

УДК 615.453.6:615.32:615.07:54.061.062

М. А. Асланян¹, Л. А. Бобрицкая¹, Е. С. Назарова²,
Н. В. Попова¹, Т. В. Зборовская¹

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

²Государственный научный центр лекарственных средств
и изделий медицинского назначения, г. Харьков

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ТАБЛЕТОК ЛАВАФЛАМ

Разработана методика количественного определения фламина, как суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид, с использованием метода абсорбционной спектрофотометрии в видимой области в комбинированном препарате. Проведенные валидационные исследования с использованием критериев приемлемости для допусков содержания + 5 %, подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность и диапазон применения предложенной методики. Апробирована методика определения идентификации флавоноидов фламина с использованием метода тонкослойных хроматографии. Составлена спецификация для контроля качества препарата Лавафлам в виде таблеток.

Ключевые слова: фламин, лавандовое масло, таблетки.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время комбинированные лекарственные препараты занимают ведущее место в номенклатуре ряда фармакотерапевтических средств, в том числе и для лечения заболеваний печени и желчевыводящих путей, требующих комплексного лечения [1]. Среди препаратов для лечения данных нарушений особое место занимают желчегонные препараты. По данным центра медицинской статистики Минздрава Украины, количество таких больных постоянно увеличивается, за 10 лет прирост распространенности составляет 97,5 % [4].

Для лечения желчекаменной болезни нами разработан оригинальный комбинированный препарат «Лавафлам», содержащий в качестве активных компонентов фламин (0,05 г) и лавандовое масло (0,02 г). Фармакологические исследования показали, что растительная субстанция фламин в сочетании с лавандовым маслом дополняет схему комплексного лечения заболеваний печени и желчевыводящих путей [9].

АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

В литературе описан способ количественного определения компонентов фламина методом жидкостной хроматографии (ЖХ) с расчетом по калибровочному графику, который характеризуется тем, что с целью повышения точности определения за счет увеличения степени разделения компонентов, в исследуемый раствор дополнительно вводят внутренний стандарт — салициловую кислоту и хроматографическое разделение ведут последовательно в двух системах растворителей: 1 система — вода : ацетонитрил : уксусная кислота : тетрагидрофуран (71,5 : 20 : 5 : 3,5), 2 система — вода : ацетонитрил : уксусная кислота (12 : 7 : 1) [2]. Данный способ является дорогостоящим и отличается высокой трудоемкостью.

Авторами из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.) выделены и идентифицированы изосалипурпозид, как доминирующий флавоноид, а также салипурпозид, 5,7-дигидроксифталид и 5-метокси-7-гидроксифталид. Разработана методика количественного определения содержания изосалипурпозида

в цветках бессмертника песчаного и таблетках Фламин, методом (ЖХ) при аналитической длине волны 360 нм с использованием стационарной фазы «Диасорб С-16», подвижной фазы – ацетонитрил : вода (25:75) с добавлением 1 % ледяной уксусной кислоты [10, 11].

Ранее разработана методика количественного определения фламина, как суммы флавоноидов, в пересчете на изосалипурпозид в комбинированном препарате, содержащем в качестве действующих веществ орнидазол и фламин с использованием метода абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях. При этом использован удельный показатель поглощения изосалипурпозид при длине волны 370 нм, так как в предложенных капсулах содержится орнидазол, который также поглощает при длине волны близкой к 315 нм [3].

ФОРМУЛИРОВАНИЕ ЦЕЛЕЙ СТАТЬИ

Целью работы — разработка и стандартизация методов контроля качества препарата «Лавафлам» в соответствии с требованиями, предъявляемыми Государственной фармакопеей Украины (ГФУ) [5, 6, 7] к твердым лекарственным формам в виде таблеток.

ИЗЛОЖЕНИЕ ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА

Объектом исследования был «Лавафлам», таблетки – оригинальный комбинированный препарат, содержащий в качестве действующих веществ фламин и лавандовое масло.

Аналитические исследования проводили методом абсорбционной спектрофотометрии в видимой области на спектрофотометре UV-VIS HP 8453 фирмы «Hewlett Packard» (США) и методом тонкослойной хроматографии. В работе использовали стандартный образец (СО) изосалипурпозид для приготовления раствора сравнения.

В результате проведенных исследований разработаны методики количественного определения и идентификации фламина как суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид с использованием метода абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях и метода тонкослойной хроматографии.

При количественном определении в цветках бессмертника песчаного [8] и в субстанции фламина расчет суммы флавоноидов проводят используя собственное поглощение СО изосалипурпозид или удельный показатель поглощения СО изосалипурпозид в 96 % спирте при длине волны 315 нм, который равен 260, поэтому нами так же использован такой подход при разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в комбинированном препарате.

Методика количественного определения суммы флавоноидов

Испытуемый раствор. Около 0,60 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 70 мл 96 % спирта, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 5 мин, доводят объем раствора тем самым растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», отбрасывая первые 15 мл фильтра. 2,0 мл полученного раствора доводят 96 % спиртом до объема 50,0 мл и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 315 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве компенсационного раствор 96 % спирт.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид (X), в одной таблетке, в миллиграммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 50 \times b}{E_{1cm}^{1\%} \times m \times 2 \times 100} = \frac{A \times 25 \times b}{E_{1cm}^{1\%} \times m},$$

где A_1 — оптическая плотность испытуемого раствора; $E_{1cm}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения изосалипурпозид в 96 % спирте при длине волны 315 нм — 260; m — масса навески препарата, г; b — средняя масса таблетки, мг.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид, в одной таблетке, должно быть $\pm 5\%$ от номинального содержания.

Типичные УФ-спектры поглощения испытуемого раствора, раствора субстанции фламина, раствора СО изосалипурпозид, раствора лавандового масла и раствора «плацебо», полученные при проведении теста «Количественное определение», приведены на рис. 1.

Из рис. 1 видно, что УФ-спектры поглощения раствора лавандового масла (4) и раствора «плацебо» (5), не имеют поглощения при длинах волн от 250 нм до 450 нм и не будут влиять на количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид при длине волны 315 нм, тем самым подтверждая специфичность методики.

Проведенная валидация методики подтвердила ее пригодность и соответствие критериям приемлемости. Данными по валидации (табл. 1) подтверждено, что методика количественного определения суммы флавоноидов позволяет проводить контроль препарата методом абсорбционной спектрофотометрии в видимой области в необходимом диапазоне, с достаточной специфичностью, правильностью и сходимостью. Валидационные характеристики свидетельствуют о корректности методики количественного определения при допусках для действующего вещества $\pm 5\%$.

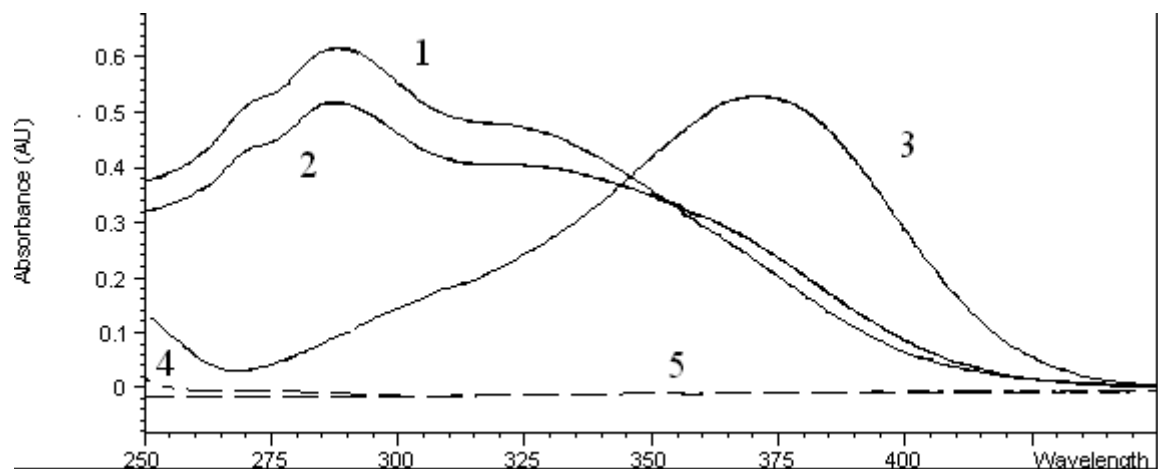


Рис. 1. УФ-спектры, полученные при разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид в препарате «Лавафлам», таблетки: 1 — испытуемого раствора препарата «Лавафлам»; 2 — раствора Фламина; 3 — раствора СО изосалипурпозид; 4 — раствора лавандового масла; 5 — раствора «плацебо»

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ И ИХ СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ

№ модельного раствора	Введено в % к концентрации раствора сравнения (X _i = C _i /C _{ст} , %)	Среднее значение оптической плотности (A _i) (A _{ст} = 0,205)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (Y _i = A _i /A _{ст} , %)	Найдено в % к введенному (Z _i = Y _i /X _i , %)
1	80,08	0,164	80,00	99,90
2	85,08	0,174	84,88	99,76
3	90,09	0,185	90,24	100,17
4	95,09	0,197	96,09	101,05
5	100,10	0,204	99,51	99,41
6	105,10	0,215	104,88	99,79
7	110,11	0,225	109,76	99,68
8	115,11	0,236	115,12	100,01
9	120,12	0,247	120,49	100,31
Среднее, Z _{ср} , %				100,01
Относительное стандартное отклонение, RSD _z , % $RSD_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \cdot \frac{100}{\bar{Z}}$				0,47
Относительный доверительный интервал, Δ% = t(95%, n-1) × RSD _z = 1,860 × RSD _z , %				0,88
Критическое значение для сходимости результатов Δ _{кр} , % (границная неопределенность)				1,60
Систематическая погрешность δ = Z _{ср} - 100				0,01
Критерий незначимости систематической ошибки Статистическая незначимость: $\delta\% \leq \Delta_{\bar{Z}} = \frac{\Delta_{\bar{Z}}}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_{\bar{Z}}}{3} = 0,88/3 = 0,29 \text{ (} 0,01 < 0,29 \text{)}$ если не выполняется требование к критерию 1), то: 2) Практическая незначимость: $\delta\% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51 \text{ \% (} 0,01 < 0,51 \text{)}$				Выполняется Выполняется
Общий вывод о точности методики				Корректна

Приведенная линейная зависимость оптической плотности от концентрации изосалипурпозидов в нормализованных координатах (рис. 2) свидетельствует о высоком значении коэффициента корреляции $r = 0,99943$, которое удовлетворяет требованиям критерия приемлемости ($r = 0,9981$) и подтверждает линейность зависимости между взятым («истинным») и найденным количеством суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид в области от 80 до 120 % относительно их номинального количества в препарате. Таким образом установлено, что требования к параметрам линейной зависимости (a , r) выполняются, то есть линейность методики определения суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид подтверждается во всем диапазоне концентраций (80-120 %).

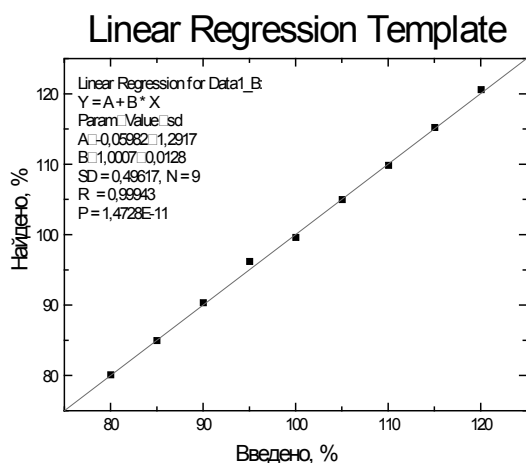


Рис. 2. Линейная зависимость оптической плотности от концентрации изосалипурпозидов в нормализованных координатах

Для идентификации флавоноидов в таблетках использовали метод тонкослойной хроматографии с использованием системы растворителей 2-пропанол : хлороформ : уксусная кислота ледяная (15 : 15 : 0,5) и проявителя 10 % водно-спиртового раствора натрия гидроксида. В результате проведенных исследований на хроматограмме испытуемого раствора обнаружена зона желтого цвета на уровне зоны изосалипурпозидов на хроматограмме раствора сравнения с R_f около 0,7, а так же обнаружена зона желтого цвета с R_f около 0,9 и зона желтого цвета на старте (рис. 3), что подтверждает идентификацию флавоноидов в препарате.

Разработана методика количественного определения и идентификации лавандового масла с использованием метода газовой хроматографии. Проведенные валидационные исследова-

ния с использованием критериев приемлемости для допусков содержания ± 10 %, подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность и диапазон применения предложенной методики.

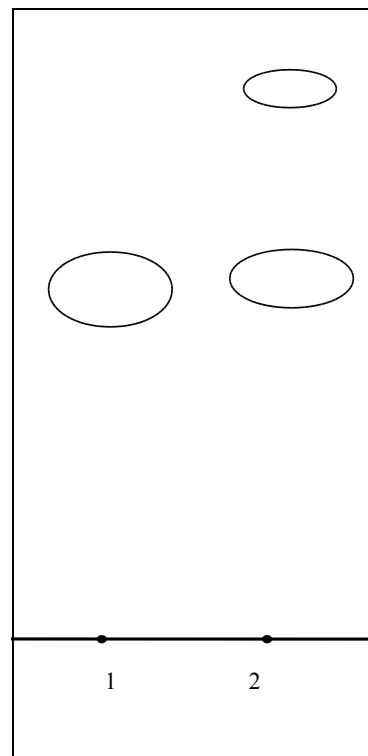


Рис. 3. Хроматограмма для определения идентификации флавоноидов в препарате «Лавафлам»: 1 – раствор СО изосалипурпозидов; 2 – испытуемого раствора препарата «Лавафлам»

Фармако-технологические испытания проводили в соответствии с требованиями общих статей ГФУ.

В результате проведенных исследований составлена спецификация, представленная в таблице 2.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ПОИСКОВ

Разработана методика количественного определения фламина, как суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид, для проведения теста «Количественное определение» в комбинированном препарате «Лавафлам», таблетки с использованием метода абсорбционной спектрофотометрии в видимой области.

Валидационные исследования подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность и диапазон применения предложенной методики.

Таблиця 2

СПЕЦИФИКАЦІЯ ПРЕПАРАТА «ЛАВАФЛАМ», ТАБЛЕТКИ

Показатели качества	Допустимые нормы	Методы контроля
Описание	Таблетки желтого или желтого с буроватым оттенком цвета, с вкраплениями, со специфическим запахом, плоскоцилиндрической формы с фаской и риской.	Визуально
Идентификация Флавоноиды	Окраска в красный цвет	Цветная реакция на флавоноиды
Изосалипурпозид	На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона желтого цвета на уровне зоны изосалипурпозиды на хроматограмме раствора сравнения	ГФУ, 2.2.27 (метод тонкослойной хроматографии)
Лавандовое масло	На хроматограммах испытуемого раствора, полученных в разделе «Количественное определение. Лавандовое масло», время удерживания основных пиков линалола и линалина ацетата должно совпадать со временем содержания этих пиков на хроматограмме раствора сравнения.	ГФУ, 2.2.28, 2.2.46 (метод газовой хроматографии)
Средняя масса	От 570,0 до 630,0 мг (600,0 мг \pm 5 %)	ГФУ, ст. «Таблетки» N
Однородность массы	Отклонение в массе отдельных таблеток допускается в пределах \pm 7,5 % от средней массы. Только две массы из 20 могут иметь отклонения от средней массы более 7,5 %, но не более чем в два раза	ГФУ, 2.9.5
Однородность дозированных единиц	Соответствует требованиям ГФУ, 2.9.40	ГФУ, 2.9.40 (расчетно-весовой метод)
Распадаемость	Не более 15 мин	ГФУ, 2.9.1 с. 335
Микробиологическая чистота	Общее число аэробных микроорганизмов (ТАМС) - критерий приемлемости: 10^3 КУО/г. Общее число дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС) - критерий приемлемости: 10^2 КУО/г. Escherichia coli: отсутствие в 1 г.	ГФУ, 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4
Количественное определение Сумма флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид	В 1 таблетке: От 31,0 до 39,0 мг	ГФУ, 2.2.25 (метод абсорбционной спектрофотометрии)
Лавандовое масло	От 18,0 до 22,0 мг	ГФУ, 2.2.29 (метод газовой хроматографии)

Апробирована методика определения идентификации флавоноидов фламина с использованием метода тонкослойной хроматографии.

Составлена спецификация для контроля качества препарата в таблетках «Лавафлам».

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

- Аллохол: 50 лет успешного применения, еженедельник Аптека № 20 (941), 5 (2014): режим доступа <http://www.apteka.ua/article/291944>
- А.с. 1334077 СССР, МКИ³ G 01 N 35/15. Способ количественного определения компонентов фламина / Н. А. Тюкавкина, В.Е. Ручкин, Ю.А. Колесник, И.А. Руленко, В.П. Георгиевский (СССР). — 3981756/28-14; Заявл. 26.11.85; Опубл. 30.08.87, Бюл. № 32. — 6 с.
- Бобрицкая Л.А. Оценка качества капсул с фламином и орнидазолом / Л. А. Бобрицкая, Н. В. Попова, Е. А. Рубан // Фармация, — 2013. — № 5. — С. 20-22
- Бобрицкая Л. А. Тенденции распространенности желчекаменной болезни среди населения Украины / Л. А. Бобрицкая, М. А. Аракелян // Менеджмент та маркетинг у складі сучасної економіки, науки, освіти, практики: матеріали II міжн. наук.-практ. internet-конф. (м. Харків, 27-28 березня 2014 р.). — Х.: НфаУ, 2014. — С. 255-258.
- Государственная Фармакопея Украины / Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр» (ГП «НЭФЦ»). — 1-е изд. — Харьков: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
- Государственная Фармакопея Украины / ГП «НЭФЦ». — 1-е изд. — Дополнение 2. — Х. : ГП «НЭФЦ», 2008. — 620 с.
- Государственная Фармакопея Украины / Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». — 1-е изд. — Дополнение 4. — Х. : ГП «УНФЦКЛС», 2011. — 540 с.
- Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное расти-

- тельное сырье. — 11-е изд., доп. — М. : Медицина, 1989. — С. 244-246.
9. Звіт про науково-дослідну роботу «Фармакологічне вивчення гепатозахисної активності таблеток «Лавофлам» / НФаУ; наук. кер. Дроговоз С. М.; викон.: Кононенко А.В. та ін. — Х., 2015. — 25 с.
 10. Куркина А. В. Исследование компонентного состава цветков *HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) MOENCH. А.В. Куркина // Химия растительного сырья. — 2011. — № 2. — С. 113–116.
 11. Куркина А. В. Перспективы использования высокоэффективной жидкостной хроматографии для стандартизации сырья и препаратов бессмертника песчаного / А. В. Куркина, В. М. Рыжов, Е. В. Авдеева // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2011. — Том 13, № 1(8), — С. 2015-2020.

УДК615.453.6:615.32:615.07:54.061.062

М. А. Асланян, Л. А. Бобрицька, Е. С. Назарова, Н. В. Попова, Т. В. Зборовська

РОЗРОБКА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТАБЛЕТОК «ЛАВАФЛАМ»

Розроблено методику кількісного визначення флавіну, як суми флавоноїдів у перерахунку на ізосаліпурпозид, з використанням методу абсорбційної спектрофотометрії у видимій області в комбінованому препараті. Проведено валідаційні дослідження з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 5\%$, підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність і діапазон застосування запропонованої методики. Апробовано методику визначення ідентифікації флавоноїдів флавіну з використанням методу тонкошарової хроматографії. Складена специфікація для контролю якості препарату «Лавофлам» у вигляді таблеток.

Ключові слова: флавін, лавандова олія, таблетки.

УДК615.453.6:615.32:615.07:54.061.062

М. А. Aslanian, L. A. Bobrytskaya, E. S. Nazarova, N. V. Popova, T. V. Zborovska

THE DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS OF LAVAFLAM

The method of quantitative determination flaminin as the amount of flavonoids in terms izosalipurpozid, using the method of absorption spectrophotometry in the visible region in a combined formulation. Conducted validation study using eligibility criteria for admissions content of $\pm 5\%$, confirming the specificity, linearity, precision (convergence), the accuracy and range of application of the proposed methodology. Approved the methods of determining the identification of flavonoids flaminin using the method of thin-layer chromatography. Compiled specification for quality control Lavaflam drug in tablets form.

Key words: flaminin, lavender oil, tablets.

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4

Тел: (0572) 67-88-52

E-mail: milenka41187@mail.ru

Надійшла до редакції:

23.07.2015 р.