

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВ

УДК 615.451.35:577.164.3:582.991.152 DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2024.4.37>

О. А. Сушинская, Н. С. Голяк

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В КОМБИНИРОВАННОМ СПРЕЕ

Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

В статье представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в комбинированном спрее, содержащем ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой, методом спектрофотометрии.

Разработка методики включала определение оптимальной концентрации алюминия хлорида, подбор отношения объема аликвоты комбинированного спрея к объему комплексообразователя, времени реакции комплексообразования. Валидационные испытания проведены в соответствии с требованиями Руководства по валидации аналитических методик ЕАЭС, а также фармакопейными требованиями.

В ходе испытаний установлено, что оптимальным соотношением аликвоты спрея к комплексообразователю является 1 : 5 с использованием 3% спиртового раствора алюминия хлорида и продолжительностью реакции 40 минут. Содержание суммы флавоноидов в трех опытно-промышленных сериях с использованием валидированной методики составило от 0,0149 до 0,0160%. Валидационные испытания доказали специфичность, линейность и прецизионность методики. Коэффициенты корреляции для валидационных характеристик полностью соответствовали установленным требованиям.

Ключевые слова: жидкий экстракт, полынь горькая, количественное определение, флавоноиды, спрей, спектрофотометрия, валидация.

ВВЕДЕНИЕ

Полынь горькая является перспективным видом фармакопейного растительного сырья для разработки новых противовоспалительных средств. По литературным данным, полыни горькой трава содержит широкий спектр биологически активных веществ. Одной из групп являются флавоноиды, в том числе рутин, кверцетин, гесперидин и другие флавоноидные гликозиды, включая кверцетин-3-О-д-глюкозид, изокверцитрин, кверцетин-3-О-рамноглюкозид, изорамнетин-3-глюкозид, изорамнетин-3-О-рамноглюкозид, которые обуславливают противовоспалительную активность данного вида лекарственного сырья [1].

Одним из этапов фармацевтической разработки является подбор и валидация аналитических методик для количественного определения действующих веществ в лекарственном препарате. Для количе-

ственного определения флавоноидов одной из самых распространенных методик является спектрофотометрия [2].

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в комбинированном спрее, содержащем жидкий экстракт полыни горькой.

Работа выполнена в рамках ГПНИ 2 – Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия – подпрограммы 2.2 – Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы) – задания 2.2.3 – Получить и стандартизировать экстракционные лекарственные формы с повышенным содержанием биологически активных веществ (№ государственной регистрации 20220401 от 30.03.2022).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись

опытно-промышленные серии комбинированного спрея, содержащего ибупрофен как НПВС и жидкий экстракт полыни горькой как растительный компонент. При разработке состава комбинированного спрея использовали жидкий экстракт полыни горькой 1 : 1, полученный методом реперколяции (экстрагент – спирт этиловый 70%) [3]. Для разработки методики применялись следующие реактивы и оборудование: стандартный образец (СО) рутина (95%, Sigma-Aldrich), алюминий хлористый 6-водный (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», ГОСТ 3759-75), ледяная уксусная кислота (х.ч., АО «ЛенРеактив», ГОСТ 61-75), спектрофотометр Varian Cary®50 (Agilent Technologies Inc., США).

При разработке методики количественного определения флавоноидов в комбинированном спрее методом спектрофотометрии руководствовались методиками, приведенными в Государственной фармакопее Республики Беларусь, Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд., Фармакопее Евразийского экономического союза [2, 4, 5].

Методика определения основана на реакции комплексообразования флавоноидов

с алюминия хлоридом. На первом этапе исследований определяли оптимальные условия проведения методики, которые включали выбор концентрации алюминия хлорида, определение времени реакции комплексообразования, а также отношения объема аликвоты комбинированного спрея к объему комплексообразователя.

Количественное содержание флавоноидов в комбинированном спрее, согласно предложенной методике, рассчитывали в пересчете на рутин [2].

Для выбранной методики были проведены валидационные испытания, которые выполнялись в соответствии с требованиями Руководства по валидации аналитических методик ЕАЭС, а также фармакопейными требованиями. Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением программного пакета Microsoft Excel 2016 [6–8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор оптимальных условий для количественного определения суммы флавоноидов в комбинированном спрее представлен в таблице 1.

Таблица 1. – Определение оптимальных условий количественного определения флавоноидов в спрее

Фактор	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % (м/об)		
Объем и концентрация раствора алюминия хлорида, $\bar{x} \pm S$ (n = 6)			
Соотношение	2% (м/об)	3% (м/об)	5% (м/об)
1:1	0,0127 ± 0,0002	0,0124 ± 0,0010	0,0114 ± 0,0003
1:2	0,0122 ± 0,0008	0,0128 ± 0,0009	0,0120 ± 0,0017
1:3	0,0102 ± 0,0003	0,0127 ± 0,0005	0,0117 ± 0,0001
1:4	0,0119 ± 0,0002	0,0119 ± 0,0009	0,0119 ± 0,0005
1:5	0,0121 ± 0,0007	0,0142 ± 0,0004	0,0130 ± 0,0003
Время комплексообразования при добавлении 3% раствора алюминия хлорида в соотношении 1 : 5, минуты			
30	0,0128 ± 0,0003		
40	0,0149 ± 0,0011		
50	0,0139 ± 0,0017		
60	0,0134 ± 0,0014		

Как видно из табличных значений, наилучшие результаты показал раствор алюминия хлорида в концентрации 3% при соотношении 1 : 5. Содержание суммы флавоноидов при использовании данного соотношения и концентрации статистически значимо отличалось от других условий ($p < 0,05$, $P = 95\%$, критерий Стьюдента).

По результатам эксперимента время реакции комплексообразования выбрали 40 минут.

На рисунке 1 представлены УФ-спектры комбинированного спрея и комплекса рутина с раствором комплексообразователя.

Как следует из полученных УФ-

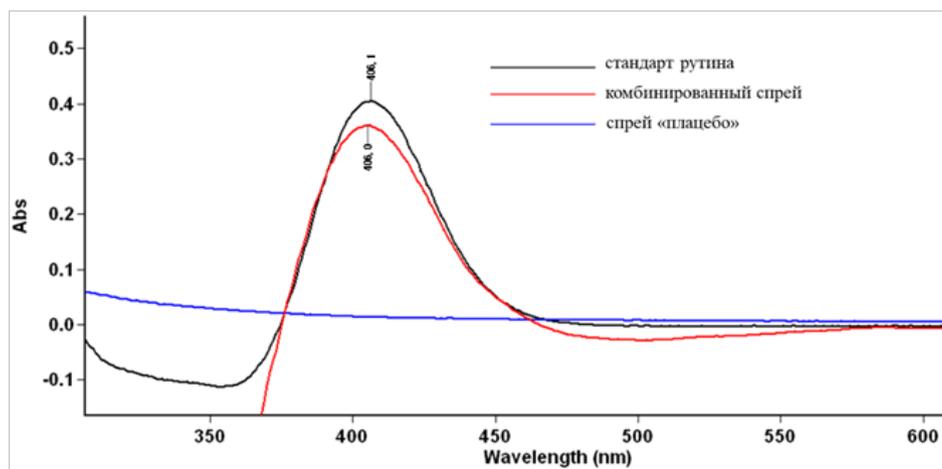


Рисунок 1. – УФ-спектры комбинированного спрея, комплекса рутина и спрея «плацебо» с раствором комплексообразователя

спектров, для флавоноидов в комбинированном спрее максимальное поглощение наблюдается при длине волны 405 ± 4 нм, для раствора рутина при 405 ± 2 нм. На УФ-спектре спрея «плацебо», не содержащего жидкий экстракт полыни, пик поглощения отсутствует, что подтверждает специфичность методики для количественного определения флавоноидов в разработанном составе спрея при выбранной длине волны.

По результатам подбора оптимальных условий выбрана следующая методика.

Перед началом выполнения методики готовили 3% раствор алюминия хлорида *P* (м/об) в этиловом спирте 50% *P* (об/об).

Испытуемый раствор ($A_{исп}$): к 3,0 мл комбинированного спрея добавляли 15,0 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида *P* (м/об), доводили до объема 25 мл 50% этиловым спиртом *P* (об/об) и оставляли на 40 минут.

Компенсационный раствор (A_k): 3,0 мл комбинированного спрея вносили в колбу и доводили до 25 мл 50% этиловым спиртом *P* (об/об).

Раствор сравнения ($B_{рвт}$): к 0,050 г (точная навеска) рутина добавляли 70 мл 50% этилового спирта *P* (об/об), помещали на водяную баню, после полного охлаждения колбы раствор доводили до объема 100 мл 50% этиловым спиртом *P* (об/об). К 1,0 мл раствора Б СО рутина добавляли 5,0 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида *P* (м/об) и 1–2 капли уксусной кислоты *P*, раствор доводили до метки 50% этиловым спиртом *P* (об/об).

Компенсационный раствор (B_k): к 1,0 мл

раствора Б СО рутина добавляли 1–2 капли уксусной кислоты *P* и доводили 50% этиловым спиртом *P* (об/об) до объема 25 мл.

Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора ($A_{исп}$) и раствора сравнения ($B_{рвт}$) при длине волны 405 ± 4 через 40 минут, используя компенсационные растворы A_k и B_k соответственно.

Концентрация спирта этилового в 50% для приготовления растворов выбрана исходя из его количественного определения в комбинированном спрее методом газовой хроматографии в предыдущих исследованиях [9].

Содержание флавоноидов в комбинированном спрее вычисляли по следующей формуле (% м/об):

$$\frac{A \times a_0 \times 25 \times V_0 \times P \times 100}{A_0 \times V \times 100 \times 25 \times 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора ($A_{исп}$);

A_0 – оптическая плотность СО рутина ($B_{рвт}$);

V – объем спрея, взятый для анализа, мл;

a_0 – навеска СО рутина, г;

V_0 – объем аликвоты СО рутина ($B_{рвт}$), мл;

P – чистота СО (содержание рутина в СО), %.

Для оценки линейности предложенного метода были подготовлены растворы с пятью уровнями концентрации от 70% до 130% с шагом 10%. Область применения

методики определялась значениями, попадающими в зону линейности. Результаты

определения линейности представлены на рисунке 2 и в таблице 2.

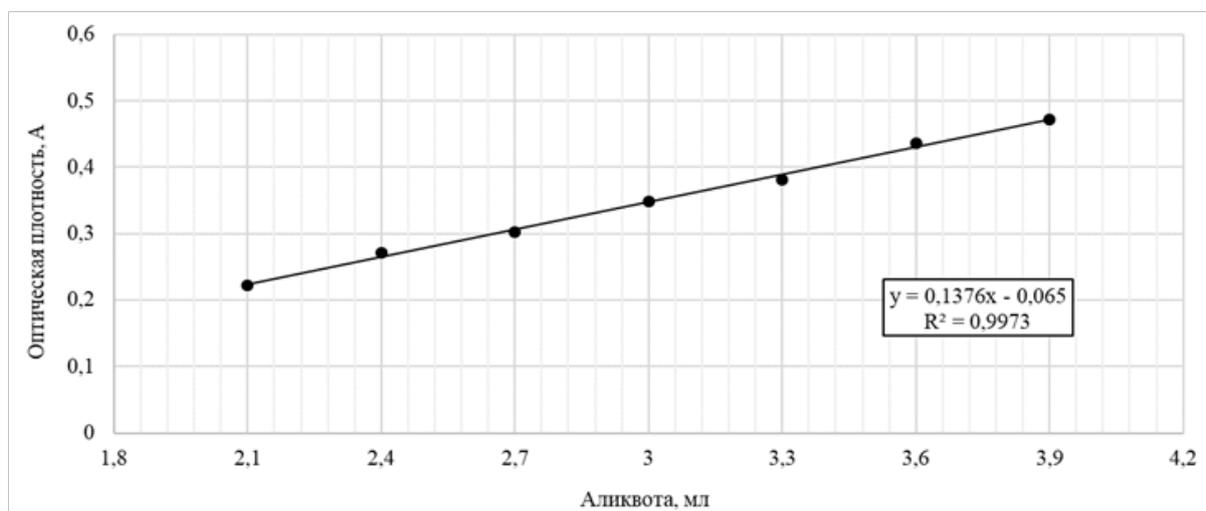


Рисунок 2. – График зависимости оптической плотности от содержания флавоноидов в аликвоте

Таблица 2. – Определение линейности методики количественного определения флавоноидов в комбинированном спрее

№	Содержание флавоноидов, % (м/об) от нормируемого значения	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность
1	70	2,1	0,223
2	80	2,4	0,271
3	90	2,7	0,303
4	100	3,0	0,348
5	110	3,3	0,382
6	120	3,6	0,436
7	130	3,9	0,472

Критерием линейности методики является коэффициент корреляции, который должен быть не менее 0,9950. Как видно из представленного графика, концентрация флавоноидов в аликвотах комбинированного спрея имеет линейный характер. Значения коэффициентов детерминации (R^2) и корреляции (r) составили 0,9973 и 0,9986 соответственно.

Валидационные испытания по параметру «правильность» проводили путем добавления к испытуемым растворам стандарта рутина. Готовили 9 испытуемых растворов, в 3 из которых рутин добавляли в количестве 25% от его исходного содержания в комбинированном спрее, в следующие 3 раствора – в количестве 50%, и в последние 3 – 75%. Результаты определения правильности представлены в таблице 3.

Результаты оценивали по извлекаемости

методики (степени извлечения, открываемости), это значение должно находиться в пределах $100 \pm 5\%$. Среднее значение извлекаемости составило $100,3 \pm 0,6\%$, что соответствует установленным требованиям.

Прецизионность внутри методики (сходимость) определяли в 6 повторностях. Результаты определения представлены в таблице 4.

Для оценки данного валидационного показателя рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD), которое должно быть не более 5%. По результатам испытаний RSD составило 2,0%, что удовлетворяет критериям.

Для оценки влияния различных факторов на результаты испытания в идентичных аликвотах необходимо определение промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности. Для этого методику про-

Таблица 3. – Результаты испытания правильности методики для комбинированного спрея

№	Исходная концентрация флавоноидов в спрее, % (м/об)	Добавление СО рутин, %	Ожидаемый результат, %	Полученный результат, %	Абсолютная ошибка, %	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1	0,0149	25	0,0186	0,0184	0,00017	99,1	$f = 8$ $\bar{x} = 100,3$ $S = 0,61$ $S_r = 0,0061$ $P = 95\%$ $t(P,f) = 2,306$ $\Delta \bar{x} = 0,4689$ $\bar{\varepsilon} = 0,47\%$
2		25	0,0186	0,0186	-0,00004	100,2	
3		25	0,0186	0,0187	-0,00012	100,7	
4		50	0,0224	0,0226	-0,00022	101,0	
5		50	0,0224	0,0223	-0,00007	99,7	
6		50	0,0224	0,0225	-0,00005	100,2	
7		75	0,0261	0,0263	-0,00016	100,6	
8		75	0,0261	0,0263	-0,00025	100,9	
9		75	0,0261	0,0261	-0,00004	100,1	

Таблица 4. – Результаты определения сходимости для комбинированного спрея

№	Количественное определение флавоноидов в пересчете на рутин, % (м/об)	Метрологические характеристики
1	0,0145	$f = 5$ $x = 1,50 \cdot 10^{-2}$ $S = 3,27 \cdot 10^{-4}$ $S_r = 0,022$ $P = 95\%$ $t(P,f) = 2,571$ $\Delta \bar{x} = 3,43 \cdot 10^{-4}$ $\bar{\varepsilon} = 2,29\%$
2	0,0147	
3	0,0153	
4	0,0152	
5	0,0152	
6	0,0148	

водили в разные дни двое аналитиков. Результаты представлены в таблице 5.

Для оценки данного показателя использовали F-критерий (критерий Фишера). В соответствии с фармакопейными данными критическое значение F-критерия составляет 3,44, при этом экспериментальное значение составило 2,55, что меньше критического соответственно.

Полученные значения коэффициента вариации (CV) для промежуточной прецизионности менее 10%, что также удовлетворяет валидационным требованиям.

Количественное определение суммы флавоноидов в 3 опытно-промышленных сериях комбинированного спрея по валидированной методике представлены в таблице 6.

Таблица 5. – Результаты испытания промежуточной прецизионности методики для комбинированного спрея

№	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % (м/об)			
	Аналитик 1	Метрологические характеристики	Аналитик 2	Метрологические характеристики
1	0,0145	$f = 8$ $\bar{x} = 1,48 \cdot 10^{-2}$ $S = 3,32 \cdot 10^{-4}$ $S^2 = 1,10 \cdot 10^{-7}$ $S_r = 0,022$ $P = 95\%$ $t(P,f) = 2,306$ $\Delta \bar{x} = 2,55 \cdot 10^{-4}$ $\bar{\varepsilon} = 1,72\%$	0,0149	$f = 8$ $\bar{x} = 1,51 \cdot 10^{-2}$ $S = 5,29 \cdot 10^{-4}$ $S^2 = 2,80 \cdot 10^{-7}$ $S_r = 0,035$ $P = 95\%$ $t(P,f) = 2,306$ $\Delta \bar{x} = 4,07 \cdot 10^{-4}$ $\bar{\varepsilon} = 2,69\%$
2	0,0148		0,0141	
3	0,0149		0,0159	
4	0,0150		0,0155	
5	0,0155		0,0155	
6	0,0146		0,0147	
7	0,0151		0,0154	
8	0,0145		0,0151	
9	0,0146		0,0152	

Таблица 6. – Количественное определение суммы флавоноидов в опытно-промышленных сериях комбинированного спрея

№ серии	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % (м/об)
1	0,0152 ± 0,0002
2	0,0151 ± 0,0002
3	0,0154 ± 0,0004

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований предложена методика количественного определения суммы флавоноидов в комбинированном спрее, содержащем ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой. В ходе испытаний установлено, что оптимальным соотношением аликвоты к комплексообразователю является 1 : 5 с использованием 3% спиртового раствора алюминия хлорида и продолжительностью реакции в 40 минут. По результатам валидационных испытаний доказано, что разработанная методика является специфичной и линейной, прецизионной в пределах диапазона применения, что подтверждает ее соответствие фармакопейным требованиям. Таким образом, предложенная методика является эффективным и воспроизводимым инструментом для анализа содержания флавоноидов в разработанной лекарственной форме. Содержание суммы флавоноидов в 3 опытно-промышленных сериях с использованием валидированной методики составило от 0,0149 до 0,0160%. Методика может быть рекомендована для внесения в проект нормативного документа по качеству разрабатываемого лекарственного препарата, а также для контроля качества комбинированного спрея по показателю «Количественное определение».

SUMMARY

O. A. Sushinskaya, N. S. Golyak
DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF FLAVONOIDS ASSAY METHOD
IN A COMBINED SPRAY

The article presents the results of development and validation of flavonoids assay method in a combined spray containing ibuprofen and liquid extract of wormwood by spectrophotometry.

The development of the method included determination of the optimal concentration of aluminum chloride, selection of the ratio of the aliquot volume in the combined spray to

the volume of the complexing agent and the reaction time of complexation. Validation tests were conducted in accordance with the requirements of the EAEU Guidelines for the Validation of Analytical Methods, as well as pharmacopoeial requirements.

In the course of the tests, it was found that the optimal ratio of spray aliquot to complexing agent is 1 : 5 using 3% alcohol solution of aluminum chloride and with the reaction duration of 40 minutes. The content of flavonoids amount in three pilot batches using validated methodology ranged from 0.0149 to 0.0160%. Validation tests have proven specificity, linearity, accuracy and precision of the technique. The correlation coefficients and variations for the validation characteristics fully met the established requirements.

Keywords: liquid extract, wormwood, assay, flavonoids, spray, spectrophotometry, validation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chemical Composition and Biological Uses of *Artemisia absinthium* (Wormwood) / R. R. Bhat, M. U. Rehman, A. Shabir [et al.] // Plant and Human Health / ed.: M. Ozturk, K. R. Hakeem. – Cham: Springer, 2019. – Vol. 3: Pharmacology and Therapeutic Uses. – P. 37–63.

2. ФС.3.4.0006.18 Полыни горькой травы настойка // Государственная фармакопея Российской Федерации: введ. в действие с 1 дек. 2018 г. приказом М-ва здравоохранения РФ от 31 окт. 2018 г. № 749 / М-во здравоохранения РФ. – 14-е изд. – Москва: Медицина, 2018. – Т. 4. – С. 6714.

3. Сушинская, О. А. Технология получения жидкого экстракта полыни горькой и определение его показателей качества / О. А. Сушинская, Н. С. Голяк // Рецепт. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 474–483. – DOI: 10.34883/PI.2023.26.4.008.

4. Государственная фармакопея Республики Беларусь : (ГФ РБ II) : разработ. на основе Европ. Фармакопеи : в 2 т. : введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 25.04.2012 г. № 453. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении ; [под общ. ред. А. А. Шерякова]. –

Молодечно: Победа, 2012. – 1217 с.

5. Фармакопея Евразийского экономического союза. – Москва: Евразийская эконом. комис. – 2020. – Т. 1, ч. 1. – 584 с.

6. Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств : решение Коллегии Евраз. экон. комис. от 17 июля 2018 г. № 113. – URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01421237/clcd_20072018_113 (дата обращения: 29.10.2023).

7. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний = Вытворчасць лекавых сродкаў. Валідацыя методык выпрабаванняў : ТКП 432-2012 (02041). – Введ. 01.03.2013. – Минск: Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 18 с.

8. Производство лекарственных средств. Применение статистических методов при валидации: ТКП 438-2012 (02041). – Введ. 01.03.2013. – Минск: Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 32 с.

9. Сушинская, О. А. Количественное определение этанола в комбинированном спрее методом газовой хроматографии / О. А. Сушинская, Е. В. Феськова, Н. С. Голяк // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : рецензир. ежегод. сб. науч. тр. : в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред.: С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск: БГМУ, 2024. – Вып. 14. – Т. 2. – С. 155–161.

REFERENCES

1. Bhat RR, Rehman MU, Shabir A, Mir MU, Ahmad A, Khan R, et al. Chemical Composition and Biological Uses of *Artemisia absinthium* (Wormwood). In: Ozturk M, Hakeem KR, editors. Plant and Human Health. Cham, Switzerland: Springer; 2019. Vol. 3, Pharmacology and Therapeutic Uses. p. 37–63

2. FS.3.4.0006.18 Wormwood tincture. In: Ministerstvo zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii. Gosudarstvennaia farmakopeia Rossiiskoi Federatsii: vved v deistvie s 1 dek 2018 g prikazom M-va zdravookhraneniia RF ot 31 okt 2018 g № 749. 14-e izd. Moskva, RF: Meditsina; 2018. T. 4. s. 6714. (In Russ.)

3. Sushinskaia OA, Goliak NS. Technology of obtaining liquid extract of wormwood

and determination of its quality indicators. Retsept. 2023;26(4):474–83. doi: 10.34883/PI.2023.26.4.008. (In Russ.)

4. Ministerstvo zdravookhraneniia Respubliki Belarus', Tsentr ekspertiz i ispytaniia v zdravookhraneniia. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: v 2 t. T. 1, General methods of quality control of medicines. Sheriakov AA, redactor. Molodechno, RB: Pobeda; 2012. 1217 s. (In Russ.)

5. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. Moskva, RF: Evraziiskaia ekonom komis; 2020. T. 1, ch. 1. 584 s. (In Russ.)

6. On approval of the Guidelines for the validation of analytical methods for testing medicinal products : reshenie Kollegii Evraz ekon komis ot 17 iulija 2018 g № 113. URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01421237/clcd_20072018_113 (data obrashcheniia 2023 Noiab 29). (In Russ.)

7. Manufacturing of medicinal products. Validation of test methods : ТКП 432-2012 (02041). Vved 2013 Mart 1. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniia Resp Belarus'; 2012. 18 s. (In Russ.)

8. Manufacturing of medicinal products. Application of statistical methods in validation : ТКП 438-2012 (02041). Vved 2013 Mart 1. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniia Resp Belarus'; 2012. 32 s. (In Russ.)

9. Sushinskaia OA, Fes'kova EV, Goliak NS. Quantitative determination of ethanol in a combined spray by gas chromatography. V: Ministerstvo zdravookhraneniia Respubliki Belarus', Belorusskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet. BGMU v avangarde meditsinskoi nauki i praktiki : retsenzir ezhegod sb nach tr : v 2 t. Rubnikovich SP, Filoniuk VA, redaktory. Minsk, RB: BGMU; 2024. Vyp. 14. t. 2. s. 155–61. (In Russ.)

Адрес для корреспонденции:

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, корп. 15,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
кафедра фармацевтической технологии
с курсом повышения квалификации
и переподготовки,
тел. раб.: +375 17 279-42-54,
e-mail: sushinskayaoa@gmail.com,
Сушинская О. А.

Поступила 23.12.2024 г.