

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291336 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.17

(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

(51) Int. Cl. *G01N 30/04* (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)
A61K 36/09 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
B01D 15/12 (2006.01)

(54) АНАЛИТИЧЕСКИЙ СПОСОБ ДЛЯ ИСЛАНДСКОГО МХА

(31) P-201900253

(32) 2019.12.19

(33) SI

(86) PCT/EP2020/087249

(87) WO 2021/123327 2021.06.24

(71) Заявитель:

КРКА, Д.Д., НОВО МЕСТО (SI)

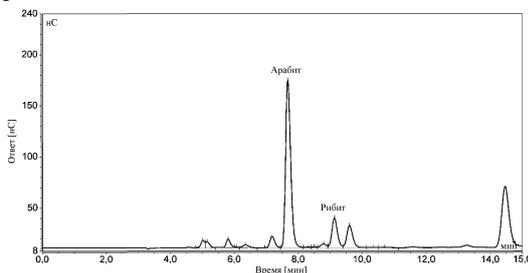
(72) Изобретатель:

Мрзликар Миха, Ковачич Симон (SI)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Описан аналитический способ количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате, где в качестве аналитического маркера используют рибит и/или арабит.



A1

202291336

202291336

A1

АНАЛИТИЧЕСКИЙ СПОСОБ ДЛЯ ИСЛАНДСКОГО МХА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к аналитическому способу количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Исландский мох (*Lichen islandicus*) – общепринятое название слоевища лишайника *Cetraria islandica* (L.) Archarius s.l.; *C. islandica* – это кустистый наземный лишайник из семейства Parmeliaceae, произрастающий в арктических и субарктических районах, в северной и восточной Европе, Сибири и Северной Америке, а также в средних и альпийских горах Германии, Северной Италии, Чехии, Словакии, Польши и России. Исландский мох содержит зеленую водоросль *Trebouxia*, которая также встречается в 75% лишайников. В лишайниках существует по меньшей мере три вида *Trebouxia* – *Trebouxia decolorans*, *Trebouxia erici* и *Trebouxia glomerata*. Однако их роль в углеводном обмене лишайников может быть схожей и может быть применима ко многим, если не ко всем из 10000 видов.

Зеленые водоросли продуцируют родоспецифические сахарные спирты, а именно рибит, сорбит или эритрит. Рибит (также известный как адонитол и адонит) представляет собой запасной пентозный спирт, синтезируемый во время фотосинтеза через пути ксилулозо-5-фосфата и пентозофосфата родами *Coccomyxa*, *Trentepohlia* и *Trebouxia*. Углерод в водоросли *Trebouxia* в основном фиксируется в рибит и в меньшей степени также в сахарозу и другие углеводные соединения. После синтеза в водорослях только рибит поступает в гриб, где он метаболизируется в энантиомер рибита, называемый арабитом (также известный как арабинит), и в меньшем количестве также в маннит. Многоатомные спирты в лишайниках являются осморегуляторами, стабилизаторами белков, служат в качестве депо углерода в стрессовых условиях.

Исландский мох может применяться в качестве травяного чая для питья или в форме растительной фармацевтической субстанции, включенной в растительный препарат для приема внутрь или нанесения на слизистую оболочку полости рта. Как следует из их давнего и традиционного применения, препараты исландского мха могут применяться в качестве мягчительного средства (успокаивающего средства) для лечения раздражения рта и горла и связанного с ним сухого кашля, а также для лечения временной потери аппетита.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с нормативными документами качество растительных лекарственных препаратов должно быть гарантировано и продемонстрировано в соответствии с существующими требованиями. Из-за специфической и сложной природы растительных препаратов маркеры могут позволить гарантировать и продемонстрировать надлежащее и стабильное качество этих препаратов. Согласно экспертному отчету Комитета по лекарственным препаратам растительного происхождения (https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-report/final-assessment-report-cetraria-islandica-1-acharius-sl-thallus_en.pdf) растительное сырье исландского мха не имеет компонентов с известной терапевтической активностью или активных маркеров. Оно состоит из следующих групп компонентов: полисахариды, лишайниковые кислоты, минералы и другие компоненты. Концентрация этих компонентов или их групп в растительной фармацевтической субстанции и растительном препарате может быть очень низкой; они могут быть нестабильными, трудно разделяемыми, могут взаимодействовать с вспомогательными веществами и, следовательно, могут быть непригодными для контроля качества и вызывают большие затруднения при количественном определении в соответствии с современной научной практикой.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что рибит и арабит – два вещества из многих компонентов исландского мха – могут применяться в аналитических целях в качестве подходящих аналитических маркеров для количественного определения, а также для идентификации растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате. Следовательно, рибит или арабит, или оба из них могут применяться для целей количественного и качественного анализа. Они обеспечивают важный аналитический инструмент для связи растительной фармацевтической субстанции с растительным препаратом. Рибит и арабит служат средствами расчета количества активного вещества (растительной фармацевтической субстанции) в готовом препарате (растительном препарате) с хорошей корреляцией между количеством рибита и арабита в растительной фармацевтической субстанции и количеством рибита и арабита в растительном препарате.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 представлена хроматограмма стандартного раствора рибита.

На фиг. 2 представлена хроматограмма стандартного раствора арабита.

На фиг. 3 представлена хроматограмма раствора образца растительной

фармацевтической субстанции исландского мха.

На рис. 4 представлена хроматограмма раствора образца сиропа из исландского мха (пример 2, состав А).

На фиг. 5 представлена хроматограмма раствора образца сахарной пастилки из исландского мха (пример 3, состав F).

На фиг. 6 представлена хроматограмма раствора образца не содержащей сахара пастилки из исландского мха (пример 3, состав С).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первым аспектом настоящего изобретения является аналитический способ количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате, где в качестве аналитического маркера используют рибит и/или арабит.

Термин «количественное определение» согласно настоящему изобретению относится к определению абсолютного или относительного содержания растительной фармацевтической субстанции в растительном препарате, которое может быть выражено посредством концентрации или массовой доли.

Термин «растительная фармацевтическая субстанция» согласно настоящему изобретению означает любую фармацевтическую субстанцию, полученную путем обработки растительного сырья исландского мха, такой как экстракция, дистилляция, отжим, фракционирование, очистка, концентрирование или ферментация. К ним относятся измельченное или порошкообразное растительное сырье, настойки, экстракты, эфирные масла, отжатые соки и обработанные вытяжки. Предпочтительно растительная фармацевтическая субстанция согласно настоящему изобретению представляет собой экстракт, более предпочтительно водный и/или водно-этанольный экстракт, и наиболее предпочтительно растительная фармацевтическая субстанция представляет собой водный экстракт.

Термин «растительный препарат» согласно настоящему изобретению означает любой препарат, содержащий растительное сырье исландского мха или растительную фармацевтическую субстанцию исландского мха. Растительный препарат может быть представлен в различных лекарственных формах, таких как отвары, травяные порошки, спиртосодержащие напитки, капсулы, таблетки, пастилки, сиропы, мази и кремы. Предпочтительно растительный препарат представляет собой пероральную лекарственную форму. Более предпочтительно растительный препарат согласно настоящему изобретению представляет собой сироп или твердую пероральную

лекарственную форму. Еще более предпочтительно твердая пероральная лекарственная форма представляет собой таблетку, капсулу или пастилку. Наиболее предпочтительно растительный препарат представляет собой сироп или пастилку.

Термин «растительное сырье» согласно настоящему изобретению означает цельный, измельченный или нарезанный исландский мох в необработанном, обычно высушенном виде, но иногда и в свежем виде.

Маркеры представляют собой химически определенные компоненты или группы компонентов растительного сырья, растительной фармацевтической субстанции или растительного препарата, которые представляют интерес для целей контроля, вне зависимости от того, обладают ли они какой-либо терапевтической активностью. Маркеры служат для расчета количества одного или более видов растительного сырья или растительной фармацевтической субстанции в растительном препарате, если маркеры были количественно определены в растительном сырье или растительной фармацевтической субстанции. Существует две категории маркеров: активные и аналитические. Активные маркеры представляют собой компоненты или группы компонентов, которые, как принято считать, способствуют терапевтической активности. Аналитические маркеры представляют собой компоненты или группы компонентов, которые служат для аналитических целей.

Аналитический способ согласно настоящему изобретению может представлять собой хроматографию, такую как газовая или жидкостная хроматография. Предпочтительно хроматография представляет собой жидкостную хроматографию, такую как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) ИЛИ высокоэффективная анионообменная хроматография (НРАЕ). Наиболее предпочтительным аналитическим способом является НРАЕ-хроматография.

Неподвижная фаза, используемая в НРАЕ-хроматографии согласно настоящему изобретению, может представлять собой анионообменную колонку, предпочтительно неподвижная фаза представляет собой колонку с сильным анионообменником, и наиболее предпочтительной неподвижной фазой является анионообменная колонка большой емкости на основе сополимера стирола и дивинилбензола.

Углеводы слабокислой природы, такие как сахарные спирты рибит и арабит, селективно разделяются на сильной анионообменной неподвижной фазе. Благодаря использованию сильной анионообменной неподвижной фазы нейтральные и катионные соединения элюируются в свободном объеме или близко к нему и, следовательно, не мешают интересующим нас анализам. После отделения рибита и/или арабита от других компонентов, таких как углеводы, проводится детектирование в соответствующей

системе детектирования.

Подвижная фаза, используемая в жидкостной хроматографии согласно настоящему изобретению, может быть органической или неорганической. Предпочтительно подвижная фаза представляет собой воду или водный раствор. Более предпочтительно подвижная фаза представляет собой щелочной водный раствор. Водный раствор может содержать ацетатные соли. Еще более предпочтительно подвижная фаза представляет собой водный раствор гидроксида щелочного металла. Наиболее предпочтительной подвижной фазой является водный раствор гидроксида натрия.

Аналитический способ согласно настоящему изобретению предпочтительно включает следующие стадии:

- (1) получение стандартного раствора рибита и/или арабита;
- (2) получение раствора образца растительной фармацевтической субстанции и/или раствора образца растительного препарата;
- (3) введение в хроматографическую систему по отдельности стандартного раствора рибита и/или арабита, раствора образца растительной фармацевтической субстанции и раствора образца растительного препарата;
- (4) интегрирование пиков рибита и/или арабита; и
- (5) определение количества растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате.

Детектор, используемый в жидкостной хроматографии согласно настоящему изобретению, может представлять собой рефрактометрический детектор или импульсный амперометрический детектор (PAD). Наиболее предпочтительным детектором является импульсный амперометрический детектор.

Наиболее предпочтительным аналитическим способом согласно настоящему изобретению является высокоэффективная анионообменная хроматография в сочетании с импульсным амперометрическим детектором (HPAE-PAD).

Другим аспектом настоящего изобретения является растительный препарат, где количество растительной фармацевтической субстанции в растительном препарате определено с помощью аналитического способа согласно настоящему изобретению.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ производства растительного препарата, полученного из растительной фармацевтической субстанции, где во время производства растительного препарата количество растительной фармацевтической субстанции в растительном препарате определяют с помощью аналитического способа согласно настоящему изобретению. Аналитический способ с использованием рибита и/или арабита в качестве аналитического маркера можно

применять в любой желаемый момент времени в течение всего процесса производства растительного препарата для количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате.

Еще одним аспектом настоящего изобретения также является применение аналитического способа согласно настоящему изобретению в способе производства растительного препарата.

Еще одним аспектом изобретения также является применение рибита и/или арабита в качестве аналитического маркера для растительной фармацевтической субстанции и/или растительного препарата исландского мха. Более конкретно, еще одним аспектом изобретения является применение рибита и/или арабита в качестве аналитического маркера для количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате. В качестве аналитических маркеров могут применяться рибит или арабит, или оба из них, в зависимости от вспомогательных веществ в растительном препарате и их возможного влияния на определение рибита или арабита.

В примерах детектирование осуществляется с помощью импульсного амперометрического детектирования (PAD). Импульсное амперометрическое детектирование является очень чувствительным, селективным и специфичным средством определения. Оно позволяет детектировать только соединения, содержащие окисляемые функциональные группы, при напряжении детектирования, которое специфично для представляющего интерес класса соединений и не требует какой-либо дериватизации до или после стадии разделения. С помощью PAD детектирование представляющих интерес аналитов (рибита и/или арабита) осуществляется путем измерения электрического тока, генерируемого при их окислении на поверхности золотого электрода. При PAD-детектировании обычно используется повторяющаяся последовательность нескольких потенциалов. В приведенных ниже примерах эта последовательность состоит из трех потенциалов. После стадии окисления, на которой интегрируется и регистрируется только часть импульса, выполняется стадия очистки, на которой осуществляется десорбция продуктов реакции окисления, которые могут оказывать негативное влияние на поверхность электрода. Ее осуществляют путем повышения потенциала для окисления поверхности электрода. В ходе этого процесса образуется слой оксида золота и продукты окисления углеводов десорбируются с электрода. На третьей и последней стадии поверхность электрода снова восстанавливается обратно до золота путем снижения электродного потенциала.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Определение содержания рибита и/или арабита в имеющейся в продаже растительной фармацевтической субстанции исландского мха в виде густого водного экстракта

Состав экстракта	КЭЛ (коэффициент экстракции лекарственного средства)
Водный экстракт исландского мха (цельного или нарезанного, высушенного слоевища <i>Cetraria islandica</i> (L.) Archarius s.l.)	16-18:1

Условия хроматографирования: колонка Metrosep Carb 2 (размеры колонки: 250 мм x 4,0 мм, размер частиц: 5,0 мкм); предколонка Metrosep Carb 2 Guard/4.0 (размеры колонки: 5 мм x 4,0 мм, размер частиц: 5,0 мкм). Также можно использовать другую эквивалентную колонку и/или предколонку, если продемонстрирована их пригодность для этой цели. Температура колонки: 40,0 °С, температура образца/стандартного раствора: комнатная температура. Подвижная фаза: градиентное элюирование. Подвижная фаза А: 180 мМ NaOH, подвижная фаза В: 700 мМ NaOH. Программа градиента: первая стадия – разделение: 0-15 мин: 100 % А, 0% В; вторая стадия – очищение колонки: 16-35 мин: 0 % А, 100 % В, третья стадия – уравнивание: 36-100 мин: 100 % А, 0 % В. Скорость потока 0,5 мл/мин.

Примечание: продолжительность стадии очистки колонки может быть увеличена в случае поздних пиков. Продолжительность стадии уравнивания может быть отрегулирована (увеличена или сокращена), чтобы обеспечить подходящую хроматографическую систему.

Детектирование: импульсное амперометрическое детектирование. Рабочий электрод: Au, электрод сравнения: Ag/AgCl. Последовательность импульсов:

Время [с]	Потенциал [В]	Интегрирование
0,00	0,1	ВЫКЛ
0,20	0,1	ВКЛ
0,40	0,1	ВЫКЛ
0,41	-2,0	ВЫКЛ

0,42	-2,0	ВЫКЛ
0,43	0,6	ВЫКЛ
0,44	-0,1	ВЫКЛ
0,50	-0,1	ВЫКЛ

Примечание: на протяжении всей аналитической процедуры используют очищенную воду для хроматографии. Описанные ниже аналитические методики для растительной фармацевтической субстанции и растительных препаратов основаны на методе внешней калибровки, однако растворы образцов также могут быть получены с помощью других средств калибровки, таких как калибровка методом стандартной добавки, но расчеты должны быть скорректированы соответствующим образом.

(1) Стандартный раствор рибита и/или арабита получают в воде с концентрацией приблизительно 0,5 мг/л рибита и приблизительно 3,0 мг/л арабита. Стандартный раствор(ы) получают в двух повторностях.

(2) Раствор образца получают путем точного взвешивания приблизительно 500 мг растительной фармацевтической субстанции исландского мха в подходящей колбе Эрленмейера и добавления приблизительно 100 мл воды. Образец полностью растворяют с помощью ультразвука в течение приблизительно 15-30 мин. При этом смесь несколько раз встряхивают. Раствор переносят в мерную колбу на 200 мл и колбу Эрленмейера несколько раз промывают водой для достижения количественного переноса раствора образца. Мерную колбу наполняют водой до нужного объема и хорошо перемешивают (раствор образца 1 = SaS1). 1,0 мл SaS1 переносят в мерную колбу на 50 мл и взвешивают аликвоту SaS1. Колбу наполняют водой до нужного объема и взвешивают полученный раствор (раствор образца 2 = SaS2). Концентрация SaS2 составляет приблизительно 50 мг/л.

(3) В уравновешенную хроматографическую систему вводят первый растворитель (вода, очищенная для хроматографии). Затем в уравновешенную хроматографическую систему три раза последовательно вводят стандартный раствор рибита и/или арабита и, используя пики рибита и/или арабита на полученных хроматограммах, рассчитывают относительное стандартное отклонение (RSD). RSD не должно превышать 3%.

(4) В уравновешенную хроматографическую систему однократно вводят второй стандартный раствор рибита и/или арабита и его/их площадь (или содержание) на хроматограмме не должны отличаться от средней площади пика (или содержания) первого стандартного раствора рибита и/или арабита более чем на 1,5%.

(5) В уравновешенную хроматографическую систему вводят раствор образца.

(6) Рассчитывают содержание рибита и/или арабита (в %) в растительной фармацевтической субстанции исландского мха по следующему уравнению:

$$\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times W_{SaS2} \times 200}{A_{SS} \times W_{SaS1, \text{аликвота}} \times W \times 1000} \times 100$$

где:

A_{SaS2} = площадь пика рибита на хроматограмме раствора образца

A_{SS} = средняя площадь пика рибита на хроматограммах стандартного раствора

C_{SS} = концентрация рибита в стандартном растворе [мг/л]

200 = объем раствора образца 1 [мл]

W = масса образца [мг]

W_{SaS2} = масса раствора образца 2 [мг]

$W_{SaS1, \text{аликвота}}$ = масса аликвоты раствора образца 1 [мг]

Содержание арабита (в %) может быть рассчитано так же, как и содержание рибита, только в этом случае учитываются площади пиков арабита и концентрация арабита в стандартном растворе.

Количественное определение рибита в растительной фармацевтической субстанции исландского мха в виде густого экстракта дало результат 0,8094%.

$$\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times W_{SaS2} \times 200}{A_{SS} \times W_{SaS1, \text{аликвота}} \times W \times 1000} \times 100$$

$$= \frac{5,972926 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 0,496980 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 49914,7 \text{ мг} \times 200 \text{ мл}}{7,256233 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 995,4 \text{ мг} \times 506,9 \text{ мг} \times 1000} \times 100 = 0,8094\%$$

Количественное определение арабита в растительной фармацевтической субстанции исландского мха в виде густого экстракта дало результат 5,0545%.

$$\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times W_{SaS2} \times 200}{A_{SS} \times W_{SaS1, \text{аликвота}} \times W \times 1000} \times 100$$

$$= \frac{30,196043 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 2,993760 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 49914,7 \text{ мг} \times 200 \text{ мл}}{35,385999 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 995,4 \text{ мг} \times 506,9 \text{ мг} \times 1000} \times 100 = 5,0545\%$$

Пример 2. Количественное определение растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате в виде сиропа

Состав сиропа

Составы А-С

Ингредиент	Количество [мг/мл]		
	А	В	С
Густой экстракт исландского мха	6,0	6,0	6,0
Фруктоза	532	532	532
Ксантановая камедь	1,0	2,0	2,0
Бензоат натрия	2,0	2,0	1,5
Моногидрат лимонной кислоты	0,4	0,4	0,4
Вкусоароматическая добавка лимон	2,0	2,0	2,0
Вода, очищенная	до 1 мл	до 1 мл	до 1 мл

Способ производства сиропа

Бензоат натрия растворяют в очищенной воде и нагревают раствор до 50-70 °С. При этой температуре добавляют густой экстракт исландского мха и гомогенно диспергируют. Затем дисперсию нагревают до 90-95 °С, выдерживают при этой температуре по меньшей мере 20 минут, а затем охлаждают до температуры 50-70 °С, при которой добавляют фруктозу и перемешивают до растворения. После добавления фруктозы дисперсию охлаждают до комнатной температуры. При комнатной температуре добавляют ксантановую камедь, лимонную кислоту и вкусоароматическую добавку и перемешивают до растворения. Сироп может быть отфильтрован для удаления твердых примесей перед тем, как перелить его в подходящие стеклянные бутылки.

Аналитический способ

(1) Условия хроматографирования такие же, как указано в примере 1.

(2) Получают раствор плацебо (холостой раствор) путем взвешивания приблизительно 500 мг плацебо (сироп без растительной фармацевтической субстанции) в мерную колбу на 50 мл. Плацебо растворяют в воде, колбу наполняют тем же растворителем до нужного объема и хорошо перемешивают.

(3) Получают исходный стандартный раствор рибита и/или арабита в воде. Рабочий стандартный раствор получают путем взвешивания приблизительно 500 мг плацебо в мерную колбу на 50 мл. Затем добавляют соответствующий объем исходного стандартного раствора рибита и/или арабита, смесь растворяют в воде и наполняют колбу тем же растворителем до нужного объема и хорошо перемешивают, получая раствор,

содержащий приблизительно 0,5 мг/л рибита и/или приблизительно 3,0 мг/л арабита и приблизительно 10000 мг/л плацебо. Стандартный раствор(ы) получают в двух повторностях.

(4) Раствор образца получают путем точного взвешивания приблизительно 500 мг растительного препарата (сиропа) в мерную колбу на 50 мл. Сироп растворяют в воде, колбу наполняют тем же растворителем до нужного объема и хорошо перемешивают. Концентрация раствора образца составляет приблизительно 10000 мг/л.

(5) В уравновешенную хроматографическую систему вводят первый раствор плацебо. Затем в уравновешенную хроматографическую систему три раза последовательно вводят стандартный раствор рибита и/или арабита и, используя пики рибита и/или арабита на полученных хроматограммах, рассчитывают относительное стандартное отклонение (RSD). RSD не должно превышать 3%.

(6) В уравновешенную хроматографическую систему однократно вводят второй стандартный раствор рибита и/или арабита и его площадь (или содержание) на хроматограмме не должны отличаться от средней площади пика (или содержания) первого стандартного раствора рибита и/или арабита более чем на 1,5%.

(7) В уравновешенную хроматографическую систему вводят раствор образца.

(8) Рассчитывают содержание рибита и/или арабита (в млн⁻¹) в растительном препарате (сиропе) по следующему уравнению:

$$\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times 50 \times 1 \cdot 10^6}{A_{SS} \times W \times 1000}$$

Рассчитывают содержание растительной фармацевтической субстанции исландского мха (выраженное в процентах от указанного количества) в растительном препарате (сиропе) по следующему уравнению:

$$\frac{\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times 50 \times \rho}{A_{SS} \times W}}{SA \times \frac{C_{HP}}{100}} \times 100$$

где:

A_{SaS} = площадь пика рибита на хроматограмме раствора образца растительного препарата

A_{SS} = средняя площадь пика рибита на хроматограммах стандартных растворов рибита

C_{SS} = концентрация рибита в стандартном растворе [мг/л]

50 = объем исходного раствора образца [мл]

W = масса образца [мг]

ρ = плотность растительного препарата [г/мл]

SA = заявленное количество растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате [мг/мл]

C_{HP} = концентрация рибита во входящей партии растительной фармацевтической субстанции исландского мха [%]

Содержание арабита может быть рассчитано так же, как и содержание рибита, только в этом случае учитываются площади пиков арабита и концентрация арабита в стандартном растворе.

Вспомогательные вещества в составе А не мешают ни пикам рибита, ни пикам арабита. Таким образом, один или оба аналитических маркера могут быть использованы для количественного определения, а также для идентификации растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате.

Количественное определение рибита в растительном препарате в виде сиропа, полученном из исландского мха, дало результат 41,1 млн⁻¹ (по первому уравнению), а определение арабита дало результат 259,1 млн⁻¹. При расчете с учетом количества рибита во входящей партии растительной фармацевтической субстанции исландского мха (густой экстракт) это составляет 101,6% (по второму уравнению) или 102,5% при расчете с учетом количества арабита во входящей партии.

Пример расчета содержания экстракта исландского мха для состава А (аналитический маркер: рибит) в сиропе:

$$\frac{A_{SAS} \times C_{SS} \times 50 \times 1 \cdot 10^6}{A_{SS} \times W \times 1000} = \frac{5,776557 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 0,498960 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 50 \text{ мл} \times 1 \cdot 10^6}{6,597629 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 531,4 \text{ мг} \times 1000}$$

$$= 41,1 \text{ млн}^{-1}$$

$$\frac{\frac{A_{SAS} \times C_{SS} \times 50 \times \rho}{A_{SS} \times W} \times 100}{SA \times \frac{C_{HP}}{100}}$$

$$= \frac{5,776557 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 0,498960 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 50 \text{ мл} \times 1,19995 \text{ г/мл}}{6,597629 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 531,4 \text{ мг}} \times 100$$

$$= \frac{6 \text{ мг/мл} \times \frac{0,809382\%}{100}}{100} \times 100$$

$$= 101,6\%$$

Пример расчета содержания экстракта исландского мха для состава А (аналитический маркер: арабит) в сиропе:

$$\frac{A_{Sas} \times C_{SS} \times 50 \times 1 \cdot 10^6}{A_{SS} \times W \times 1000} = \frac{15,759129 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 2,993760 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 50 \text{ мл} \times 1 \cdot 10^6}{18,076994 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 503,7 \text{ мг} \times 1000}$$

$$= 259,1 \text{ млн}^{-1}$$

$$\frac{\frac{A_{Sas} \times C_{SS} \times 50 \times \rho}{A_{SS} \times W}}{SA \times \frac{C_{HP}}{100}} \times 100$$

$$= \frac{15,759129 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 2,993760 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 50 \text{ мл} \times 1,19995 \text{ г/мл}}{18,076994 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 503,7 \text{ мг}} \times 100$$

$$= \frac{6 \text{ мг/мл} \times \frac{5,054452\%}{100}}{6 \text{ мг/мл} \times \frac{5,054452\%}{100}} \times 100$$

$$= 102,5\%$$

Применение рибита или арабита в качестве аналитических маркеров для определения содержания экстракта исландского мха в растительном препарате дает сопоставимые результаты в пределах возможной погрешности аналитического способа.

Пример 3. Количественное определение растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате в виде таблетки

Составы А-Н

Ингредиент	Количество [мг]							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Изомальт	2433	/	2438	/	2438	/	2458	/
Сахароза	/	1185	/	1187	/	1187	/	1185
Кукурузная крахмальная патока (сухое вещество)	/	1248	/	1251	/	1251	/	1248 1
Густой экстракт исландского мха	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Сукралоза	1,5	1,50	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Аскорбиновая кислота	25,0	25,0	/	/	/	/	/	/
Яблочная кислота	/	/	/	20,0	/	/	/	/
Лимонная кислота	/	/	20,0	/	/	20,0	/	/

Винная кислота	/	/	/	/	/	/	/	25,0
Молочная кислота	/	/	/	/	20,0	/	/	/
Краситель кармин 52% (Е120)	/	/	/	0,5	/	/	0,5	0,5
Краситель куркумин (Е100)	0,5	0,5	0,5	/	0,5	0,5	/	/
Вкусоароматическая добавка груша	5,0	5,0	5,0		5,0	5,0	/	/
Вкусоароматическая добавка земляника	/	/	/	5,0	/	/	5,0	5,0
Вкусоароматическая добавка клубника	/	/	/	/	/	/	/	/

Составы I-N

Ингредиент	Количество [мг]					
	I	J	K	L	M	N
Изомальт	/	2460	/	2458	/	/
Сахароза	1187	/	1198	/	1197	1187
Кукурузная крахмальная патока (сухое вещество)	1251	/	1262	/	1261	1251
Густой экстракт исландского мха	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Сукралоза	1,5	/	/	1,5	1,5	1,5
Аскорбиновая кислота	/	/	/	/	/	/
Яблочная кислота	/	/	/	/	/	/
Лимонная кислота	/	/	/	/	/	20,0
Винная кислота	/	/	/	/	/	/

Молочная кислота	20,0	/	/	/	/	/
Краситель кармин 52% (E120)	/	/	/	0,7	0,5	0,5
Краситель куркумин (E100)	0,5	0,5	0,5	/	/	/
Вкусоароматическая добавка груша	5,0	5,0	5,0	/	/	/
Вкусоароматическая добавка земляника	/	/	/	5,0	5,0	/
Вкусоароматическая добавка клубника	/	/	/	/	/	5,0

Способ производства пастилок

Сахарные пастилки изготавливают по специальной технологии на специальном оборудовании. Сахарозу, крахмальную патоку и сукралозу растворяют в очищенной воде, а затем уваривают и вакуумируют в камере вакуумирования для снижения содержания влаги. Одновременно с помощью устройства подачи добавляют экстракт исландского мха. Органическую кислоту, вкусоароматические добавки и красители растворяют в очищенной воде или безводном этаноле и добавляют по отдельности с помощью дозирующих насосов. Из расплавленной смеси формируют пастилки в формовочной машине для пастилок, и пастилки затвердевают в охлаждающем туннеле.

Не содержащие сахара пастилки изготавливают по специальной технологии на специальном оборудовании. Изомальт и сукралозу растворяют в очищенной воде, а затем уваривают и вакуумируют в камере вакуумирования для снижения содержания влаги. Одновременно с помощью устройства подачи пасты добавляют экстракт исландского мха. Органическую кислоту, вкусоароматические добавки и красители растворяют в очищенной воде или безводном этаноле и добавляют по отдельности с помощью дозирующих насосов. Из расплавленной смеси формируют пастилки в формовочной машине для пастилок, и пастилки затвердевают в охлаждающем туннеле.

Составы О-Т (пастилки с начинкой)

Ингредиент	Количество [мг]					
	О	Р	Q	R	S	T

Способ производства не содержащих сахара пастилок с начинкой

Пастилки с начинкой на основе изомальта изготавливают по специальной технологии на специальном оборудовании. Начинку получают путем растворения изомальта в очищенной воде и нагревания ее до 110 °С. Полученный изомальтовый сироп охлаждают до 80 °С. Густой экстракт исландского мха, сукралозу и вкусоароматические добавки добавляют в изомальтовый сироп при непрерывном перемешивании для получения начиночной массы. Начиночную массу непрерывно перемешивают и поддерживают при температуре приблизительно 65 °С. Для получения пастилок изомальт, органическую кислоту и сукралозу растворяют в очищенной воде, а затем уваривают и вакуумируют в камере вакуумирования для снижения содержания влаги. Вкусоароматические добавки и красители растворяют в очищенной воде или безводном этаноле и добавляют с помощью дозирующих насосов, а начинку добавляют отдельно с помощью специального насоса. Из пастилочной массы формируют пастилки с начинкой в формовочной машине для пастилок, и пастилки затвердевают в охлаждающем туннеле.

Аналитический способ

(1) Условия хроматографирования такие же, как указано в примере 1.

(2) Стандартный раствор рибита и/или арабита получают в воде с концентрацией приблизительно 0,5 мг/л рибита и приблизительно 3,0 арабита. Стандартный раствор(ы) получают в двух повторностях.

Примечание: при необходимости (для обеспечения подходящей хроматографической системы) стандартный раствор рибита и/или арабита может быть получен в виде плацебо (пастилки без растительной фармацевтической субстанции) (приблизительно 4000 мг/л плацебо в воде).

(3) Раствор образца получают путем взвешивания по меньшей мере 10 единиц пастилок и определения средней массы. Затем пастилки тонко измельчают и гомогенизируют на лабораторной мельнице. Приблизительно 200 мг гомогенизированного образца точно взвешивают в мерную колбу на 50 мл. Затем добавляют приблизительно 25 мл воды и растворяют образец с помощью ультразвука в течение приблизительно 15-30 мин. При этом смесь несколько раз встряхивают. В конце колбу наполняют до нужного объема водой и хорошо перемешивают. Концентрация раствора образца составляет приблизительно 4000 мг/л.

В качестве альтернативы раствор образца может быть получен по следующей методике: 10 единиц пастилок взвешивают в подходящей колбе Эрленмейера и добавляют приблизительно 300 мл воды. Образец полностью растворяют с помощью ультразвука в

течение приблизительно 15-30 мин. При этом смесь несколько раз встряхивают. Раствор переносят в мерную колбу на 500 мл и колбу Эрленмейера несколько раз промывают водой для достижения количественного переноса раствора образца. Мерную колбу наполняют водой до нужного объема и хорошо перемешивают (раствор образца 1 = SaS1). 4,0 мл SaS1 переносят в мерную колбу на 50 мл и взвешивают аликвоту SaS1. Колбу наполняют водой до нужного объема и взвешивают полученный раствор (раствор образца 2 = SaS2). Концентрация SaS2 составляет приблизительно 4000 мг/л. (Примечание: расчеты содержания должны быть скорректированы в соответствии с используемой методикой подготовки образца).

(4) В уравновешенную хроматографическую систему вводят первый раствор растворителя (вода, очищенная для хроматографии). Затем в уравновешенную хроматографическую систему три раза последовательно вводят стандартный раствор рибита и/или арабита и, используя пики рибита и/или арабита на полученных хроматограммах, рассчитывают относительное стандартное отклонение (RSD). RSD не должно превышать 3%.

(5) В уравновешенную хроматографическую систему однократно вводят второй стандартный раствор рибита и/или арабита и его площадь на хроматограмме (или содержание) не должны отличаться от средней площади пика (или содержания) первого стандартного раствора рибита и/или арабита более чем на 1,5%.

(6) В уравновешенную хроматографическую систему вводят раствор образца.

(7) Рассчитывают содержание рибита и/или арабита (в млн^{-1}) в растительном препарате (пастилках) по следующему уравнению:

$$\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times 50 \times 1 \cdot 10^6}{A_{SS} \times W \times 1000}$$

Рассчитывают содержание растительной фармацевтической субстанции исландского мха (выраженное в процентах от указанного количества) в растительном препарате (пастилках) по следующему уравнению:

$$\frac{\frac{A_{SaS} \times C_{SS} \times 50}{A_{SS} \times W \times 1000}}{\frac{SA}{AW} \times \frac{C_{HP}}{100}} \times 100$$

где:

A_{SaS} = площадь пика рибита на хроматограмме раствора образца

A_{SS} = средняя площадь пика рибита на хроматограммах стандартного раствора

C_{SS} = концентрация рибита в стандартном растворе [мг/л]

50 = объем исходного раствора образца [мл]

W = масса образца [мг]

SA = заявленное количество растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате в виде пастилок [мг]

AW = средняя масса пастилки [мг]

C_{HP} = концентрация рибита во входящей партии фармацевтической субстанции исландского мха [%]

Содержание арабита может быть рассчитано так же, как и содержание рибита, только в этом случае учитываются площади пиков арабита и концентрация арабита в стандартном растворе.

Вспомогательные вещества растительного препарата в виде сахарных пастилок состава F мешают пику арабита, в то время как вспомогательные вещества представленного состава C без сахара мешают пику рибита. Следовательно, только один аналитический маркер исландского мха может быть использован для количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в двух из представленных примеров растительных препаратов (C и F). Для состава F (сахарные пастилки) это рибит, а для состава C (не содержащие сахара пастилки) – арабит.

Количественное определение рибита в растительном препарате в виде сахарных пастилок (состав F), полученных из исландского мха, дало результат 113,9 млн⁻¹ (по первому уравнению), а определение арабита в не содержащих сахара пастилках (состав C) дало результат 734,2 млн⁻¹. При расчете с учетом количества рибита во входящей партии растительной фармацевтической субстанции исландского мха (густой экстракт) это составляет 100,5 % (по второму уравнению) для примера F и 103,8 % при расчете с учетом количества арабита во входящей партии для состава C.

Пример расчета содержания экстракта исландского мха (аналитический маркер: рибит) в сахарных пастилках (состав F):

$$\frac{A_{SAS} \times C_{SS} \times 50 \times 1 \cdot 10^6}{A_{SS} \times W \times 1000} = \frac{6,028414 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 0,500940 \frac{\text{МГ}}{\text{Л}} \times 50 \text{ мл} \times 1 \cdot 10^6}{6,590891 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 201,2 \text{ мг} \times 1000}$$

$$= 113,9 \text{ млн}^{-1}$$

$$\frac{\frac{A_{SAS} \times C_{SS} \times 50}{A_{SS} \times W \times 1000}}{\frac{SA}{AW} \times \frac{C_{HP}}{100}} \times 100 = \frac{6,028414 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 0,500940 \frac{\text{МГ}}{\text{Л}} \times 50 \text{ мл}}{6,590891 \text{ нС} \cdot \text{мин} \times 201,2 \text{ мг} \times 1000} \times 100 = 100,5\%$$

$$\frac{35 \text{ мг}}{2500 \text{ мг}} \times \frac{0,809382\%}{100}$$

Пример расчета содержания экстракта исландского мха (аналитический маркер: арабит) в не содержащих сахара пастилках (состав C):

$$\frac{A_{S_{aS}} \times C_{SS} \times 50 \times 1 \cdot 10^6}{A_{SS} \times W \times 1000} = \frac{36,199237 \cdot \text{мин} \times 2,993760 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 50 \text{ мл} \times 1 \cdot 10^6}{36,681182 \text{ нс} \cdot \text{мин} \times 201,2 \text{ мг} \times 1000}$$

$$= 734,2 \text{ млн}^{-1}$$

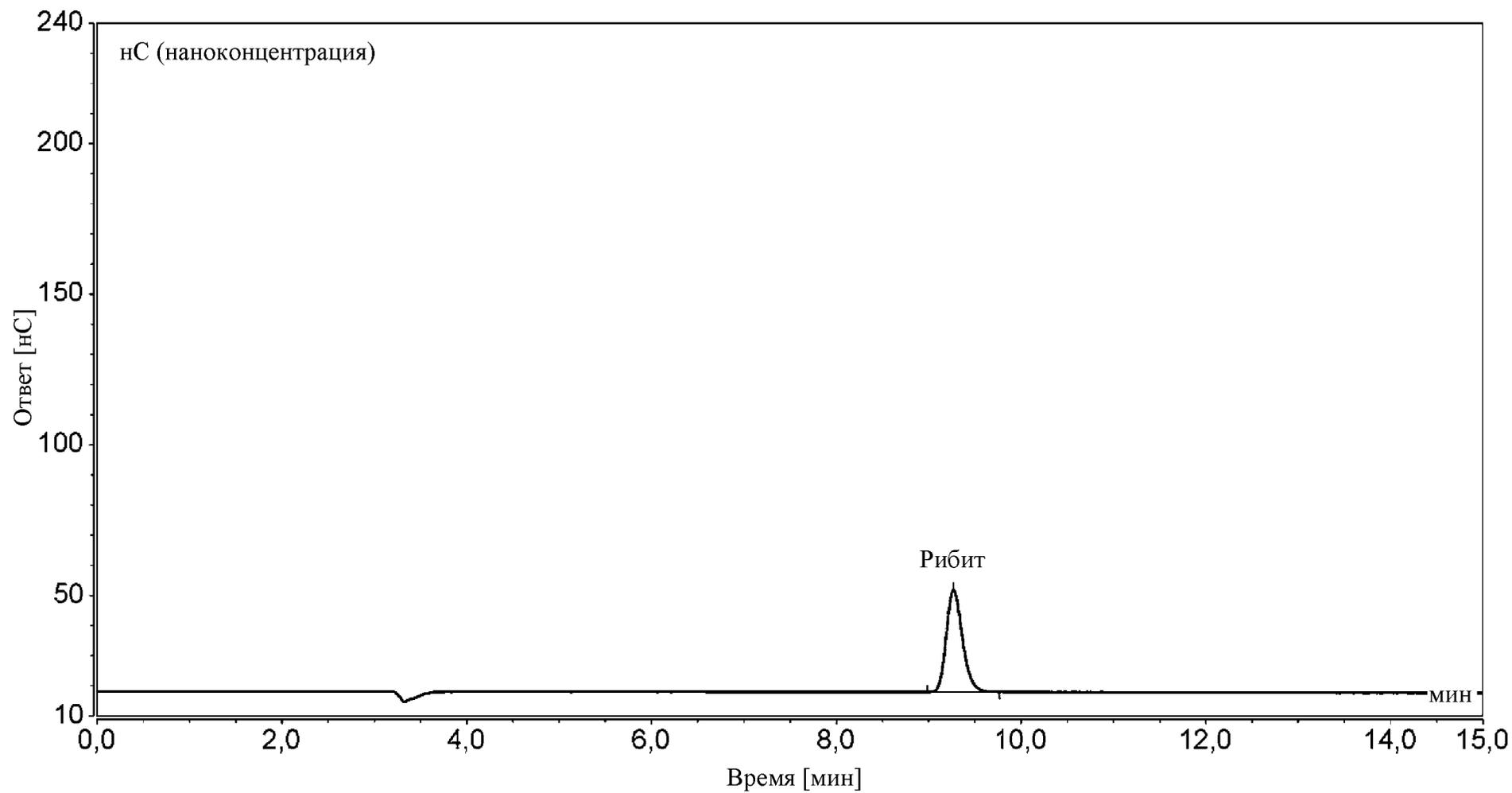
$$\frac{A_{S_{aS}} \times C_{SS} \times 50}{A_{SS} \times W \times 1000} \times 100 = \frac{36,199237 \text{ нс} \cdot \text{мин} \times 2,993760 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 50 \text{ мл}}{36,681182 \text{ нс} \cdot \text{мин} \times 201,2 \text{ мг} \times 1000} \times 100 = 103,8\%$$

$$\frac{SA}{AW} \times \frac{C_{HP}}{100} = \frac{35 \text{ мг}}{2500 \text{ мг}} \times \frac{5,054452\%}{100}$$

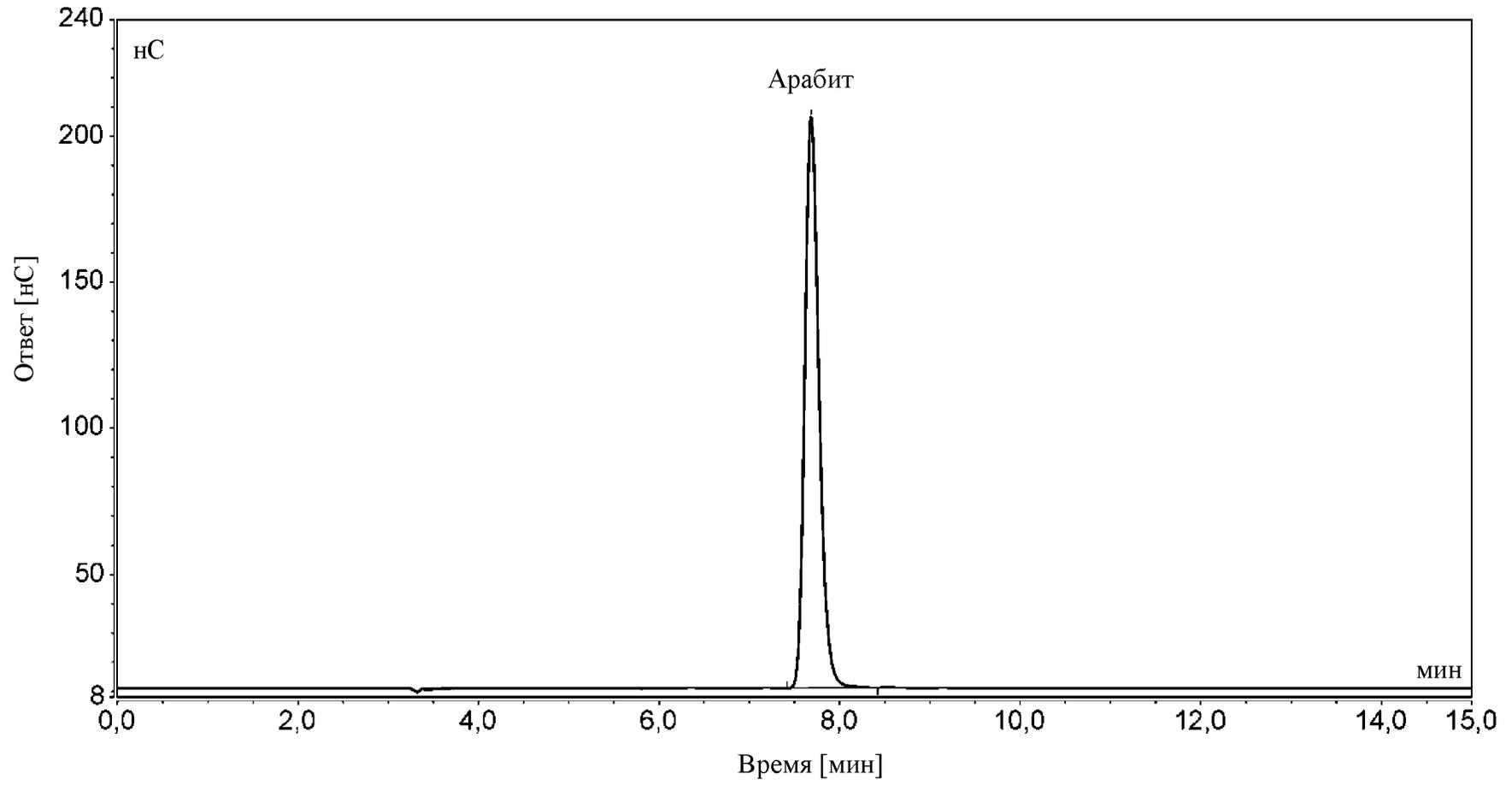
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аналитический способ количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате, где в качестве аналитического маркера используют рибит и/или арабит.
2. Аналитический способ по п. 1, который представляет собой хроматографию.
3. Аналитический способ по п. 2, где хроматография представляет собой жидкостную хроматографию.
4. Аналитический способ по п. 3, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию или высокоэффективную анионообменную хроматографию.
5. Аналитический способ по п. 4, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную анионообменную хроматографию.
6. Аналитический способ по п. 3, где используемый детектор представляет собой импульсный амперометрический детектор.
7. Аналитический способ по п. 3, где подвижная фаза, используемая в жидкостной хроматографии, представляет собой воду или водный раствор.
8. Аналитический способ по п. 1, который включает следующие стадии:
 - а) получение стандартного раствора рибита и/или арабита;
 - б) получение раствора образца растительной фармацевтической субстанции и/или раствора образца растительного препарата;
 - в) введение в хроматографическую систему по отдельности стандартного раствора рибита и/или арабита, раствора образца растительной фармацевтической субстанции и раствора образца растительного препарата;
 - г) интегрирование пиков рибита и/или арабита; и
 - е) определение количества растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате.
9. Применение аналитического способа по п. 1 в способе производства растительного препарата.
10. Растительный препарат, где количество растительной фармацевтической субстанции в растительном препарате определено с помощью аналитического способа по п. 1.
11. Растительный препарат по п. 10, который представляет собой пероральную лекарственную форму.
12. Растительный препарат по п. 11, где пероральная лекарственная форма представляет собой сироп или пастилку.

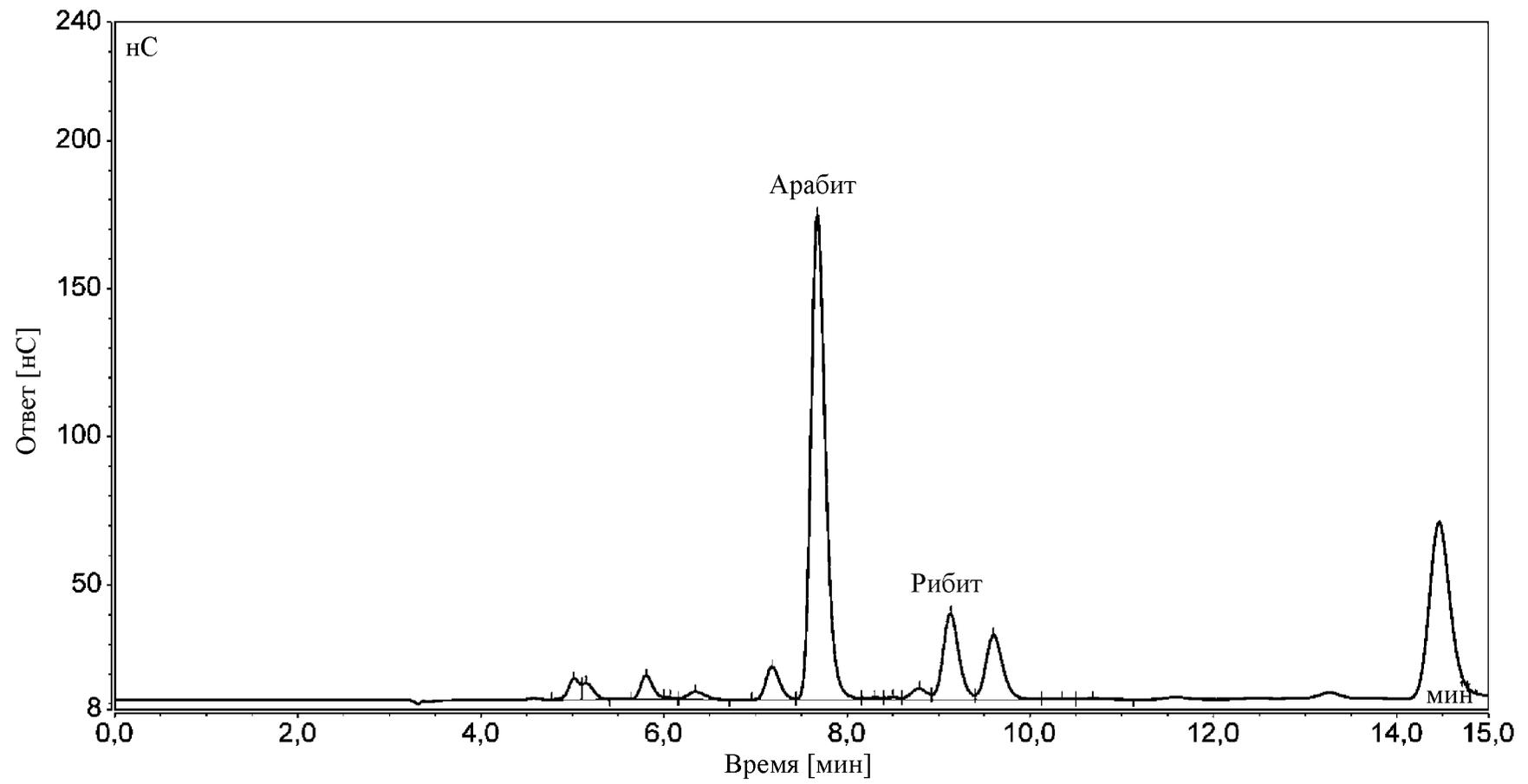
13. Растительный препарат по п. 10, где растительная фармацевтическая субстанция представляет собой экстракт.
14. Способ производства растительного препарата, полученного из растительной фармацевтической субстанции, где во время производства растительного препарата количество растительной фармацевтической субстанции в растительном препарате определяют с помощью аналитического способа по п. 1.
15. Применение рибита и/или арабита в качестве аналитического маркера для растительной фармацевтической субстанции и/или растительного препарата исландского мха.
16. Применение рибита и/или арабита в качестве аналитического маркера для количественного определения растительной фармацевтической субстанции исландского мха в растительном препарате.



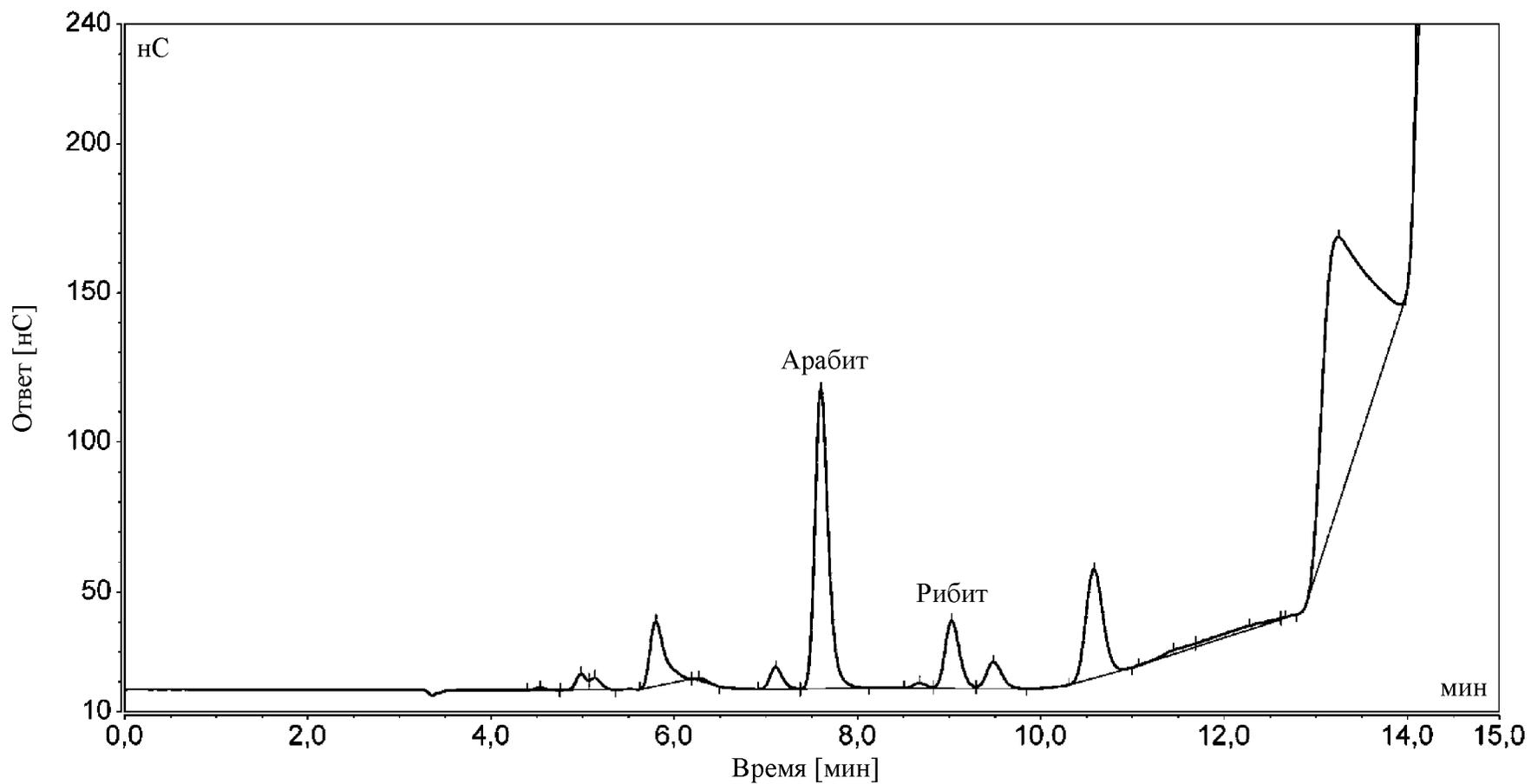
ФИГ. 1



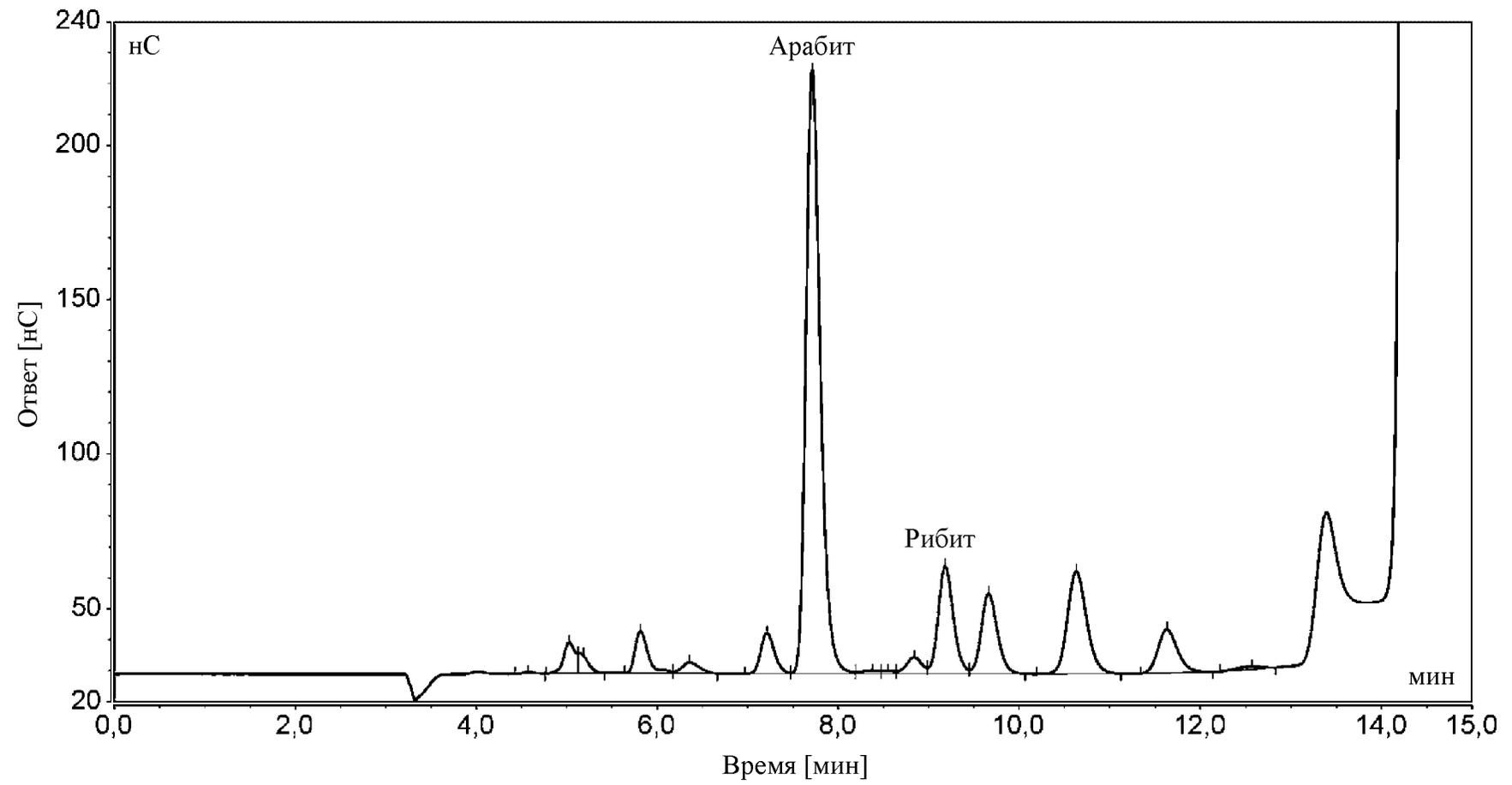
ФИГ. 2



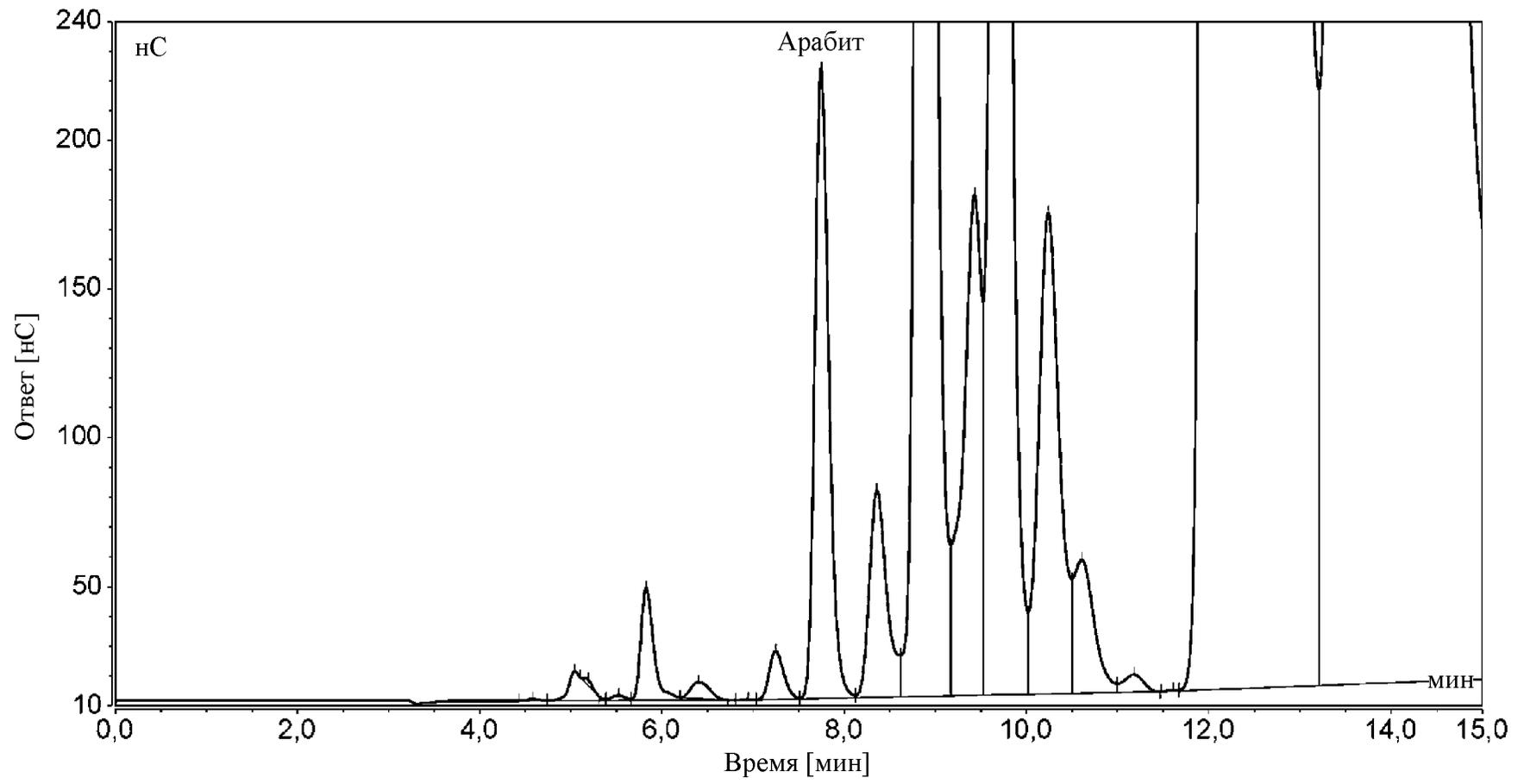
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6