

(Medvedev Y., Perederyaev O., Arzamashev A.P., Eller K.I., Prokofieva V.I. Determination of hydroxycinnamic acid in medicinal plant raw materials and objects of plant origin. *Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmachevicheskoy khimii*. 2010; 3: 25–31. (in Russian))

9. Farah A., Dodadgelo C.M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 2006; 18(1): 23–26.

10. Clifford M.N., Knight S., Surucu B., Kuhnert N. Characterization by LC-MSn of Four New Classes of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans: Dimethoxycinnamoylquinic Acids, Diferuloylquinic Acids, Caffeoyldimethoxycinnamoyl quinic Acids, and Feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 2006; Vol. 54: 1957–1969.

11. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MS Identification of Chlorogenic Acids M.N. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 2900–2911.

12. Rivelli D.P., Ropke C.D., Silva V.V., Miranda D.V., Almeida R.L., Sawada T.C.H., Barros S.B.M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous

extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH• reduction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 43: 2, abr./jun.

13. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств (под ред. В.В. Береговых). М.: Литтерра, 2008. 132.

(Validation of analytical methods for drug manufacturers: Typical manual of enterprise producing of drugs. (edited V.V. Beregovykh). Moscow: Litterra, 2008. 132. 5. Tsvet.vkl.: (Quality Assurance). (in Russian))

14. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. М.: Спорт и культура. 2000, 2007: 192. (Manual for pharmaceutical industry (Methodic recommendations). M.: The publishing house of «Sport and Culture – 2000», 2007: 192. (in Russian))

Поступила 30 октября 2013 г.

DETERMINATION OF A PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN RAW ILEX PARAGUARIENSIS MATERIALS

Professor G.V. Ramenskaya¹, PhD; E.A. Rodionova¹; O.Yu. Shchepochkina¹, PhD; Yu.V. Medvedev², PhD; I.E. Shokhin², PhD; I.B. Kadenatsi², MD; L.V. Shustova²; L.A. Pavlova², PhD

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow

²Research Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow

SUMMARY

The investigators studied 7 samples of raw plant materials containing methylxanthines (caffeine, theobromine, and theophylline), chlorogenic acid and its isomers 4-O-caffeoylquinic (cryptochlorogenic) and 5-O-caffeoylquinic (neochlorogenic) acid: 2 samples of *Ilex paraguariensis* leaves (Paraguay tea) and 2 samples of Ku-Ding tea (based on the Chinese variety of *Ilex latifolia* and privet (*Ligustrum*)), 1 sample of green tea, 1 sample of black tea, and 1 sample of fried coffee beans. Optimal extraction conditions were selected and a procedure was developed to determine biologically active substances by high performance liquid chromatography using UV detection. The procedure was validated by the following indicators: specificity, linearity, accuracy, and precision. The developed procedure may be recommended for the analysis of the raw materials and preparations of *Ilex paraguariensis*.

Key words: *Ilex paraguariensis*, Paraguay tea, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., methylxanthines, chlorogenic acid, high performance liquid chromatography.

© Коллектив авторов, 2014
УДК 615.281:615.453.4].07

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА МЕРАФЛАМ В КАПСУЛАХ

Л.А. Бобрицкая^{1*}, канд. фарм. наук, Е.С. Назарова², канд. фарм. наук,
Н.В. Попова¹, докт. фарм. наук, Е.А. Рубан¹, докт. фарм. наук

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53, Украина

²Государственный научный центр лекарственных средств и изделий медицинского назначения,
г. Харьков, ул. Астрономическая, 33, Украина

E-mail: *loridana2009@mail.ru

Для комбинированного лекарственного препарата в форме капсул с фламином и орнидазолом «Мерафлам» предложена методика количественного определения орнидазола для проведения тестов «Количественное определение», «Растворение» и «Идентификация» методом жидкостной хроматографии. Была осуществлена валидация методики по основным валидационным характеристикам. Составлена спецификация для контроля качества препарата «Мерафлам».

Ключевые слова: орнидазол, фламин, капсулы, стандартизация

Тенденция к росту ассоциированных инфекционно-воспалительных заболеваний (микст-инфекций) человека послужила стимулом для создания оригинального лекарственного препарата «Мерафлам» в капсулах, представляющего комбинацию фламينا с орнидазолом [2]. Микробиологические и фармакологические исследования показали, что растительная субстанция фламин в сочетании с орнидазолом потенцирует активность

препаратов из группы 5–НИМЗ и расширяет спектр их антибактериального действия для аэробных бактерий и грибов за счет собственных антибактериальных свойств и синергизма. Терапевтическая доза орнидазола 300 мг в составе капсул способствует лучшей переносимости и минимизации побочных эффектов препарата [1].

Цель работы – разработка и стандартизация методов контроля качества препарата «Мерафлам» в капсулах, согласно требованиям Государственной фармакопеи Украины (ГФУ) [3–5] к твердым лекарственным формам в виде капсул.

Экспериментальная часть

Объект исследования – оригинальный комбинированный препарат в капсулах «Мерафлам», содержащий в качестве действующих веществ фламин и орнидазол.

Аналитические исследования проводили методом абсорбционной спектрофотометрии в видимой области на спектрофотометре «Evolution 60S» методом жидкостной хроматографии на хроматографе «Waters 2487» и методом тонкослойной хроматогра-

фии. В работе использовали стандартный образец (СО) орнидазола для приготовления раствора сравнения.

В результате проведенных исследований разработаны методики количественного определения и идентификации орнидазола, а также проведения теста «Растворение» с использованием метода жидкостной хроматографии. Хроматографирование проводили на жидкостном хроматографе с УФ-детектором при следующих условиях: колонка C18 размером 4,6×250 мм, заполненная октадецилсилильным силикагелем, с размером частиц 5 мкм; подвижная фаза: метиловый спирт – вода (20:80), доведенная кислотой фосфорной до pH = 4,0; скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин; температура колонки – 25°C; детектирование при длине волны 310 нм.

Доказательство пригодности условий хроматографического определения в препарате обеспечивается введением в методику теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Хроматографическая система считается пригодной, если эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ С УЧЕТОМ ИХ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРНИДАЗОЛА

№ модельного раствора	Введено в % к концентрации раствора сравнения ($X_i=C_i/C_{st}$, %)	Среднее площади пика (S_i) ($S_{st}=43849967$)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения ($Y_i= S_i/S_{st}$, %)	Найдено в % к введенному ($Z_i=Y_i/X_i$, %)
1	49,41	21486483	49,00	99,17
2	59,90	26055650	59,42	99,20
3	69,88	30528347	69,62	99,63
4	79,86	34904573	79,60	99,67
5	89,85	39767535	90,69	100,93
6	99,83	43657027	99,56	99,73
7	109,81	48612073	110,86	100,96
8	119,79	52602420	119,96	99,81
9	129,78	56974262	129,93	100,12
Среднее, Z_{cp} , %				99,91
Относительное стандартное отклонение, RSD_z , %				0,654
$RSD_z (\%) = \frac{\quad}{n-1} \cdot \quad$				
Относительный доверительный интервал,				1,22
Критическое значение для сходимости результатов Δ_{As} , % (границная неопределенность)				1,60
Систематическая погрешность $\delta= Z_{cp}-100 $				0,09
Критерий незначимости систематической ошибки 1) статистическая незначимость: $\delta\% \leq 1,22/3= 0,41$ (0,09 < 0,41); если не выполняется требование к критерию 1), то: 2) практическая незначимость: $\delta\% \leq 0,32 \cdot 1,6 = 0,51$ % (0,09 < 0,51)				Выполняется Выполняется
Общий вывод о точности методики				Корректная

орнидазола из хроматограмм раствора сравнения, не менее 5000 теоретических тарелок: относительное стандартное отклонение с трех (n_0) хроматограмм, рассчитанное для площадей пиков орнидазола, не более 1,34% (ГФУ, 2.2.46); коэффициент симметрии пика орнидазола – не больше 1,8.

Проведенная валидация методики подтвердила ее пригодность и соответствие критериям приемлемости. Согласно данным по валидации (табл. 1), методика количественного определения орнидазола позволяет контролировать препарат методом жидкостной хроматографии в необходимом диапазоне, с достаточной специфичностью, правильностью и сходимостью. Валидационные характеристики свидетельствуют о корректности методики количественного определения при допусках для действующих веществ $\pm 5\%$.

Приведенная линейная зависимость площади пика от концентрации орнидазола в нормализованных координатах (рис. 1) свидетельствует о высоком значении коэффициента корреляции $r=0,99986$, которое удовлетворяет требованиям критерия приемлемости ($r=0,9981$) и подтверждает линейность зави-

симости между взятым («истинным») и найденным количеством орнидазола в области от 50 до 130% относительно его номинального количества в препарате. Таким образом, установлено, что требования к

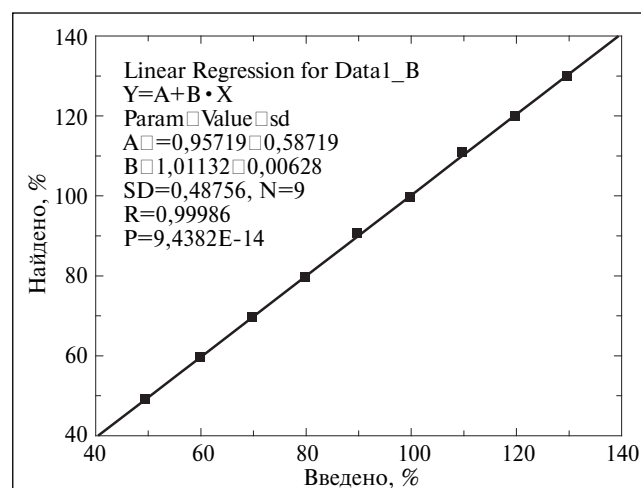


Рис. 1. Линейная зависимость площади пика от концентрации орнидазола в нормализованных координатах

Таблица 2

СПЕЦИФИКАЦИЯ ПРЕПАРАТА «МЕРАФЛАМ, КАПСУЛЫ»

Показатели качества	Допустимые нормы	Методы контроля
Описание	Твердые желатиновые капсулы № 0 с белой непрозрачной крышечкой и белым непрозрачным корпусом, заполненные желтым порошком. По внешнему виду должны соответствовать требованиям ГФУ 1.2, ст. «Капсулы»	Визуально
Идентификация		
Орнидазол	На хроматограммах испытуемого раствора, полученных в разделе «Количественное определение. Орнидазол», время удерживания основного пика орнидазола должно совпадать с временем удерживания этого пика на хроматограмме раствора сравнения	ГФУ, 2.2.29 Метод жидкостной хроматографии
Фламин	На хроматограмме испытуемого раствора при просмотре в дневном и УФ-свете обнаруживается: зона на уровне зоны изосалипурпозид на хроматограмме раствора сравнения	ГФУ, 2.2.27 Метод тонкослойной хроматографии
Средняя масса содержимого капсул	600,0 мг $\pm$ 5% (от 570,0 до 630,0 мг)	ГФУ, 2.9.5
Однородность массы	Отклонение в массе отдельных капсул допускается в пределах $\pm 7,5\%$ от средней массы содержимого капсул. Только 2 массы из 20 капсул могут иметь отклонения от средней массы содержимого капсул более 7,5%, но не более чем в 2 раза	ГФУ, 2.9.5
Распадаемость	Не более 30 мин	ГФУ, 2.9.1
Растворение	Количество орнидазола, которое перешло в раствор через 45 мин, должно быть не менее 85%	ГФУ, 2.9.3 Метод жидкостной хроматографии
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 1.4, 2.6.12; 2.6.13, 5.1.4
Количественное определение: содержание $C_7H_{10}ClN_3O_3$ (орнидазола); содержание суммы флавоноидов	В 1 капсуле: от 270,0 мг до 330,0 мг (в пересчете на среднюю массу содержимого капсулы); не менее 0,01 г (в пересчете на изосалипурпозид)	ГФУ, 2.2.29 Метод жидкостной хроматографии ГФУ, 2.2.25 Метод абсорбционной спектрофотометрии

параметрам линейной зависимости (а, г) выполняются, т.е. линейность методики определения орнидазола подтверждается во всем диапазоне концентраций (50–130 %).

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов и идентификации с использованием методов абсорбционной спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии, соответственно [2]. Фармако-технологические испытания проводили в соответствии с требованиями общих статей ГФУ. По результатам исследований составлена спецификация, представленная в табл. 2.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения орнидазола для проведения тестов «Количественное определение», «Растворение» и «Идентификация» в препарате «Мерафлам, капсулы» с использованием метода жидкостной хроматографии.

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

3. Составлена спецификация для контроля качества препарата «Мерафлам, капсулы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобрицька Л.О., Рубан О.А., Осолодченко Т.П. (та ін.) Антибактеріальні властивості фармацевтичної композиції орнідазолу з флавіном. *Аннали Мечниковського інституту. (Електронний журнал).* 2013; 1; Режим доступу: www.imiamn.org.ua/journal.htm – Назва з екрану.
2. Бобрицька Л.А., Попова Н.В., Рубан Е.А. Оценка качества капсул с флавином и орнидазолом. *Фармация.* 2013; 5; 20–22.
3. Государственная фармакопея Украины, 1-е изд. Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр» (ГП «НЭФЦ»). Харьков.: РИРЕГ; 2001; 556.
4. Государственная фармакопея Украины, 1-е изд. Дополнение 2. Харьков.: ГП «НЭФЦ»; 2008; 620.
5. Государственная фармакопея Украины, 1-е изд. Дополнение 4. Харьков.: ГП «УНФЦКАС»; 2011; 540.

Поступила 17 июля 2013 г.

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS FOR MERAFLAM CAPSULES

L.A. Bobritskaya¹, PhD; E.S. Nazarova², PhD; N.V. Popova¹, PhD; E.A. Ruban¹, PhD

¹National Pharmaceutical University, Kharkov, Ukraine;

²State Research I Center for Medicines and Medical Products, Kharkov, Ukraine

SUMMARY

For the combined drug Meraflam capsules containing flamin and ornidazole, the authors propose an ornidazole assay procedure to carry out the tests «Assay», «Dissolution», and «Identification» by liquid chromatography using a 250×4.6-mm chromatographic column packed with octadecyl silica gel (C18) with 5-μm particles (column temperature, 25°C; detection at 310 nm). The following solvent mixture: methanol/water (20:80) adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid at a flow rate of 1.0 ml/min was optimal as the mobile phase. According to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine, the assay procedure for ornidazole capsules (B) was validated by the main validation characteristics: specificity, linearity, precision (convergence), accuracy, and range of usability. Since the ornidazole tolerance in the drug product at the moment of its production were established within +5%; during validation, the criteria for assessing this procedure were parameters for B = 5.0%, i.e. the maximal assay uncertainty (Δ_{A_0}) should not be greater than 1.6%. The obtained validation characteristics completely meet the acceptability criteria by all validation parameters. A specification was compiled to control meraflam quality, which included the following sections: «Description», «Identification», «Average mass of the content of capsules», «Uniformity of mass», «Disintegration», «Dissolution», «Microbiological purity», and «Assay».

Key words: ornidazole, flamin, capsules, standardization.

REFERENCES

1. Bobritska L.A., Ruban E.A., Osolodchenko T.P. Antibacterial properties of pharmaceutical formulation with ornidazol and flaming. *Mechnikov Institute Annals.* 2013; 1. Access: www.imiamn.org.ua (journal.htm – Title screen).
2. Bobritskaya L.A., Popova N.V., Ruban E.A. Assessment of the quality of capsules with Flamin and ornidazole. *Farmatsiya.* 2013; 5; 20–22. (in Russian)
3. State Pharmacopoeia of Ukraine, 1-st ed. State enterprise «Scientific Expert pharmacopoeia center». Kharkov.: RIREG; 2001; 556. (in Russian)
4. State Pharmacopoeia of Ukraine, 1-st ed., Supplement 2. Kharkov.: RIREG; 2008; 620.
5. State Pharmacopoeia of Ukraine, 1-st ed., Supplement 4. State enterprise «Scientific Expert pharmacopoeia center». Kharkov.: 2011; 540. (in Russian)