УДК 615.322; 615.013; 615.074

Е. В. Феськова, А. Ю. Бесараб, О. С. Игнатовец, В. Н. Леонтьев, Н. Ю. Адамцевич
Белорусский государственный технологический университет

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ФИТОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ФЛАВОНОИДОВ

Качество, терапевтическая эффективность и безопасность лекарственного средства в процессе хранения напрямую зависят от его способности сохранять свойства в течение определенного срока при надлежащих условиях хранения и транспортировки, т. е. от его стабильности, на основании результатов исследования которой устанавливают срок годности, осуществляют выбор используемых материалов и вида упаковки, определяют условия хранения. В работе представлены результаты исследований по изучению стабильности фитопрепарата на основе комплекса флавоноидов. Стабильность разработанной лекарственной формы (гель с содержанием комплекса флавоноидов из экстрактов цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*) и воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale*) 1,0% или 0,1% по фенольным соединениям и с содержанием парабенов 0,4%) оценивали по параметрам pH, содержание фенольных соединений и консервантов изучали в соответствии с ТКП 431-2012 (температура 40ºС, влажность 75%, продолжительность – 6 месяцев). Контролировали pH с помощью pH-метра, содержание фенольных соединений – методом Фолина – Чокальтеу. Для определения содержания парабенов в исследуемых образцах была разработана методика хромато-масс-спектрометрического анализа (ВЭЖХ-МС). По результатам проведенных исследований установлено, что разрабатываемая лекарственная форма на основе комплекса флавоноидов стабильна по параметрам pH, содержание фенольных соединений и содержание консервантов в течение 90 сут от начала эксперимента.

Ключевые слова: карбопол 980, метилпарабен, пропилпарабен, комплекс флавоноидов, цмин песчаный (*Helichrysum arenarium*), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale*).

A. Feskova, A. Yu. Besarab, O. S. Ignatovets, V. N. Leontiev, N. Yu. Adamtsevich
Belarusian State Technological University

STUDY OF THE STABILITY OF A PHYTOPREPARETION BASED ON THE COMPLEX OF FLAVONOIDS

The quality, therapeutic efficacy and safety of the drug during storage directly depend on its ability to maintain properties for a certain period under appropriate storage and transportation conditions, i.e. from its stability, on the basis of the results of which the expiration date is determined, the materials used and the type of packaging are selected, storage conditions are determined. The paper presents the results of studies on the stability of a phytopreparation based on a complex of flavonoids. The stability of the developed dosage form (gel containing a complex of flavonoids from extracts of everlasting (*Helichrysum arenarium*) and littlewale (*Lithospermum officinale*) 1.0% or 0.1% for phenolic compounds and containing parabens 0.4%) were evaluated by pH, the content of phenolic compounds and preservatives and studied in accordance with TKP 431-2012 (temperature 40 ºC, humidity 75%, duration 6 months). The pH was monitored using a pH meter, and the content of phenolic compounds was monitored by the Folin-Ciocalteu method. To determine the parabens content in the samples under study, a chromatography-mass spectrometric analysis (HPLC-MS) technique was developed. According to the results of the studies, it was established that the developed dosage form based on a complex of flavonoids is stable in terms of pH, the content of phenolic compounds and preservatives for 90 days from the start of the experiment.

Keywords: carbopol 980, methylparaben, propylparaben, complex of flavonoids, (*Helichrysum arenarium*), littlewale (*Lithospermum officinale*).

Введение. Флавоноиды являются одним из важных и востребованных классов биологически активных веществ растительного происхождения. Различные лабораторные и клинические исследования выявили у флавоноидов широкий спектр терапевтического действия (антиканцерогенное, антиоксидантное, противомикробное, нейропротекторное, иммуномодулирующее, гепатопротекторное и др.) [1–3]. Отдельный интерес представляют флавоноиды, способные стимулировать процессы регенерации поврежденных тканей организма [4]. Результаты исследований, представленные в работах [5–7], доказывают, что кемпферол (и его гликозиды) и изокверцитрин обладают ранозаживляющим действием.

В последнее время лекарственные препараты на основе флавоноидов широко внедряются в фармакологическую практику. Природные флавоноиды не проявляют токсического действия, не являются кумулятивными и в больших дозах обычно не вызывают каких-либо побочных отрицательных эффектов.

Одним из перспективных направлений в настоящее время является создание неогаленовых препаратов, т. е. препаратов, представляющих разные извлечения из сырья растительного происхождения, которые являются биологически стандартизированными и максимально освобожденными от балластных веществ.

В процессе их производства действующие вещества стремятся сохранить в том виде, в каком они ранее находились в растительном сырье. Практически все препараты из данной группы готовятся из лекарственных растений. Одним из действующих и фармакологически активных веществ в составе указанных препаратов являются комплексы различных флавоноидов.

Основная часть. Целью данной работы было изучение стабильности разработанной лекарственной формы (геля) на основе комплекса флавоноидов по следующим параметрам: pH, содержание фенольных соединений, содержание консервантов.

Качество, терапевтическая эффективность и безопасность лекарственного средства в процессе хранения напрямую зависят от его способности сохранять свойства в пределах, установленных нормативной документацией, в течение определенного срока при надлежащих условиях хранения и транспортировки, т. е. от его стабильности. На основании результатов исследования стабильности устанавливают срок годности, осуществляют выбор используемых материалов и вида упаковки, определяют условия хранения [8].

На первом этапе готовили лекарственную форму в виде геля. В качестве гелеобразователя (основы) был выбран карбопол 980, т. к. он дает стабильные рецептуры. Гель с карбополом не расслаивается, не высыхает, не комкается, не меняет цвет. Карбопол легок в применении: хорошо растворяется в воде, легко смешивается с любыми активными ингредиентами.

Карбополы являются очень слабыми кислотами и довольно легко переходят в соли. В зависимости от концентрации водные дисперсии редкосшитых акриловых полимеров имеют величину pH от 2,8 до 3,3. Чем выше концентрация полимера в дисперсии, тем ниже значение pH из-за большего количества карбоксильных групп (–COOH) [9].

В качестве действующего вещества использовали комплекс флавоноидов из экстрактов цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*) (источник кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида) и воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale*) (источник изокверцитрина). Экстракцию фенольных соединений из лекарственных растений проводили 50%-ным этиловым спиртом в течение 30 мин при температуре 65°C. Соотношение сырье : экстрагент составляло 1 : 50. Отфильтрованные экстракты упаривали на роторном испарителе до постоянной массы.

Для обеспечения микробиологической чистоты нестерильных лекарственных форм при хранении и применении в гель добавляли антимикробные вещества (консерванты). Консерванты добавляют в лекарственные средства для предотвращения роста и развития микроорганизмов, попадающих в них во время технологического процесса или при неоднократном употреблении лекарственного препарата.

В качестве консервантов были выбраны метилпарабен (метилпарагидроксибензоат) и пропилпарабен (пропилпарагидроксибензоат).

Эффективность парабенов в качестве консервантов объясняется их бактерицидными и фунгицидными свойствами. Эти вещества обладают широким спектром действия: нарушают проницаемость цитоплазматической мембраны клетки микроорганизма или гриба, угнетают функцию митохондрий. Спектр действия каждого парабена имеет свои особенности. Например, метилпарабен лучше подавляет рост плесневых грибов, а пропилпарабен – дрожжевых. Парабены характеризуются низкой токсичностью, эффективностью в широком диапазоне pH, не обладают специфическим запахом, цветом и вкусом, не изменяют органолептических свойств продукции, в которую вводятся. Они не мутагенны.

Для лекарственных средств установлена максимальная дозировка одного парабена 0,4% и смеси парабенов 0,8%. В лекарственных препаратах чаще применяется синергетическая смесь метил- и пропилпарабена в соотношении от 2 : 1 до 4 : 1 [10].

Так как парабены труднорастворимы в воде, для их растворения использовали пропиленгликоль, который в фармацевтической промышленности применяется как гигроскопическое вещество и как несущий элемент или растворитель в лечебных жидкостях и мазях [11].

Для поддержания постоянного pH геля его готовили с использованием 0,1 М фосфатного буфера.

Для проведения исследований наработали 30 г лабораторного образца геля с содержанием комплекса флавоноидов из экстрактов цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*) и воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale*) 1,0% или 0,1% по фенольным соединениям и с содержанием парабенов 120 мг (90 мг метилпарабена и 30 мг пропилпарабена), т. е. 0,4%.

Контролировали pH геля с помощью pH-метра HANNA (HANNA Instruments GmbH, Германия). Для этого 1 мл геля растворяли в 20 мл дистиллированной воды и измеряли pH при постоянном перемешивании.

Содержание фенольных соединений в образце определяли методом Фолина – Чокальтеу [12]. Для этого навеску образца геля растворяли в 50 %-ном этиловом спирте, хорошо встряхивали и центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин для осаждения частиц карбопола.

Для определения содержания парабенов в лабораторном образце геля была разработана методика хромато-масс-спектрометрического анализа (ВЭЖХ-МС). Навеску образца растворяли в подвижной фазе для ВЭЖХ, центрифугировали (12 000 об/мин в течение 10 мин), фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и анализировали при помощи хромато-масс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки Symmetry C_{18} 250×4,6 мм, 5 мкм (Waters, США). Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспрей ионизацией (ESI). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : вода 50 : 50 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Регистрацию масс-спектров вели в области отрицательных и положительных ионов. Обрабатывали результаты при помощи программного обеспечения MassLynx

Для качественного и количественного определения консервантов использовали стандартные растворы их коммерческих препаратов: метилпарагидроксибензоат и пропилпарагидроксибензоат (Sigma Aldrich).

На рис. 1 представлена хроматограмма стандартного раствора метил- и пропилпарабенов, которые имеют максимум поглощения при 255 нм (рис. 2).

В масс-спектрах в области отрицательных ионов метилпарабен идентифицируется по молекулярному иону с m/z 151,35, что соответствует $[M–H]^-$, а пропилпарабен – по молекулярному иону с m/z 179,53, что соответствует $[M–H]^-$(рис. 3).

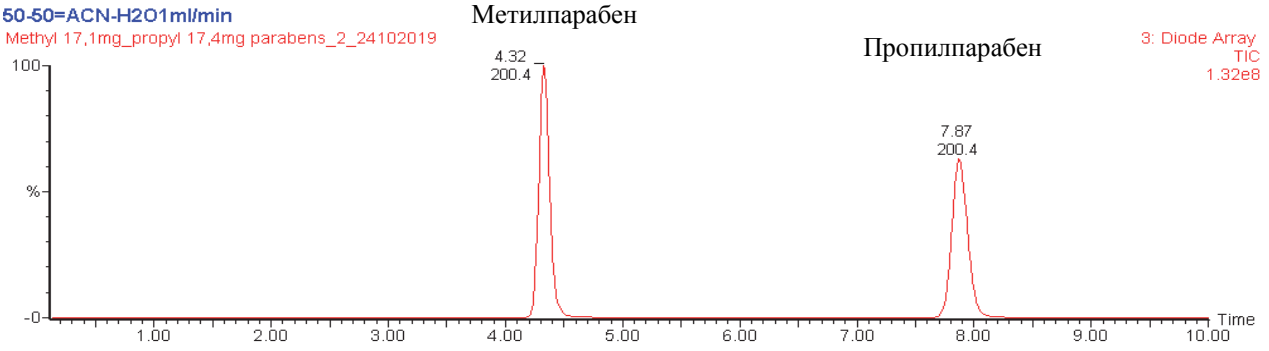
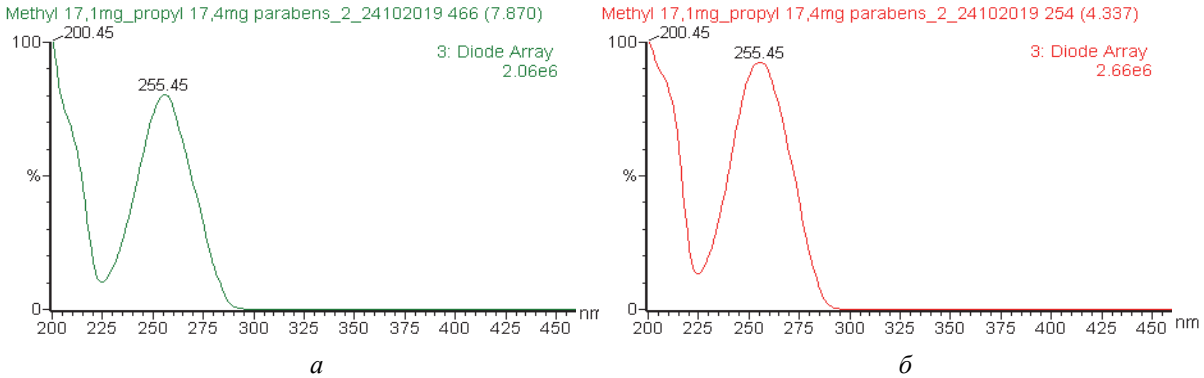


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора метилпарабена и пропилпарабена



а *б*

Рис. 2. Электронные спектры метилпарабена (*а*) и пропилпарабена (*б*)

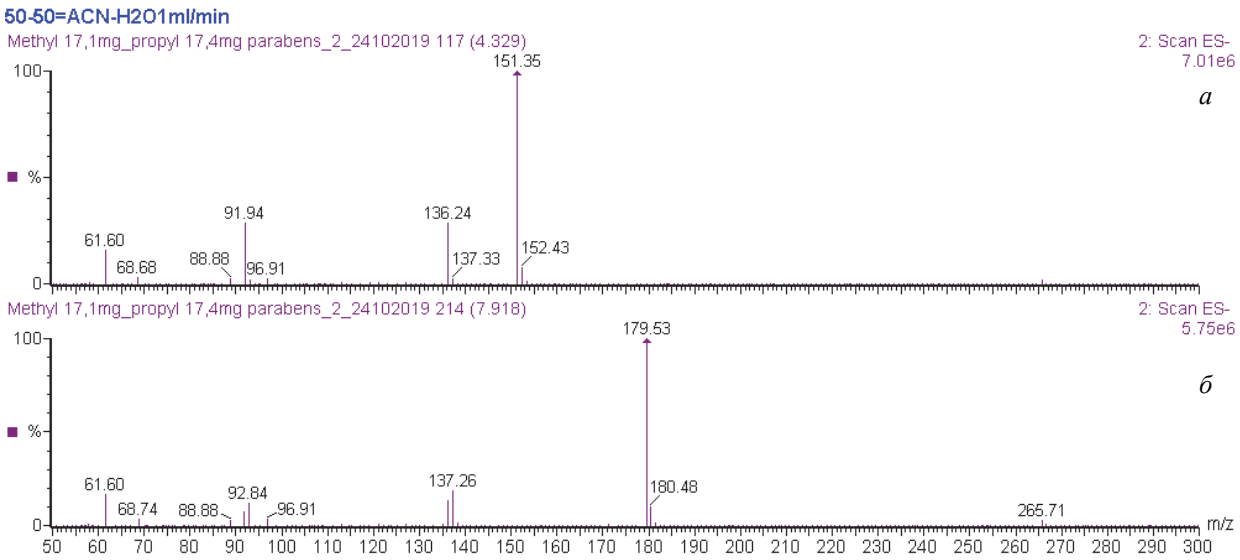


Рис. 3. Масс-спектры в области отрицательных ионов метилпарабена (*а*) и пропилпарабена (*б*)

Стабильность разрабатываемого состава геля изучали в соответствии с ТКП 431-2012 (ускоренный режим: температура 40°С, влажность 75%, продолжительность 6 месяцев). Отбор проб производили ежемесячно. Результаты исследований представлены в таблице.

Результаты исследования стабильности лекарственной формы

Срок хранения, сут	Значение pH	Суммарное содержание флавоноидов, мг-экв галловой кислоты/г геля	Содержание метилпарабена, мг/г геля	Содержание пропилпарабена, мг/г геля
0	6,68	0,9103	88,60	33,40
30	6,65	0,8531	89,03	33,64
60	6,64	0,9208	89,42	32,68
90	6,62	0,9869	88,24	33,08

Результаты проведенных исследований показывают, что разработанная лекарственная форма на основе комплекса флавоноидов стабильна по параметрам pH, содержание фенольных соединений и консервантов (параметры изменяются в пределах 10%) в течение 90 сут от начала эксперимента. На следующем этапе выполнения НИР планируется проведение испытаний по биологической активности лекарственной формы с применением подопытных животных.

Заключение. Таким образом, разработана рецептура геля на основе комплекса флавоноидов, включающая в себя активные компоненты, консерванты и вспомогательные вещества. Для изучения стабильности лекарственной формы были разработаны методики анализа качества, включающие спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов, количественное определение консервантов (метилпарабена и пропилпарабена) с помощью метода ВЭЖХ-МС. В ходе испытаний также был проведен визуальный контроль окраски и консистенции геля, которые не изменялись в течение 90 сут от начала эксперимента. В результате выполнения серии экспериментов подтверждена стабильность лекарственной формы по физико-химическим параметрам, что позволяет сделать вывод о возможности наработки лабораторной партии геля и дальнейшем изучении его биологической активности.

Список литературы

1. Andersen O. M., Markham K. R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Ratton: CRC Press, 2006. 1197 p.

2. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский [и др.]. Пущино: Synchrobook, 2013. 310 с.

3. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview // Journal of Nutritional Science. 2016. Vol. 5. P. 1–15.

4. Role of Flavonoids as Wound Healing Agent / Muhammad Shahzad Aslam [et al.] // Intechopen.com. URL: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79179 (дата обращения: 01.10.2019).

5. Evaluation of burn wound healing potential of aqueous extract of Morus alba based cream in rats / N. Bhatia [et al.] // The Journal of Phytopharmacology. 2014. Vol. 3 (6). P. 378–383.

6. Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea Carnea* Jacq. / S. Ambiga [et al.] // Ancient Science of Life. 2007. Vol. 3. P. 45–51.

7. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides // Patents.google.com. URL: www.google.com/patents/US20120087980 (дата обращения: 01.10.2019).

8. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных средств: отечественный и международный опыт / И. В. Сакаева [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2013. № 3. С. 8–11.

9. Карбополы. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Карбополы (дата обращения: 11.03.2019).

10. Виноградова И. Парабены: правда и вымысел // Season of Beauty. 2012. № 4. С. 32–35.

11. Пропиленгликоль (пропандиол) // Propylen-glycol.ru. URL: http://www.propylen-glycol.ru/medicine.php (дата обращения: 11.09.2019).

12. Методы выделения и анализа флавоноидов высших растений и исследования их активности в отношении ризобактерий / С. А. Коннова [и др.]. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 2015. 31 с.

References

1. Andersen O. M., Markham K. R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Ratton, CRC Press, 2006. 1197 p.

2. Tarakhovsky Yu. S., Kim Yu. A., Abrasilov B. S., Muzafarov E. N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina* [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino, Synchrobook Publ., 2013. 310 p.

3. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, vol. 5, pp. 1–15.

4. Muhammad Shahzad Aslam, Muhammad Syarhabil Ahmad, Humayun Riaz, Syed Atif Raza, Shahzad Hussain, Omer Salman Qureshi, Povydysh Maria, Zainab Hamzah, Osama Javed. Role of Flavonoids as Wound Healing Agent. Available at: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79179 (accessed 01.10.2019).

5. Bhatia N., Singh A., Sharma R., Singh A., Soni V., Singh G., Bajaj J., Dhawan R., Singh B. Evaluation of burn wound healing potential of aqueous extract of Morus alba based cream in rats. *The Journal of Phytopharmacology*, 2014, vol. 3 (6), pp. 378–383.

6. Ambiga S., Narayanan R., Durga G., Sukumar D., Madhavan S. Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea Carnea* Jacq. *Ancient Science of Life*, 2007, vol. 3, pp. 45–51.

7. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides. *Parents.google.com.* Available at: www.google.com/patents/US20120087980 (accessed 01.10.2019).

8. Sakaeva I. V., Bunyatyan N. D., Kovaleva E. L., Sakanyan E. I., Mit'kina L. I., Prokopov I. A., Shelekhina E. S., Mit'kina Yu. V. Basic approaches drug stability studies: domestic and international experience. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* [The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products], 2013, no 3, pp. 8–11 (In Russian).

9. Karbopoly [Carbopols]. Available at: https://ru.wikipedia.org/wiki/Карбополы (accessed 11.03.2019).

10. Vinogradova I. Parabens: the trutn and the fiction. *Season of Beauty*, 2012, no 4, pp. 32–35 (In Russian).

11. *Propylenglykol' (propandiol)* [Propylenglycol (propandiol)]. Available at: http://www.propylen-glycol.ru/medicine.php (accessed 11.09.2019).

12. Konnova S. A., Kanevsky M. V., Aliyeva Z. O., Shuvalova E. P. *Metody vydeleniya i analiza flavonoidov vysshikh rasteniy i issledovaniya ikh aktivnosti v otnoshenii rizobakteriy* [Methods of isolation and analysis of flavonoids of higher plants and studies of their activity against rhizo-bacteria]. Saratov, Izdatel'stvo Saratovskogo Universitrta Publ., 2015. 31 p.

Информация об авторах

Феськова Елена Владимировна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Бесараб Анна Юрьевна – магитрант. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: annabesarab@rambler.ru

Игнатовец Ольга Степановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatovets@belstu.by

Леонтьев Виктор Николаевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

Адамцевич Наталья Юрьевна – аспирант кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: natali_adamcevi@mail.ru

Information about the authors

Feskova Alena − PhD (Engineering), Senior Researcher, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feskova@mail.ru

Besarab Anna Yur'yevna – Master's degree student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail annabesarab@rambler.ru

Ignatovets Olga Stepanovna – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatovets@belstu.by

Leontiev Viktor Nikolaevich − PhD (Chemistry), Associate Professor, Head of the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Adamtsevich Natallia Yur'yevna – PhD student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natali_adamcevi@mail.ru

Поступила 20.04.2020