

# ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В НОВОМ ПРЕПАРАТЕ "САЛИВЕРТИН" МЕТОДОМ ВЭЖХ

### ASSAY OF IMPURITY OF SALICYLIC ACID IN NEW DRUG "SALIVERTIN" BY HPLC

**А.М. Савватеев, В.Л. Белобородов\*, Н.А. Тюкавкина**  
**A.M. Savvateev, V.L. Beloborodov\*, N.A. Tyukavkina**

ГОУ ВПО Московская Медицинская Академия им. И. М. Сеченова  
I.M. Sechenov Moscow Medical Academy,

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** саливертин, дикувертин, ацетилсалициловая кислота, салициловая кислота, ВЭЖХ, валидация

**KEY WORDS:** salivertin, diquertin, acetylsalicylic acid, salicylic acid, HPLC, validation

**РЕЗЮМЕ:** Саливертин – перспективный комбинированный препарат на основе ацетилсалициловой кислоты и дикувертина, предлагаемый как ингибитор агрегации тромбоцитов. Разработана методика количественного определения примеси СК, достоинством которой является возможность одновременного анализа примеси и действующих веществ. По результатам валидации установлено, что методика является специфичной для анализа примеси салициловой кислоты (СК) в присутствии действующих веществ, родственных соединений и вспомогательных веществ ядра и оболочки таблеток саливертина. Методика характеризуется воспроизводимостью и линейной зависимостью в аналитических областях, рекомендуемых для анализа примесей в таблетках без оболочки и таблетках, покрытых желудочно-резистентной оболочкой, и позволяет достоверно оценивать качество препарата.

**ABSTRACT:** The new hemorheological drug Salivertin is the combination of acetylsalicylic acid (ASA) and diquertin (5:1). Diquertin is a sum of bioflavonoids from *Larix gmelinii* Rupr. wood, the main of them is dihydroquercetin (DHQ). The aim of our investigation was to develop and validate a sensitive, selective, reproducible method for quantification of impurity of salicylic acid (SA) in drug. A HPLC method has been developed for the simultaneous determination of ASA, DHQ and SA in enterocoated tablets of salivertin. The method involves a single-step extraction of ASA, SA and

bioflavonoids of diquertin with acetonitrile and following separation of these components on Hibar LiChrospher 100 RP-18 column is accomplished by HPLC with ultraviolet detection at 280 nm. It is established, that the content of impurity of SA in the enterocoated tablets constitutes 1.5-2.5% from ASA. In result, a simple and efficient method of HPLC separation of salivertin components may be used for standardization of this new drug.

### Введение

В настоящее время в целях повышения качества, безопасности и эффективности применения лекарственных средств значительно возросли требования к уровню их стандартизации. В частности, в рамках стандартизации большое значение придаётся оценке содержания посторонних примесей. Количественное содержание посторонних примесей, как правило, бывает на один или несколько порядков ниже сравнительно с действующими веществами. Это обстоятельство создает трудности в их аналитическом определении и зачастую обуславливает необходимость использования специальных условий анализа.

Одним из распространенных примеров примесных компонентов является салициловая кислота (СК) в разнообразных препаратах, содержащих ацетилсалициловую кислоту (АСК). На разных технологических стадиях производства, а также при нарушении условий хранения таких препаратов АСК гидролизует с образованием СК. В организме СК как основной метаболит АСК представляет собой фармакологически активное вещество. С одной стороны, этот метаболит во многом обуславливает анальгезирующие свойства АСК (Davison, 1971), с другой стороны – проявляет различные токсические

\*Адрес для переписки:  
Белобородов В.Л.  
105045 г. Москва, ул. 5-я Парковая, д.21  
ГОУ ВПО ММА им И.М. Сеченова  
e-mail: tamtich@list.ru

эффекты, например, язвеногенное действие, а также участие в развитии синдрома Ренья у детей (Starko, Mullick, 1983).

В последнее время наметился интерес к созданию комбинированных препаратов, включающих АСК в сочетании с лекарственными средствами растительного происхождения. Такие препараты характеризуются более широким спектром фармакологического действия, более высокой эффективностью и безопасностью применения. К их числу относится новый отечественный препарат «Саливертин», предлагаемый в качестве ингибитора агрегации тромбоцитов (Плотников и др., 2005). Саливертин представляет собой композицию АСК и биофлавоноидного препарата диквертина (ДКВ) в соотношении 1:0,2. Доминирующим компонентом ДКВ служит флавоноид дигидрокемпферол (ДГК) (90% и выше), наряду с которым в состав ДКВ входят родственные флавоноиды дигидрокемпферол и нарингенин (Колхир и др., 1997). ДКВ потенцирует антиагрегационный эффект АСК, что позволяет снизить её содержание в комбинации по сравнению с индивидуальным приемом и, тем самым, уменьшить побочные гастроинтестинальные эффекты и риск кровотечений.

Цель настоящей работы состояла в разработке достоверной методики определения примеси СК с одновременным количественным определением действующих веществ препарата "Саливертина". В наибольшей степени с указанной целью сочетается метод ВЭЖХ, который и был положен в основу разрабатываемой методики.

## Материалы и методы

*Объекты исследования:* покрытые желудочно-резистентной оболочкой таблетки саливертина, содержащие 0,05 г АСК и 0,01 г ДКВ (в пересчете на 100% содержание ДГК) опытного производства ОАО «Диод», г. Москва. В качестве стандартных веществ применяли ГСО ДГК (ФС 42-3853-99) производства ООО «Флавир», г. Иркутск; РСО АСК с известной степенью чистоты (ФС 42-2668-95) и РСО СК с известной степенью чистоты (ГФ Х, ст. 21).

Для разведения анализируемых образцов использовали смесь растворителей, содержащую 45 об.% метанола и 55 об.% 0,01% раствора ортофосфорной кислоты в воде (раствор А).

*Приготовление испытуемых образцов:* около 0,25 г порошка растертых таблеток (точная навеска) помещали в коническую колбу, прибавляли 40 мл ацетонитрила, встряхивали в течение 5 мин, фильтровали через фильтр с диаметром пор 5 мкм в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки раствором А и перемешивали (раствор Б). 1 мл раствора Б переносили в коническую колбу вместимостью 15 мл, прибавляли 3 мл раствора А и перемешивали (раствор В). 0,02 мл раствора В вводили в жидкостный хроматограф.

*Приготовление растворов стандартных веществ:* к 0,05 г (точная навеска) РСО АСК, или к 0,02 г (точная навеска) ГСО ДГК или РСО СК добав-

ляли 40 мл ацетонитрила, доводили объем до 100 мл раствором А. Полученные растворы разбавляли четырехкратно раствором А. Растворы стандартных веществ хроматографировали параллельно с испытуемыми образцами.

*Приготовление растворов модельных смесей:* к образцам таблеточной массы, содержащим вспомогательные вещества, добавляли СК в интервале 50-120% от допустимого содержания: для обычных таблеток 0,3% и таблеток покрытых оболочкой 3,0%. Затем добавляли 40 мл ацетонитрила, фильтровали, доводили объем до 100 мл раствором А. Полученные растворы разбавляли четырехкратно раствором А. Полученные модельные смеси хроматографировали в условиях анализа испытуемых образцов.

*Хроматографические условия:* анализ осуществляли на жидкостном хроматографе ProStar 230 с УФ детектором ProStar 325 (Varian); аналитическая длина волны 280 нм; колонка Hibar LiChrospher 100, RP-18,5 мкм; 250 мм × 4,6 мм. Условия градиентной разгонки: фаза А – метанол, фаза Б – 0,01% раствор ортофосфорной кислоты в воде. В начальный момент времени соотношение А:Б – 45:55 об.%; к седьмой мин разгонки 48:52 об.%; к 15 мин 80:20 об.%. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; температура колонки 20°C, продолжительность элюирования 15 мин.

Содержание СК, считая на среднюю массу таблетки, в граммах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_0 \times 100 \times 1 \times 4 \times S \times m_1}{m \times 100 \times 1 \times 4 \times S_0} \times \frac{P}{100} = \frac{m_0 \times S \times m_1}{m \times S_0} \times \frac{P}{100}$$

где  $m_0$  – навеска соответствующего стандартного вещества, г;  $m$  – навеска порошка растертых таблеток, г;  $m_1$  – средняя масса таблетки, г;  $S_0$  – площадь пика на хроматограмме раствора стандартного вещества;  $S$  – площадь пика СК на хроматограмме испытуемого раствора;  $P$  – процентное содержание СК в РСО.

## Результаты и обсуждение

Разрабатываемую методику оптимизировали по способу пробоподготовки и хроматографическому анализу. Процесс пробоподготовки оптимизирован таким образом, чтобы вспомогательные вещества ядра и оболочки не извлекались в анализируемый раствор. Оптимальное хроматографическое разделение смеси АСК, флавоноидных компонентов ДКВ (ДГК, дигидрокемпферола и нарингенина) и примеси СК было достигнуто при использовании обращенно-фазного варианта ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования (рис. 1а). Обнаружение примеси СК в препарате осуществляется на основании совпадения на хроматограммах времен удерживания пика в образцах с таковым для РСО СК (рис. 1а и б). Хроматографические параметры рассчитывали по формулам (Шатц, Сахартова, 1988). Пик СК хорошо отделяется от соседнего пика дигидрокемпферола (критерий разделения 1,3). Коэффициент емкости (2,5) находится в

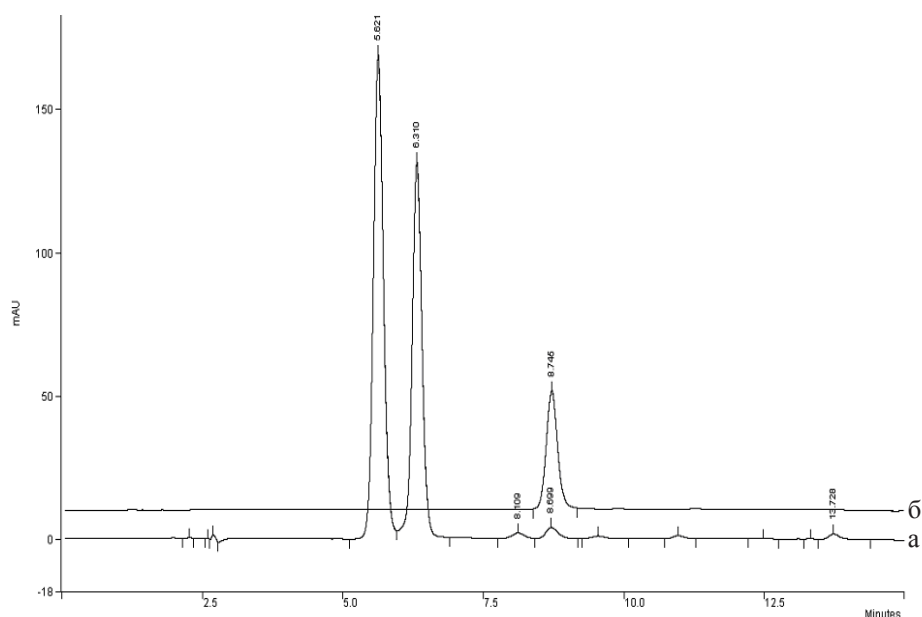


Рис. 1. Хроматограммы, иллюстрирующие разделение компонентов в таблетках препарата «Саливертин». а – таблетки саливертина, порядок выхода веществ: дигидрокверцетин (5,6); ацетилсалициловая кислота (6,3); дигидрокемпферол (8,1); салициловая кислота (8,7); нарингенин (13,7); б – РСО салициловой кислоты.

оптимальном диапазоне, эффективность колонки по пику СК составляет 7900 теоретических тарелок.

В различных фармакопеях допустимые уровни нормирования примеси СК в лекарственных формах АСК несколько различаются. По Европейской Фармакопее содержание СК в таблетках АСК должно быть не более 0,15%, а по Фармакопее США – не более 0,3%. В таблетках аспирина, покрытых оболочкой, в Фармакопее США нормируется допустимая примесь СК не более 3%.

Предлагаемая нами методика позволяет анализировать СК в таблетках без оболочки и в таблетках, покрытых оболочкой. Для таблеток, покрытых оболочкой, анализ СК рекомендуется проводить, используя разбавленный раствор В, одновременно с анализом действующих компонентов препарата "Саливертин". При этом отношение сигнал / шум базовой линии для пика СК составляет не менее 30. Для анализа таблеток не покрытых желудочно-резистентной оболочкой, где содержание СК должно быть заведомо меньше, можно использовать более концентрированный раствор Б.

Достоинством предлагаемой методики является возможность одновременного анализа по результатам хроматографической разгонки как действующих компонентов препарата "Саливертин", так и примеси СК.

Валидация методики определения примеси СК в препарате "Саливертин" проводилась по соответствующим характеристикам, рекомендованным в проекте ОФС "Валидация фармакопейных методов" (Арзамасцев и др., 2001).

Специфичность методики основана на возможности достоверно определять количественное содержание ДГК, АСК и СК в таблетке в присутс-

твии вспомогательных веществ и родственных соединений.

Тожественность пика с временем удерживания 8,7 мин СК подтверждалась совпадением с временем удерживания стандартного образца. Пики всех компонентов препарата хорошо разделяются с пиком СК.

Пригодность хроматографической системы для анализа СК подтверждена оптимальными значениями хроматографических параметров, представленными выше.

Линейная зависимость методики отражает пропорциональность возрастания площади пика на хроматограмме при возрастании количества анализируемых веществ в испытуемых образцах. Данная валидационная характеристика исследовалась на модельных смесях в интервале 50-120% от нормируемого содержания СК в таблетках без обо-

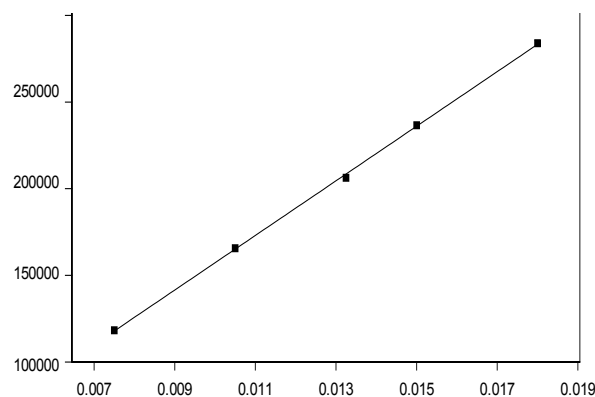


Рис. 2. Зависимость площади пика от содержания салициловой кислоты в модельных смесях (вариант 1).

лочки (вариант 1) и таблетках покрытых оболочкой (вариант 2). Зависимость аналитического сигнала в условных единицах площади пика от содержания СК (в мкг) представлена графически на рисунках 2 и 3. Линейная зависимость охарактеризована уравнением регрессии  $y = bx + a$ , где  $b$  – тангенс угла наклона прямой;  $a$  – точка пересечения прямой с осью  $y$ . Калибровочные зависимости отражаются уравнениями  $y = 6,65x + 999$  (вариант 1) и  $y = 9,63x + 1050$  (вариант 2), а линейность характеризуется высокими коэффициентами корреляции (0,98). На основании полученных результатов можно утверждать, что соблюдается линейная зависимость между величинами площадей хроматографических пиков и содержанием СК в двух интервалах концентраций, которые можно определить как *аналитические области методики*.

*Воспроизводимость аналитической методики* характеризует надежность анализа по степени совпадения результатов индивидуальных определений при многократном использовании. По представленным в таблице параметрам (величины стандартного отклонения, доверительный интервал) можно сделать заключение о хорошей воспроизводимости данной методики. Относительная ошибка среднего результата определения СК составляет 2,9%.

По результатам анализа таблеток 5 серий препарата "Саливертин" установлено, что содержание СК изменялось в интервале 0,0009-0,0014 г. Ни в одной из анализируемых серий содержание примеси СК не превышало допустимого значения (не более 3%).

## Заключение

Разработана методика количественного определения примеси СК, достоинством которой является возможность одновременного анализа примеси и действующих веществ – ацетилсалициловой кислоты и дигидрокверцетина – в препарате "Саливертин". По результатам валидации установлено, что методика является специфичной для анализа примеси СК в присутствии действующих веществ, родственных соединений и вспомогательных веществ ядра и оболочки таблеток саливертина. Методика характеризуется воспроизводимостью и линейной зависимостью в аналитических областях, рекомендуемых

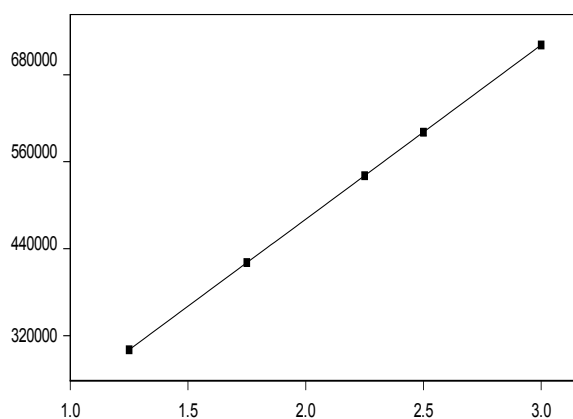


Рис. 3. Зависимость площади пика от содержания салициловой кислоты в модельных смесях (вариант 2).

для анализа примесей в таблетках без оболочки и таблетках, покрытых желудочно-резистентной оболочкой, и позволяет достоверно оценивать качество препарата.

## Литература

- Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. 2001. Валидация фармакопейных методов (проект ОФС) // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. №1. С.28-29.
- Колхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. 1997. Новое антиоксидантное средство "Диквертин" // Практическая фитотерапия. №1. С.12-16.
- Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. 2005. Лекарственные препараты на основе диквертина. Томск: изд-во Томского университета. С.97-119.
- Шатц В.Д., Сахартова О.В. 1988. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Знание. 390 с.
- Davison C. 1971. Salicylate metabolism in man // Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol.179. P.249-268.
- Starko K.M., Mullick F.G. 1983. Hepatic and cerebral pathology findings in children with fatal salicylate intoxication: further evidence for a causal relation between salicylate and Reye's syndrome // Lancet. № 1. P.326-329.