



<http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-1-198-201>

УДК - 615.072

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФУРОКУМАРИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ «АНМАРИН®»

Комкова¹ С.П., Куляк^{1,2} О.Ю., Джавахян^{1,2} М.А.

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, г. Москва, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Российская Федерация

Аннотация. Лекарственные препараты растительного происхождения широко используют в медицинской практике. Это преимущественно связано с возможностью их длительного применения, отсутствия побочных эффектов и высокой фармакологической активностью. С каждым годом требования к качеству лекарственных препаратов увеличивается и приводит к необходимости разработки новых методов и методик стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов, в том числе препаратов на основе лекарственного растительного сырья. Решением данной задачи является стандартизация препарата по классу биологически активных веществ, оказывающих фармакологическое действие или по наиболее характерному составляющему компоненту. Для лечения микозов, кандидозов используют отечественный фитопрепарат «Анмарин®», содержащий смесь трех фурукумаринов: изопимпеллина, бергаптена и ксантотоксина, выделенных из семян растения амми большой (*Ammi majus* L.). Целью данной работы являлась разработка методики количественного определения суммы фурукумаринов в лекарственном препарате «Анмарин®» (капсулы 150мг). Методика оценивалась по валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Разработанная методика позволяет количественно определить сумму фурукумаринов в пересчете на мармезин в присутствии сопутствующих компонентов и может быть рекомендована для включения в нормативную документацию.

Ключевые слова: анмарин, сумма фурукумаринов, мармезин, капсула, спектрофотометрия, валидация.

Введение. Развитие медицинской промышленности в большей степени связано с разработкой препаратов на основе трав для лечения различных заболеваний. Это связано с меньшей способностью к привыканию и возможными побочными эффектами [2], которые часто возникают при применении синтетических лекарственных средств. Одним из важных направлений является разработка противогрибковых средств, одним из действующих веществ которых является анмарин, полученный в ФГБНУ ВИЛАР из Амми большой (*Ammi majus*) и представляющее собой смесь двух изомеров ангидромармезина: 5'-изопропил-4',5'-дигидропсоралена и 5'-изопропилпсоралена. Анмарин обладает фунгистатической активностью [3] в отношении различных штаммов мицелиальных грибов, в том числе *Trichophyton rubrum*, *T. Interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *Gypseum*, *Mycrosporium canis*, *Candida albicans*, а также оказывает умеренное бактериостатическое действие в отношении грамположительных бактерий. Ввиду того, что грибковые инфек-

ции часто приобретают системный характер, были разработаны капсулы для приема внутрь, содержащие в качестве действующего вещества анмарин.

Цель работы – разработка и валидация методики количественного определения суммы фурукумаринов в пересчете на мармезин в капсулах «Анмарин®» методом спектрофотометрии.

Материалы и методы. Объектом исследования служил экспериментальный образец капсул «Анмарин®», содержащий сумму фурукумаринов, выделенных из плодов амми большой.

При проведении пробоподготовки использовали аналитические весы (Vibra Shinko Denshi, класс 2, HRT-220CE), мерную посуду класса А.

Образец капсул для приема внутрь готовили таким образом, чтобы дозировка капсул составила 150 мг, в состав капсулы входили: субстанция анмарин (получен ФГБНУ ВИЛАР), крахмал кукурузный, табулоза и магния оксид.

Стандартный образец (СО) мармезина, готовили следующим образом: точную навеску 0,002 г субстанции мармезина (получен ФГБНУ ВИЛАР) помещали в

мерную колбу на 25 мл и доводили объем колбы до метки этиловым спиртом 70% объем раствора до метки, перемешивали. 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили спиртом этиловым 70% объем раствора до метки и перемешивали.

Для приготовления исходного раствора: содержимое 20 капсул объединяли и тщательно перемешивали. Точную навеску полученного порошка (80 мг) помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 40 мл а этилового спирта -70% и растворяли в течение 10 мин. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр (белая лента) в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтр промывали 5 мл тем же растворителем, аликвоты объединяли и доводили этиловым спиртом -70% до метки. 1мл полученного раствора переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки тем же растворителем. В качестве раствора сравнения использовали этиловый спирт - 70%.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре Cary 100 Scan (Varian, Австралия) при длине волны 300-380 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Сумму кумаринов в пересчете на мармезин в про-

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)}$$

центах (X) рассчитывали по формуле:

где А - оптическая плотность испытуемого раствора,

m - масса капсульной массы в г,

W -влажность порошка, извлеченного из капсул (определяли методом «Потеря в массе при высушивании» (ОФС.1.2.1.0010.15) [1]), %

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения мармезина равный 669.

Все приборы и средства измерения, используемые в ходе данного эксперимента, зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке.

Эксперименты проводили в соответствии с учетом требований и рекомендаций ГФ XIII «Валидация аналитических методик» (ОФС.1.1.0012.15) [1], Guideline on validation of bioanalytical methods [4], Guidelines for Industry: Bioanalytical method validation [5]. Валидация аналитической методики осуществлялась по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью статистического пакета программы «Excel».

Результаты и обсуждения. При разработке метода учитывали данные согласно ВФС 42-2417-01 на линимент Анмарина 1%, а также разработанной в ВИЛАР методике количественного определения для крема Анмарин 1%. Согласно полученным ранее данным оптимальным является измерение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 335 ± 1 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве стандарта использовали удельный показатель поглощения стандарта мармезина равный 669.

Для валидируемой методики количественного определения оценивали специфичность в отношении определяемого вещества, сравнивая результаты анализов реальных объектов, полученных с использованием валидируемой и специфичной методики.

Специфичность данной методики определяли, изучая влияние вспомогательных веществ на результаты эксперимента. В соответствии с полученными результатами нами было установлено, что данная методика специфична и вспомогательные вещества не мешают определению мармезина в капсулах «Анмарин®». УФ спектры испытуемого раствора и СО мармезина имеют максимумы при длине волны 335 ± 1 нм (рис. 1, табл. 1).

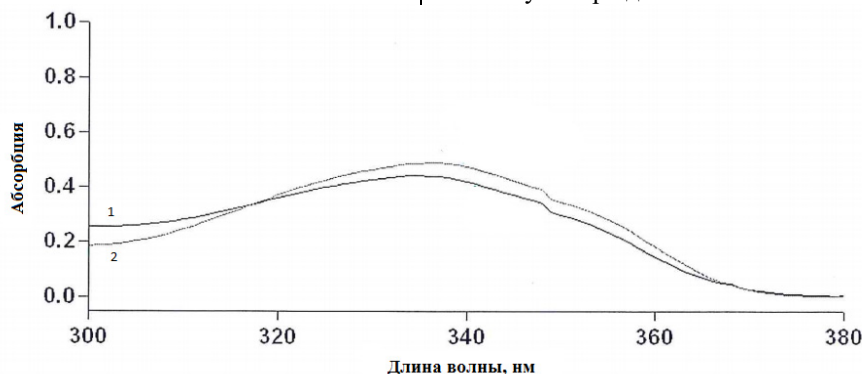


Рис. 1. УФ спектры СО мармезина (1) и испытуемого раствора (2).

Аналитическая область методики находилась в пределах линейной зависимости в диапазоне концентраций 2,56 - 12,16 мкг/мл (табл. 1).

Таблица 1.

Таблица зависимости показателей оптической плотности от концентрации стандартных растворов

№ стандартного раствора	Оптическая плотность, (A)	Концентрация, (мкг/мл)
1	0,253	2,56 мкг/мл
2	0,338	3,84 мкг/мл
3	0,511	5,76 мкг/мл
4	0,594	7,68 мкг/мл
5	0,675	8,96 мкг/мл
6	0,780	10,24 мкг/мл
7	0,924	12,16 мкг/мл

На основании полученных результатов был построен график зависимости оптической плотности от концентрации раствора (рис.2). Описывающее калибровочную прямую уравнение регрессии имеет вид $y=0.683x+0,0825$ имеет коэффициент корреляции

$R^2=0,9942$, что что превышает необходимое условие $R^2 \geq 0,99$. Анализ данных свидетельствует, что значение критерия статистической неопределенности свободного члена a и критерия статистической неопределенности b не превышают пределы допустимого критерия.

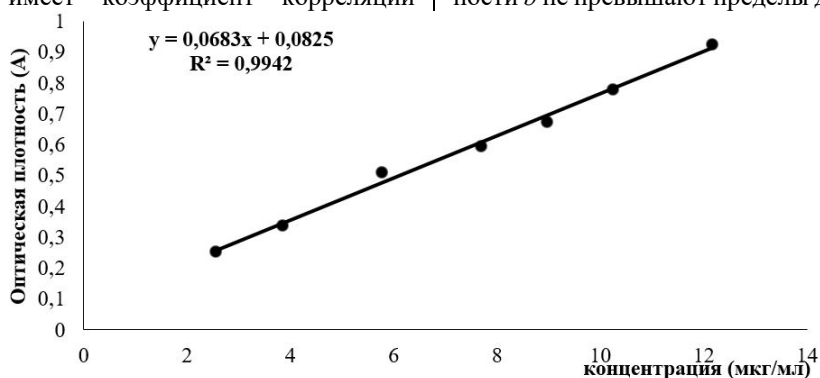


Рис. 2. График линейной зависимости методики количественного определения мармезина в капсулах «Анмарин®».

Для оценки воспроизводимости разработанной методики количественного определения мармезина использовали три серии капсул «Анмарин®». Критерий приемлемости выражался величиной стандартного от-

клонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD), который имел значения близкие к 1, что указывает на приемлемую воспроизводимость (табл.2).

Таблица 2.

Значения прецизионности аналитической методики «intra-day» и «inter-day»

№	Содержание кумаринов в капсулах «intra-day»		Содержание кумаринов в капсулах «inter-day»
	Серия 1, %	Серия 2, %	Серия 3, %
1	42,69	42,50	42,51
2	43,50	43,20	43,40
3	41,53	41,61	41,44
4	43,36	43,50	43,15
5	44,32	44,22	44,20
Среднее значение	43,08	43,006	42,94
Стандартное отклонение (SD), %	1,042	0,995	1,034
Относительно стандартное отклонение (RSD), %	2,42	2,31	2,41

Для валидируемой методики характерна достоверная прецизионность получаемых результатов относительно «inter-day» и «intra-day» способов количественного опре-

деления суммы кумаринов. В случае определения прецизионности «intra-day» все стандартные растворы были приготовлены разными аналитиками, использовали два

различных УФ-спектрофотометра и анализ проводили в разные дни.

Для оценки правильности методики использовали метод добавок, отклонения концентраций полученных растворов, от фактических значений приведены в таблице (табл.3).

Таблица 3

Отклонения рассчитанных количеств суммы кумаринов с добавками стандарта мармезина

Навеска анмарина, мг	Фактическое содержание, мг	Рассчитанное содержание, мг	% отклонения
29,8	39,8	38,7	2,77
	49,9	48,4	3,01
	60,0	58,6	2,33

Критерием приемлемости данной методики является достоверность результатов с относительным стандартным отклонением $\leq 5\%$.

Выводы. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы фурукумаринов в пересчете на мармезин в лекарственных капсулах «Анмарин®». Методика валидирована по показателям селективности, линейности, правильности, прецизионности и обладает достаточной чувствительностью для фармацевтического определения действующих веществ в препаратах на основе фурукумаринов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

[1] ГФ XIII, Министерство здравоохранения Российской Федерации, 01.01.2016г;

- [2] Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Арзамасцев Е.В., Шкаренков А.А. Доклиническое изучение безопасности антимикотического лекарственного средства анмарина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. - №3-4. - С. 32-36;
- [3] Вичканова С.А. Доклинические исследования анмарина антимикотического средства растительного происхождения. // Химия, Технология, Медицина. – 2004. - С.158-164
- [4] Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009;
- [5] Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2013.

ELABORATING AND VALIDATING THE METHOD OF QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE SUM OF FUROCUMARINS IN THE «ANMARIN®»

Komkova¹ S.P., Kulyak^{1,2} O.Yu., Dzhavakhyan^{1,2} M.A.

¹All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, Moscow, Russian Federation

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Annotation. The drugs from plants are widely used in medical practice. The main advantages of these drugs are the possibility of their long-term use, the lack of side effects and high pharmacological activity. The requirements to the quality of medicines increase every year and this is the reason for developing new methods for standardizing and controlling the quality of drugs and drugs from plants. Standardization of the drug is possible according to the class of biological active substances that have a pharmacological effect or to the most specific molecule in research plant. domestic phyto drug "Anmarine®" is used for the treatment of fungal infections, candidiasis, This drug contains a mixture of three furocoumarin: isopimpinellin, bergaptena and xanthoxin, extracted from the seeds of the plant ammonium large (Ammi majus L.). The purpose of this work was to develop a methodology for quantification the sum of furocoumarins in the drug "Anmarine®" (capsules 150 mg). The method was evaluated by validation characteristics: specificity, linearity, accuracy and precision. The elaborated technique allows determining the sum of furocoumarins equivalent to marmesin in the presence of related components and can be recommended to be incorporated in regulatory documentation.

Key words: Anmarine, the sum of furocoumarins, marmesin, capsule, spectrophotometry, validation.

REFERENCES

- [1] Russian State Pharmacopoeia XIII edition. – 2016.;
- [2] Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Arzamastsev Ye.V., Shkarenkov A.A. Preclinical investigation of the safety of the antimycotic drug anmarinum // Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry. – 2006. - №3-4. - P. 32-36;
- [3] Vichkanova S.A. Clinical reseaches anmarinum-antimicosis vegetable means. // Chemistry, Technology, Medicine. – 2004. – P.158-164

- [4] Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009;
- [5] Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2013.