

# ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В МАЗИ С ЭКСТРАКТОМ ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ СУХОГО

**Н.И. Накарякова**

к.фарм.н., ст. преподаватель, кафедры фармацевтической технологии,  
Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)

**Е.Н. Люст**

к.фарм.н., доцент кафедры токсикологической химии,  
Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)  
E-mail: elenalyust@mail.ru

**М.В. Махотина**

к.фарм.н., зам. технического директора,  
ООО «ОЛИМП» (г. Екатеринбург, Россия)

**А.А. Пескова**

студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)

**В.В. Соловьева**

студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)

**А.Д. Хорошавина**

студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)

**Актуальность.** С каждым годом увеличивается необходимость разработки новых методик или оптимизации существующих методик стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов (ЛП), так как возрастают требования к качеству исходного сырья и лекарственных средств, в том числе к ЛП с компонентами растительного происхождения. Для того, чтобы аналитические методики гарантировали достоверные и точные результаты анализа, предусмотрена процедура их валидации.

**Цель работы.** Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого.

**Материал и методы.** Валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов проводили методом математической статистики по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (в условиях повторяемости), внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость).

**Результаты.** В результате определения линейности методики установлено, что график зависимости имеет линейный характер, коэффициент корреляции равен 0,9941. Специфичность методики устанавливали с помощью сравнения УФ-спектров стандартного образца (рутина), мазевой основы и мазевой основы с экстрактом. Установлено, что методика специфична по отношению к определяемому веществу. Процент восстановления находится в пределах от 95,4 до 101,5% и его средняя величина составила 98,5%, что свидетельствует о правильности разработанной методики. Вычисленные значения коэффициента вариации составили 1,73 и 1,77%, они не превышают критериев приемлемости  $\pm 5\%$ , что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости. Рассчитанное значение критерия Фишера меньше табличного значения, следовательно, различия результатов между двумя аналитиками статистически незначимы.

**Выводы.** Полученные значения внутрилабораторной прецизионности указывают на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

**Ключевые слова:** валидация, мазь, пион садовых сортов, экстракт сухой, тизоль, флавоноиды.

**Для цитирования:** Накарякова Н.И., Люст Е.Н., Махотина М.В., Пескова А.А., Соловьева В.В., Хорошавина А.Д. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(9):24–29. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-09-04>

Возрастающие требования к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных средств (ЛС) на его основе вызывают необходимость оптимизации методик анализа данных объектов, в том числе определения действующих

веществ. В системе обеспечения качества фармацевтической продукции важную роль играет аналитический контроль как готового продукта, так и сырья, из которого этот продукт получен. Для того, чтобы аналитические методики гарантировали

достоверные и точные результаты анализа, предусмотрена процедура их валидации (аттестации).

В настоящее время в мировой медицинской практике применяется значительное количество мягких лекарственных форм в качестве средств для местного лечения и профилактики заболеваний кожи, мягких тканей и слизистых оболочек различной этиологии [1]. В состав мягких лекарственных форм могут также входить экстракты из ЛРС. Компоненты растительных экстрактов обладают большим количеством фармакологических свойств.

Экстракт пиона садового сухой получен на кафедре фармацевтической технологии Пермской государственной фармацевтической академии из травы пиона садовых сортов («Gladys Hodson», «Mons Jules Elie», «Big Ben», «Barbara») с применением трехкратной экстракции при определенных условиях с последующим высушиванием методом распылительной сушки [2]. Экстракт пиона садовых сортов сухой, содержащий флавоноиды, может успешно использоваться при лечении различных заболеваний.

На основе пиона садовых сортов в настоящее время получены противовоспалительные, противоязвенные, желчегонные, гепатопротекторные препараты, с гипоазотемическим, гипогликемическим и антимикробным действием. Большое значение имеет противовоспалительный эффект флавоноидов, с которым, вероятно, связано местное гипотермическое, ранозаживляющее и вяжущее действие [3, 4]. В качестве мазевой основы может быть использован гель «Тизоль», который усиливает биодоступность других компонентов мази и, кроме того, обладает некоторым противовоспалительным, противомикробным, противоотечным действием [5, 6]. На кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (г. Пермь) разработаны состав и технология изготовления мягкой лекарственной формы на основе геля «Тизоль» с экстрактом пиона садовых сортов сухого [7]. В состав мягкой лекарственной формы входили: пиона садовых сортов экстракт сухой 6,0; гель «Тизоль» до 100,0. Один из показателей качества лекарственной формы – количественное определение действующих веществ.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я** – валидирование методики спектрофотометрического определения содержания суммы флавоноидов в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методика количественного определения одной из основных групп биологически активных веществ – флавоноидов, в мягкой лекарственной форме с экстрактом пиона садовых сортов сухим ранее разработана на кафедрах токсикологической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (г. Пермь) [7].

Исследования проведены на спектрофотометре UV-1800 SHIMADZU (Япония). Толщина поглощающего слоя 10 мм, диапазон длин волн составил 350–450 нм. При определении аналитической области в мази с пиона садовых сортов экстрактом сухого отмечается незначительное смещение максимума поглощения комплекса рутина с 2%-ным спиртовым раствором алюминия хлорида относительно стандартного значения максимума поглощения данного комплекса (410 нм) за счет влияния сопутствующих веществ. Максимум поглощения наблюдается при длине волны 405 нм. Поэтому была выбрана аналитическая длина волны 405 нм [4].

Пробоподготовка испытуемых образцов включала в себя экстракцию действующих веществ (суммы флавоноидов) спиртом этиловым 70%-ным [7]. В качестве стандартного образца (СО) использовали рутин (Quercetin-3-rutinoside, номер в каталоге 153-18-4, чистота – более 98,5%)[8].

Валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мази проводили методом математической статистики по показателям: специфичность, прецизионность (в условиях повторяемости), внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость), линейность, правильность [8].

Специфичность – способность методики анализа определять вещество в присутствии других компонентов лекарственной формы.

Линейность методики устанавливали в аналитическом диапазоне 80–120% от содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин, оценивали зависимость оптической плотности от содержания на пяти уровнях концентрации. Для обоснованности линейной зависимости рассчитывали уравнение регрессии ( $y=bx+a$ ) и коэффициент корреляции  $r$ , который должен составить  $\geq 0,99$ .

Правильность методики характеризуется близостью результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению. Определение проводили на трех уровнях концентрации пу-

тем выявления содержания суммы флавоноидов в модельных смесях, включающих в себя все компоненты разрабатываемой мази.

Для изучения прецизионности (в условиях повторяемости) методики устанавливали повторяемость, которая характеризуется степенью близости друг к другу независимых результатов испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Она выражается величиной стандартного отклонения методики.

Внутрилабораторную прецизионность (воспроизводимость) оценивали на идентичных образцах в условиях одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование). Воспроизводимость оценивали по коэффициенту вариации, который не должен превышать 5% [9].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность методики устанавливали с помощью сравнения УФ-спектров стандартного образца (рутина), экстрактов из мазевой основы и мазевой основы с экстрактом (рис. 1).

Установлено, что методика специфична по отношению к определяемому веществу. Отмечали некоторое влияние мазевой основы, что было учтено в дальнейших расчетах.

Оценку линейности методики количественного определения флавоноидов в мази проводили на уровнях 80, 90, 100, 110, 120% от концентрации суммы флавоноидов путем варьирования навески мази. В результате установлено, что график зависимости оптической плотности от уровня концентрации имеет линейный характер и описывается уравнением  $A = 0,0041x - 0,2576$ , а коэффициент корреляции ( $r$ ) равен 0,9941. Полученные данные представлены на рис. 2.

Критерием правильности методики является средний процент восстановления, средняя величина которого должна находиться в пределах  $100 \pm 5\%$ . В данной методике процент восстановления находится в пределах от 95,4 до 101,8% и его средняя величина составляет 98,5%, что свидетельствует о правильности разработанной методики (табл. 1).

Для исследования прецизионности проводили шесть параллельных определений в условиях одной лаборатории (табл. 2).

Результаты, представленные в табл. 2, достоверны при доверительной вероятности  $p = 95\%$ .

Вычисленные значения коэффициента вариации составили 1,73 и 1,77%, они не превышают критериев приемлемости  $\pm 5\%$ , что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости. Поскольку величина расчетного значения критерия Фишера меньше табличного значения, различия между результатами определений, приведенных двумя аналитиками статистически незначимы. Следовательно, полученные значения внутрилабораторной прецизионности указывают на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

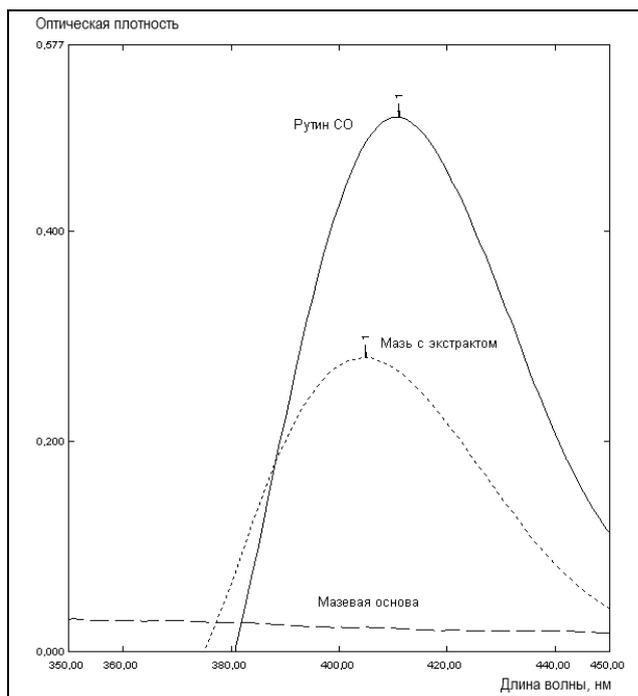


Рис. 1. УФ-спектры извлечения из мази с экстрактом пиона и мазевой основы геля «Тизоль»

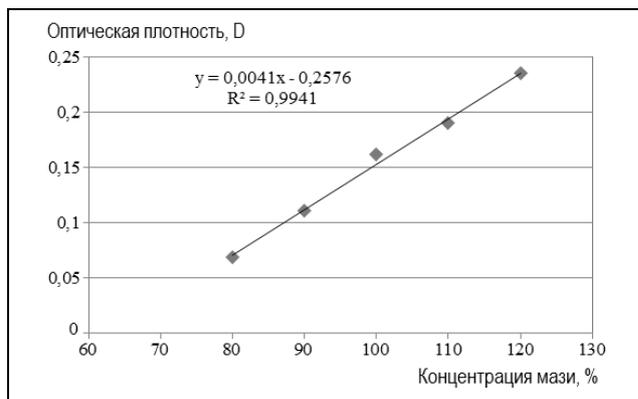


Рис. 2. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации суммы флавоноидов мази ( $n = 4$ )

**Таблица 1. Результаты оценки правильности методики количественного определения флавоноидов в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого**

Уровень	Содержание суммы флавоноидов, %	Процент восстановления, %	Метрологические характеристики
1/1	80	97,2	$X_{cp.}=98,53\%$ $S=2,25$ $\Delta X_{cp.}=\pm 1,93\%$ $S_d=2,25$ $\epsilon_{cp.}=1,96\%$
1/2		101,8	
1/3		95,4	
2/1	100	101,5	
2/2		98,2	
2/3		99,3	
3/1	120	97,8	
3/2		95,9	
3/3		99,7	

**Таблица 2. Результаты оценки прецизионности методики количественного определения флавоноидов в мази с экстрактом пиона сухого**

Аналитик	№ 1		№ 2	
	Оптическая плотность	Концентрация, %	Оптическая плотность	Концентрация, %
1	0,258	96,73	0,238	98,56
2	0,279	104,80	0,229	97,46
3	0,269	100,77	0,250	100,34
4	0,260	97,39	0,251	98,10
5	0,280	104,81	0,230	99,28
6	0,253	95,13	0,251	98,88
$X_{сред}$	0,2665		0,2415	
$S_d$	0,0096		0,0096	
$S_d, \%$	1,7352		1,7786	
$S^2$	0,00013		0,00011	
Критерий Фишера:				
табличный ( $p=0,95, f_1=5, f_2=5$ )	5,05			
расчетный	1,16			

По результатам исследования была проведена фармакологическая оценка мягкой лекарственной формы.

Мазь с пиона садовых сортов экстрактом сухим на основе геля «Гизоль» обладает выраженным противовоспалительным и ранозаживляющим действием, что позволяет использовать данную мягкую лекарственную форму для лечения воспалительных процессов и повреждений кожи [10].

## ВЫВОДЫ

Проведена валидационная оценка спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого. Установлено, что разработанная методика количественного анализа отличается специфичностью, линейностью, правильностью, прецизионностью в условиях повторяемости и воспроизводимости.

Разработанная методика может быть рекомендована для включения в проект нормативной документации на данную лекарственную форму.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Солёнова Е.А., Величковская Л.Н. Флавоноиды. Перспективы применения в антимикробной терапии. Медицинский вестник Евразии. 2017; 3: 50–57.
2. 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; 8(1): 9–12.
3. Васфилова Е.С. Дикорастущие лекарственные растения Урала: Учеб. пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. 2014. 204 с.
4. Накарякова Н.И., Люст Е.Н., 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.
5. Махотина М.В. Совершенствование технологии аптечного изготовления мягких лекарственных форм на основе Тизоль® гель: Автореф. дисс. ... канд. фарм. наук: 14.04.01. 2018. 197 с.
6. Емельянов А.С., Смирнова М.В., Ковтун О.П., Петров А.Ю., Емельянова И.В. Решение проблемы целенаправленной доставки лекарственных веществ в патологический очаг. Е.: ООО «ОЛИМП», ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Росздрава. 6 с.
7. Накарякова Н.И., Люст Е.Н., Махотина М.В., Пескова А.А., Соловьева В.В., Хорошавина А.Д. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в мягкой лекарственной форме с экстрактом пиона садовых сортов на основе геля Тизоль. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021; 24(2): 23–28.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Заглавие с экрана. (Дата обращения: 04.03.2021).
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.
10. Чащина С.В., Накарякова Н.И., Пескова А.А., Соловьева В.В., Махотина М.В. Биологическая активность мягких лекарственных форм на основе пиона садовых сортов экстракта сухого. Дневник науки. 2021. №6 [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://www.dnevniknauki.ru/images/publications/2021/6/medicine/Chashchina\\_Nakaryakova\\_Peskova\\_Solovyeva\\_Makhotina.pdf](http://www.dnevniknauki.ru/images/publications/2021/6/medicine/Chashchina_Nakaryakova_Peskova_Solovyeva_Makhotina.pdf) (Дата обращения 24.06.2021).

Поступила после доработки 14 июля 2021 г.

## VALIDATION OF PROCEDURE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOID SUM IN OINTMENT WITH PEONY EXTRACT OF DRY GARDEN VARIETIES

© Authors, 2021

### **N.I. Nakaryakova**

Ph.D. (Pharm.), Senior Lecturer of Department of Pharmaceutical Technology, Perm State pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

### **E.N. Lyust**

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor of Department of Toxicological Chemistry, Perm State pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

### **M.V. Makhotina**

Ph.D. (Pharm.), Deputy Technical Director, LLC «Olimp» (Ekaterinburg, Russia)

### **A.A. Peskova**

Student, Perm State pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

### **V.V. Soloveva**

Student, Perm State pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

### **A.D. Khoroshavina**

Student, Perm State pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

Every year, the need to develop new methods or optimize existing methods for standardization and quality control of drugs (PL) increases, as the requirements for the quality of raw materials and medicines, including PL with components of plant origin, increase. In order for analytical methods to guarantee reliable and accurate analysis results, a procedure for their validation is provided. Validation of the method of quantifying the sum of flavonoids in terms of rutin in ointments with peony extract of garden varieties of dry varieties was carried out by the method of mathematical statistics on indicators: specificity, linearity, correctness, precision (under conditions of repeatability), intralaboratory precision (reproducibility).

In the course of determining the linearity of the technique, it was found that the graph of dependence has a linear character, the correlation coefficient is 0.9941. The specificity of the procedure was established by comparing the UV spectra of the standard sample (routine), ointment base and ointment base with the extract. It was found that the technique is specific in relation to the determined substance. The reduction percentage ranges from 95.4% to 101.5% and its average value was 98.5%, which indicates the correctness of the developed procedure. The calculated values of the coefficient of variation were 1.73% and 1.77%, they do not exceed the criteria for acceptability  $\pm 5\%$ , which indicates the precision of the technique under repeatability conditions. The calculated Fisher test value is less than the tabular value, hence the differences in results between the two analysts are statistically insignificant. Thus, the obtained intralaboratory precision values indicate the precision of the technique under reproducibility conditions.

**Key words:** validation, ointment, garden peony, dry extract, Tisol, flavonoids.

**For citation:** Nakaryakova N.I., Lyust E.N., Makhotina M.V., Peskova A.A., Soloveva V.V., Khoroshavina A.D. Validation of procedure for quantitative determination of flavonoid sum in ointment with peony extract of dry garden varieties. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(9):24–29. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-09-04>

## REFERENCES

1. Soljonova E.A., Velichkovskaja L.N. Flavonoidy. Perspektivy primeneniya v antimikrobnoj terapii. Medicinskij vestnik Evrazii. 2017; 3: 50–57.
2. Issledovanie po sozdaniyu novyh lekarstvennyh sredstv na osnove travy piona sadovogo. Biofarmaceuticheskij zhurnal. 2016; 8(1): 9–12.
3. Vasilova E.S. Dikorastushhie lekarstvennye rasteniya Urala: Ucheb. posobie. Ekaterinburg: Izd-vo Ural. un-ta. 2014. 204 s.
4. Nakarjakova N.I., Ljust E.N., Oleshko O.A. Razrabotka i validacija metodiki kolichestvennogo opredeleniya summy flavonoidov v jekstrakte piona sadovogo suhom. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2018; 21(4): 3–7.
5. Mahotina M.V. Sovershenstvovanie tehnologii aptechnogo izgotovleniya mjagkih lekarstvennyh form na osnove Tizol® gell: Avtoref. diss. ... kand. farm. nauk: 14.04.01. 2018. 197 s.
6. Emel'janov A.S., Smirnova M.V., Kovtun O.P., Petrov A.Ju. Emel'janova I.V. Reshenie problemy celenapravlennoj dostavki lekarstvennyh veshhestv v patologicheskij ochag. E.: OOO «OLIMP», GOU VPO «Ural'skaja gosudarstvennaja medicinskaja akademija» Roszdruva. 6 s.
7. Nakarjakova N.I., Ljust E.N., Mahotina M.V., Peskova A.A., Solov'eva V.V., Horoshavina A.D. Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya summy flavonoidov v mjagkoj lekarstvennoj forme s jekstraktom piona sadovyh sortov na osnove gelja Tizol'. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2021; 24(2): 23–28.
8. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIV izdanie [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Zaglavie s jekrana. (Data obrashhenija: 04.03.2021).
9. GOST R ISO 5725–2–2002. Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij. Ch. 2. Osnovnoj metod opredelenija povtorjaemosti i vos-proizvodimosti standartnogo metoda izmerenij. M. 2002. 42 s.
10. Chashchina S.V., Nakarjakova N.I., Peskova A.A., Solov'eva V.V., Mahotina M.V. Biologicheskaja aktivnost' mjagkih lekarstvennyh form na osnove piona sadovyh sortov jekstrakta suhogo. Dnevnik nauki. 2021. №6 [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: [http://www.dnevniknauki.ru/images/publications/2021/6/medicine/Chashchina\\_Nakaryakova\\_Peskova\\_Solovyeva\\_Makhotina.pdf](http://www.dnevniknauki.ru/images/publications/2021/6/medicine/Chashchina_Nakaryakova_Peskova_Solovyeva_Makhotina.pdf) (Data obrashhenija 24.06.2021).



## Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

**Гипорамин** (таблетки, мазь, суппозитории, лиофилизат), рег. №№ 98/305/1; 98/305/10; 98/305/12 – противовирусное средство, получаемое из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.)

**Глицирам** (таблетки, гранулы), рег. №№ 76/252/7; 70/730/48; 88/542/3 – оказывает противовоспалительное стимулирующее действие на кору надпочечников, умеренно отхаркивающее средство, получаемое из корней и корневищ солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru