градуировочного графика.

Установлено, что количественное извлечение сухого экстракта листьев гинкго билоба в испытуемый раствор составляет 95.0–96.7 % (таблица 1).

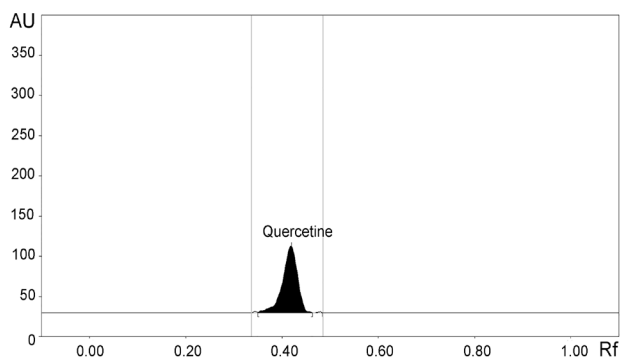


Рис.3. Денситограмма модельного раствора, полученная при изучении степени извлечения АФИ с поверхности фармацевтического оборудования.

Выводы

Разработана и валидирована методика определения остаточных микроколичеств сухого экстракта листьев гинкго билоба (по содержанию кверцетина) методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии в смывах с поверхностей фармацевтического оборудования, на котором произведены капсулы препарата

Литература

1. PIC/S document PI006-2. Recommendations on Validation Master Plan, Installation und Operational Qualification. Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; July 2004.
2. U.S. Food and Drug Administration. Guide to inspections validation of cleaning processes; July 1993.
3. Fourman G.L., Mullen M.V. Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations. *Pharm. Technol.* 1993, 17, 54-60.
4. Gugler R., Dengler H. J. Sensitive Fluorometric Method for Determination of Quercetin in Plasma or Urine. *Clinical chemistry.* 1973, 19(1), 36-37.
5. Reshma J., Sadhana R. Determination of quercetin in lotus leaves extract and glycyrrhizin in liquorice roots extract by spectrofluorimetric methods. *IJPR.* 2014, 4(11), 5495-5500.
6. Shaghghi M, Manzoori J.L, Afshar D.J, Jouyban A. Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using Terbium sensitized fluorescence method. *DARU.* 2009, 17(4), 264-268.
7. Jeevan K.P., Chao. C.W., Stephen B. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free radical biology and medicine.* 2004, 37(9), 1324–1350.
8. Bharti, J.; Rashmi, R. Quantitative analysis of quercetin in *Pueraria tuberosa* by using high performance liquid chromatography. *J. Chem. Boil. Phys. Sci.* 2012, 2(4), 1688-1692.

Табл.1. Степень извлечения АФИ с поверхности фармацевтического оборудования.

Номер смыва	Степень извлечения, %
1	95.2
2	95.0
3	96.3
4	96.1
5	96.7
Среднее	95.9
S _r , %	0.76

“ГИНКГО БИЛОБА” на основе данного АФИ. Предложенная методика экспрессна, обладает удовлетворительными метрологическими характеристиками и может быть использована при контроле качества очистки. Степень извлечения сухого экстракта листьев гинкго билоба с поверхности фармацевтического оборудования составляет более 95 %.

9. European Pharmacopoeia. 8.5th edition. EP 8.5. GINKGO DRY EXTRACT, REFINED AND QUANTIFIED. – 2008. – (monograph 1827).
10. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for analysis of medicinal plants. Thieme Medical Publishers Inc., NY, 2007, 264 p.
11. Rohini R.M., Amit Kumar Das Determination of lupeol, β -sitosterol and quercetin from ethyl acetate extract of rhizophora mucronata bark by HPTLC technique. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2011, 4(1), 103-105.
12. Deore S.L., Nikole K., Baviskar B.A., Khadabadi S.S. Isolation and Quantitative Estimation of Quercetin in Lagenaria siceraria Fruit. *J Chromatograph Separat Techniq* 2013, 4, 191. doi:10.4172/2157-7064.1000191
13. Jain A., Lodhi S., Singhai A.K. Simultaneous estimation of quercetin and rutin in Tephrosia purpurea Pers by high performance thin-layer chromatography. *Asian J Tradit Med.* 2009, 4(3), 104-109.
14. Leela V., Saraswathy A. Quantification of Pharmacologically Active Markers Gallic Acid, Quercetin and Lupeol from Acacia Leucophloea Wild Flowers by HPTLC Method. *J Anal Bioanal Techniques.* 2013, 4(1), 160. doi:10.4172/2155-9872.1000160
15. Mythili T. and Ravindhran R. Determination of Quercetin by HPTLC Method in SesbaniaSesban (L.) Merr. Stem Extract. *IJAPBC.* 2013, 2(1), 113-119.
16. Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. TLC reagents & Detection Methods – Physical & Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents, I, Vol. 1a, Wiley, NY, 1990, p.11.