

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТЕ ПИОНА САДОВОГО СУХОМ

Н.И. Накарякова

Ассистент, Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации
E-mail: nataly-5114@mail.ru

Е.Н. Люст

к.фарм.н., Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации

М.М. Смирнова

к.фарм.н., Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации

О.А. Олешко

д.фарм.н., Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации

С целью обеспечения эффективности и безопасности фармацевтической продукции обязательным является установление соответствия качества лекарственных препаратов регламентируемым нормам с использованием аналитических методов, пригодных для предполагаемого их применения в оценке качества. Поэтому большое значение при создании лекарственных растительных препаратов приобретает разработка и валидационная оценка методик количественного анализа биологически активных веществ. Приведены результаты валидации методики количественного определения флавоноидов, как одной из основных групп действующих веществ, в экстракте пиона садового сухом.

Ключевые слова: пион садовый, экстракт сухой, валидация, флавоноиды.

Для цитирования: Накарякова Н.И., Люст Е.Н., Смирнова М.М., Олешко О.А. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте пиона садового сухом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(4):3–7. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-01

Пион известен как «король растений», такое название он заслужил за красоту цветов и широкое применение в медицине [1]. В XIX в. пион молочнокветковый (*Paeonia lactiflora*), уникальный дикорастущий предок китайских сортов, был завезен в Европу и дал начало многим новым сортам посредством межвидовой гибридизации с пионом лекарственным (*Paeonia officinalis*) [2]. В культуре более распространенными являются пионы садовых сортов, которые наравне с пионом уклоняющимся вызывают интерес с точки зрения медицинского применения.

Ранее проведенными испытаниями авторами установлено сходство пиона садового и пиона уклоняющегося по показателям качества (макроскопический анализ, микроскопия, числовые показатели, качественный анализ, количественное определение) согласно ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося», что свидетельствует о возможности применения пиона садовых сортов в качестве источника сырья для изготовления экстракционных препаратов [3].

Одной из основных групп биологически активных веществ пиона являются флавоноиды. Для

флавоноидов характерно сочетание низкой токсичности с достаточно широким спектром терапевтического действия (противовоспалительное, бактерицидное, гипотензивное, противоатеросклеротическое, желчегонное, кровоостанавливающее, диуретическое, седативное). Большое значение имеет противовоспалительный эффект флавоноидов, с которым, вероятно, связаны их жаропонижающее, противозвонное, ранозаживляющее и вяжущее действие [4]. В последние годы установлено, что фенольные соединения растительного происхождения оказывают разнообразное влияние на нервную систему, взаимодействуя со специфическими рецепторами на поверхности нейронов и клеток микроглии, защищая нервные клетки от окислительного стресса [2]. Многие флавоноиды, такие как кверцетин, рутин, гесперидин, нарингенин и др., обладают способностью воздействовать на когнитивные функции и поведенческие реакции [5].

В системе обеспечения качества фармацевтической продукции важную роль играет аналитический контроль как сырья, так и готового продукта. Для того чтобы аналитическая методика могла быть включена в нормативную документацию, она

должна гарантировать достоверные и точные результаты. Поэтому методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания, подлежат процедуре валидации (аттестации).

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – разработка и валидационная оценка методики спектрофотометрического определения содержания суммы флавоноидов в экстракте пиона садового сухом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экстракт пиона садового сухой получали на кафедре фармацевтической технологии Пермской государственной фармацевтической академии с применением трехкратной экстракции при определенных условиях с последующим высушиванием методом распылительной сушки [6].

Стандартизацию полученного экстракта осуществляли по одной из основных групп биологически активных веществ травы пиона – флавоноидам. Количественный анализ суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте пиона садового сухом проводили спектрофотометрическим методом по методике количественного определения суммы флавоноидов в траве зверобоя, модифицированной авторами применительно к экстракту пиона [7, 8].

В качестве стандартного образца (СО) использовали рутин (Quercetin-3-rutinoside, номер в каталоге 153-18-4, чистота – более 98,5%).

Валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте пиона садового сухом проводили методом математической статистики по следующим показателям: прецизионность (в условиях повторяемости), внутрिलाбораторная прецизионность (воспроизводимость), линейность, правильность.

Для изучения прецизионности методики устанавливали повторяемость, которая характеризует степень совпадения результатов индивидуальных испытаний при многократном использовании. Она выражается величиной стандартного отклонения методики $S_{\bar{x}}$ (коэффициент вариации).

Внутрिलाбораторную прецизионность (воспроизводимость) оценивали на идентичных образцах в условиях одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование) [8]. Воспроизводимость оценивали по коэффициенту вариации $S_{\bar{x}}$, который не должен превышать 10% [9].

Линейность методики устанавливали на основании результатов количественного определения, которые пропорциональны концентрации анализируемого вещества. Для обоснования линейной зависимости рассчитывали уравнение регрессии ($y = bx + a$) и коэффициент корреляции r , величина которого должна быть близка к единице.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истину. Для оценки правильности методики количественного определения применяли подход, предполагающий анализ с использованием стандартного образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования с целью усовершенствования методики был подобран растворитель. При исследовании растворимости пиона садового экстракта сухого установлено, что оптимальным растворителем для пиона садового экстракта сухого является вода очищенная; содержание флавоноидов при этом составляет $5,93 \pm 0,25\%$. При использовании спирта этилового 40%-ного выход флавоноидов составляет $5,23 \pm 0,18\%$, спирта этилового 70%-ного – $5,39 \pm 0,27\%$, спирта этилового 95%-ного – $5,20 \pm 0,17\%$.

Методика. Навеску экстракта 0,1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл воды очищенной, объем доводили водой очищенной до метки (раствор А). Затем 1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и 1 каплю разведенной уксусной кислоты, перемешивали. Объем раствора доводили до метки 95%-ным этанолом. Через 40 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 1 капли разбавленной уксусной кислоты, доведенный до метки 95%-ным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл [7, 8].

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) определяли по формуле

$$X = \frac{A_x \times a_0 \times 25 \times 100}{A_0 \times a_x \times (100 - W)},$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО ру-

тина; a_x – масса экстракта сухого, г; a_0 – масса СО рутина, г; W – потеря в массе экстракта при высушивании, %.

Для оценки прецизионности проводили шесть параллельных определений в условиях одной лаборатории (табл. 1). Метрологические характеристики методики анализа представлены в табл. 2.

Результаты, представленные в табл. 1 и 2, достоверны при доверительной вероятности $p = 95\%$. Вычисленные значения коэффициента вариации $S_{\bar{x}}$ составили 0,84 и 0,99%; относительной ошибки среднего результата $\bar{\varepsilon}$ – 2,15 и 2,55%, они не превышают критериев приемлемости $\pm 5\%$, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости. Полученные значения внутрिलाбораторной прецизионности удовлетворяют критериям приемлемости ($1,30\% < 10\%$), что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Оценку линейности методики количественно-го анализа флавоноидов в сухом экстракте пиона

проводили на пяти уровнях концентраций 50–150% путем изменения навески экстракта. В результате установлено, что график зависимости оптической плотности от навески экстракта имеет линейный характер и описывается уравнением $y = 0,8816x + 0,0352$, а коэффициент корреляции близок к единице ($r = 0,998$). Полученные данные свидетельствуют о линейной зависимости значения оптической плотности от концентрации флавоноидов (табл. 3, рис. 1).

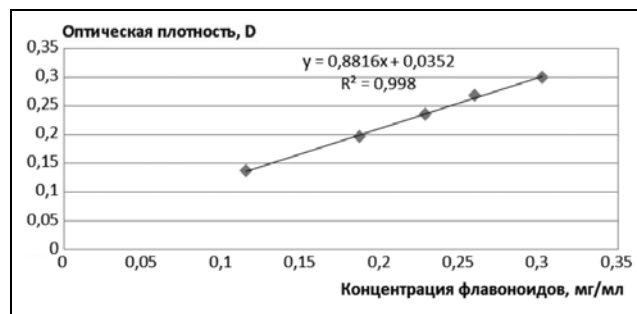


Рис. 1. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов

Таблица 1. Результаты оценки прецизионности методики количественного определения флавоноидов в пиона садового экстракте сухом

Повторность	Аналитик № 1		Аналитик № 2	
	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %
1	0,210	5,75	0,241	5,78
2	0,237	5,62	0,227	5,92
3	0,212	5,91	0,216	5,72
4	0,238	5,61	0,224	5,95
5	0,240	5,68	0,212	5,65
6	0,203	5,62	0,245	6,01

Таблица 2. Метрологические характеристики ($n = 6, p = 95\%$) методики

Аналитик	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$S_{\bar{x}}, \%$	$T(P,t)$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$S_{\bar{x}}, \%$ метода
№ 1	5	5,69	0,0137	0,1169	0,0477	0,84	2,57	0,3004	2,15	1,30
№ 2	5	5,84	0,0203	0,1425	0,0582	0,99	2,57	0,1495	2,55	

Таблица 3. Результаты оценки линейности методики

Концентрация флавоноидов, мг/мл	Оптическая плотность	Коэффициент корреляции	$y = bx + a$	
			b	a
0,1146	0,137	0,998	0,8816	0,0352
0,1861	0,197			
0,2276	0,235			
0,2588	0,268			
0,3016	0,299			

Таблица 4. Результаты оценки правильности методики

Уровень	Содержание флавоноидов, мг	Добавлено СО рутин, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Открываемость, %	Средний процент восстановления
1/1	4,440	1,490	5,930	5,701	96,13	96,46
1/2	4,511	1,490	6,001	5,747	95,76	
1/3	4,396	1,490	5,886	5,652	96,02	
2/1	2,880	2,980	5,860	5,683	96,98	
2/2	2,871	2,980	5,851	5,708	97,55	
2/3	2,920	2,980	5,900	5,657	95,88	
3/1	1,483	4,470	5,953	5,815	97,69	
3/2	1,290	4,470	5,760	5,497	95,43	
3/3	1,283	4,470	5,753	5,561	96,67	

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления известного количества РСО рутин к образцам на трех разных уровнях (концентрациях). Критерием приемлемости правильности методики является средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, средняя величина которого должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. В данной методике процент восстановления находился в пределах от 95,43 до 97,69% и его средняя величина составила 96,46%, что свидетельствует о правильности разработанной методики (табл. 4).

Выводы

1. Подобраны оптимальные условия количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте пиона садового сухом.
2. Проведена валидационная оценка разработанной методики. Установлено, что методика количественного анализа флавоноидов отличается правильностью, сходимостью, линейностью, прецизионностью в условиях повторяемости и воспроизводимости.
3. Данная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин может быть включена в проект нормативной документации на экстракт пиона садового сухой, что позволит достоверно

контролировать качество продукта на заключительном этапе его производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ni Jia, Qing-Yan Shu, Dan-Hua Wang. Identification and characterization of anthocyanins by High-performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry in Herbaceous Peony Species // J. Amer. Soc. Sci. 2008. № 133. P. 418–426.
2. Jäger A.K., Saaby L. Flavonoids and CNS // Molecules. 2011. V. 16. № 2. P. 1471–1485.
3. Накарякова Н.И., Смирнова М.М., Яборова О.В. и др. Сравнительное изучение травы пиона уклоняющегося и пиона садового // Фундаментальные исследования. 2014. № 11-2. С. 372–376.
4. Васфилова Е.С. Дикорастущие лекарственные растения Урала: учеб. пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. 2014. 204 с.
5. Тараховский Ю.С. Флавоноды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchrobook. 2013. 310 с.
6. Смирнова М.М., Люст Е.Н., Накарякова Н.И. и др. Исследование по созданию новых лекарственных средств на основе травы пиона садового // Биофармацевтический журнал. 2016. Т. 8. № 1. С. 9–12.
7. Смирнова М.М., Яборова О.В., Накарякова Н.И. и др. Определение суммы флавоноидов в траве пиона садового // Фундаментальные исследования. 2014. № 12. С. 164–168.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издание [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>. Заглавие с экрана. (Дата обращения: 03.07.2017).
9. ГОСТ Р ИСО 5725–2–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. М. 2002. 42 с.

Поступила 15 ноября 2017 г.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD OF THE FLAVONIDS IN THE DRY EXTRACT OF PEONY GARDEN

© Authors, 2018

N.I. Nakaryakova

Assistant, Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation

E-mail: nataly-5114@mail.ru

E.N. Lyust

Ph.D. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation

M.M. Smirnova

Ph.D. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation

O.A. Oleshko

Dr.Sc. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation

Confirmation of the quality of medicinal products by analytical methods is necessary to ensure the effectiveness and safety of pharmaceutical products. Therefore, the development and validation of methods of quantitative analysis of biologically active substances is great importance. Flavonoids are one of the main group of active substances in the dry extract of peony garden. The article is devoted to the development and validation of spectrophotometric determination of flavonoids in the dry extract of peony garden. At the first a selection of solvent was used to improve the methodology for the quantitative analysis of flavonoids given in the state pharmacopoeia. It was found that the optimum solvent for the dry extract of peony is water purified. Thus, the optimal conditions for the quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of rutin in the dry extract of peony were selected. The validation of the developed method was carried out according to the following indices: precision (repeatability), intralaboratory propriety (reproducibility), linearity, correctness. To study the precision of the technique, a repeatability was established. Repeatability characterizes the coincidence of the results of individual tests with repeated use. Reproducibility was evaluated on identical samples in one laboratory. The linearity of the method was established on the basis of quantitative determination results in proportion to the concentration of the analyte. To assess the correctness of the method of quantitative determination of flavonoids, a standard sample was used. As a result of the study it was established that the spectrophotometric determination of flavonoids in the dry extract of peony garden differs by the correctness, convergence, linearity, precision (repeatability) and reproducibility.

Keywords: *Peony garden, dry extract, validation, flavonoids.*

For citation: Nakaryakova N.I., Lyust E.N., Smirnova M.M., Oleshko O.A. Development and validation of the quantitative analysis method of the flavonoids in the dry extract of peony garden. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(4):3-7. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-01

REFERENCES

1. Ni Jia, Qing-Yan Shu, Dan-Hua Wang. Identification and characterization of anthocyanins by High-performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry in Herbaceous Peony Species // J. Amer. Soc. Sci. 2008. № 133. P. 418-426.
2. Jäger A.K., Saaby L. Flavonoids and CNS // Molecules. 2011. V. 16. № 2. P. 1471-1485.
3. Nakaryakova N.I., Smirnova M.M., Jaborova O.V. i dr. Sravnitel'noe izuchenie travy piona uklonjajushhegosja i piona sadovogo // Fundamental'nye issledovanija. 2014. № 11-2. S. 372-376.
4. Vasfilova E.S. Dikorastushhie lekarstvennye rastenija Urala: ucheb. Posobie. Ekaterinburg: Izd-vo Ural. un-ta. 2014. 204 s.
5. Tarahovskij Ju.S. Flavonody: biohimija, biofizika, medicina. Pushhino: Synchronbook. 2013. 310 s.
6. Smirnova M.M., Ljust E.N., Nakaryakova N.I. i dr. Issledovanie po sozdaniju novyh lekarstvennyh sredstv na osnove travy piona sadovogo // Biofarmaceuticheskij zhurnal. 2016. T. 8. № 1. S. 9-12.
7. Smirnova M.M., Jaborova O.V., Nakaryakova N.I. i dr. Opredelenie summy flavonoidov v trave piona sadovogo // Fundamental'nye issledovanija. 2014. № 12. S. 164-168.
8. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izdanie [Elektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.femb.ru/feml>. Zaglavie s jekrana. (Data obrashhe-nija: 03.07.2017).
9. GOST R ISO 5725-2-2002. Tochnost' (pravil'nost' i prezicionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij. Ch. 2. Osnovnoj metod opredelenija povtorjaemosti i vosproizvodimosti standartnogo metoda izmerenij. M. 2002. 42 s.