

Н. К. Жалалова (асп.)¹, С. Р. Хасанова (д.фарм.н., проф.)¹,
Н. В. Кудашкина (д.фарм.н., проф., зав.каф.)¹, А. Д. Мураталиева (к.фарм.н., доц., зав.каф.)²,
Т. В. Булгаков (к.фарм.н., в.н.с.)³

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ПОБЕГАХ *CRATAEGUS ALMAATENSIS* POJARK

¹ Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России,
кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3; тел. (347) 2724173, e-mail: svet-khasanova@yandex.ru

² Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева,
кафедра фармакогнозии и химии лекарственных средств

720020, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. И.Ахунбаева, 92; e-mail: akhunbaev@kgma.kg

³ Экспертно-криминалистический центр Министерства внутренних дел Российской Федерации,
отдел научных исследований по специальным видам экспертиз и экспертно-криминалистическому
противодействию наркопреступности
125130, г. Москва, ул. Зои и Александра Космодемьянских, 5; e-mail: tricster@inbox.ru

N. K. Zhalalova, S. R. Khasanova, N. V. Kudashkina, A. D. Muratalieva, T. V. Bulgakov

VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN THE SHOOTS OF *CRATAEGUS ALMAATENSIS* POJARK

Bashkir state medical University of the Ministry of health of the Russian Federation
3, Lenina Str., 450008, Ufa, Russia; ph. (347)2724173, e-mail: svet-khasanova@yandex.ru

Kyrgyz State Medical Academy named I.K. Akhhunbayev

92, I. Akhunbayeva Str., 720020, Bishkek, Kyrgyz Republic; e-mail: akhunbaev@kgma.kg2

Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation

5, Zoi i Aleksandra Kosmodem'yanskikh Str., 125130, Moscow, Russia; e-mail: tricster@inbox.ru

Представлены данные по проверке пригодности (валидации) разработанной методики стандартизации. Проведена валидация методики количественного определения флавоноидов в новом виде сырья – побеги *Crataegus almaatensis* Pojark в пересчете на витексин. В основе этой методики использован метод спектрофотометрии с комплексообразователем. Пригодность данной методики оценивали по нескольким критериям. После проведения статистической обработки результатов оказалось, что все изученные параметры находятся в необходимых пределах. Так, коэффициент корреляции составил 0.996, критерий повторяемости – 3.86%, критерий воспроизводимости – от 1.23 до 2.75 %, правильность составила 95.81–104.61 %.

Ключевые слова: валидация; боярышник алма-атинский; витексин; линейность; побеги; правильность; прецизионность; спектрофотометрия; специфичность; флавоноиды.

The article presents the validation data, which were determined by the method of quantitative determination of the amount of flavonoids in the shoots of *Crataegus almaatensis* Pojark. converted to vitexin. The technique was carried out by differential spectrophotometry based on the reaction of complexation of flavonoids with aluminum chloride. The method was validated for the following characteristics: linearity, repeatability, reproducibility and correctness. Statistical processing of the data obtained showed that all the validation parameters under study are within the acceptance criteria. According to the studies, the correlation coefficient was 0.996, the acceptance and reproducibility criteria were 3.86% and from 1.23 to 2.75 %, and the accuracy was 95.81–104.61 %.

Key words: correctness; flavonoids; hawthorn; linearity; precision; shoots; specificity; spectrophotometry; validation; vitexin.

Дата поступления 07.03.21

Как известно, заключительным этапом разработки любой методики качественного и количественного анализа биологически активных соединений является валидация, которая показывает пригодность использования разработанной методики для получения объективных результатов с достаточной точностью и прецизионностью. При внедрении новых растительных лекарственных средств валидацию проводят на этапе подготовки проектов фармакопейных статей на них ^{1–3}. Проведение валидации гарантирует потребителю получение лекарственных средств высокого качества ⁴. Она увеличивает не только степень гарантии качества, но и в некоторых случаях показывает на необходимость совершенствования условий производства или методик анализа. Следовательно, валидация гарантирует, что разработанная методика качественного или количественного анализа будет давать воспроизводимые и достоверные результаты, соответствующие поставленной цели ⁵.

Целью нашего исследования явилось оценка пригодности новой методики количественного определения флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* Pojark.

Материалы и методы

Объектом исследования стали побеги *Crataegus almaatensis* Pojark заготовленные с дикорастущих растений на территории Республики Кыргызстан в период цветения растения в мае 2017–2019 гг. Для данного вида растительного сырья разработана методика количественного определения флавоноидов методом спектрофотометрии с использованием комплексообразователя ⁶. В ходе экспериментальных исследований были выбраны: в качестве экстрагента – этиловый спирт 70%, комплексообразователя – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%; подобраны оптимальные условия экстракции (соотношение сырья и экстрагента, измельченность, время и кратность экстракции). В качестве стандартного образца экспериментально выбран флавоноид витексин. Валидации подвергали следующую разра-

ботанную методику: 1.0 г побегов *Crataegus almaatensis* Pojark, измельченных до 1 мм, заливали 200 мл этилового спирта 70% и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником 45 мин. Потом извлечение охлаждали и фильтровали через бумажный беззольный фильтр в мерную колбу на 200 мл и доводили до метки этиловым спиртом 70% (раствор А). Для приготовления раствора Б 3 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл спиртового раствора алюминия хлорида 2%, 0.1 мл уксусной кислоты 30% и доводили до метки этиловым спиртом 95%. Через 30 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 396 нм при толщине кюветы 10 мм. Раствор сравнения получали следующим образом: в мерную колбу на 25 мл прибавляли 3 мл исследуемого извлечения, 0.1 мл 30%-ной уксусной кислоты и доводили до метки 95%-ным этиловым спиртом.

Пригодность разработанной методики проводилась по таким показателям, как правильность, повторяемость, воспроизводимость и линейность ^{7–11}. Исследования проводили на спектрофотометрах «Shimadzu UV-1800» и СФ-46. Статистическую обработку исследований проводили с использованием программы «Statistica 10,0» и ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ⁵.

Результаты и обсуждение

Для анализа были приготовлены пять растворов побегов *Crataegus almaatensis* Pojark согласно приведенной методике, и взяты от 2 до 3.3 мл полученных извлечений, содержащих сумму флавоноидов от 67 до 120 % (табл. 1). Согласно новой методике, у данных растворов была измерена оптическая плотность и рассчитано содержание флавоноидов в исследуемом объеме. Для уточнения характера зависимости был построен график (рис. 1), который является линейным. Для подтверждения гипотезы по полученным данным нами рассчитан коэффициент корреляции, равный 0.996 (табл. 2).

Таблица 1

Определение линейности разработанной методики

№	Содержание, %	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов в аликвоте в пересчете на витексин, мг
1	67	2.0 мл	0.196	0.871
2	80	2.4 мл	0.237	1.264
3	100	2.8 мл	0.271	1.6862
4	110	3.0 мл	0.302	2.0133
5	120	3.3 мл	0.323	2.3686

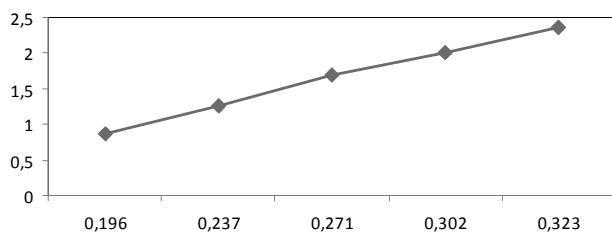


Рис. 1. График зависимости рассчитанной концентрации флавоноидов и полученной оптической плотности в пробе побегов *Crataegus almaatensis*

Так как данный показатель оказался выше критического (0.99), это доказывает, что новая методика в данном интервале концентраций является линейной ⁵.

Таблица 2

Расчет коэффициента корреляции

D	C	DC	D ²	C ²
2.0	0.871	1.742	4.00	0.758
2.4	1.264	3.0336	5.76	1.5976
2.8	1.6862	4.7213	7.84	2.8432
3.0	2.0133	6.0399	9.00	4.0533
3.3	2.3686	7.8163	10.89	5.6102
D=13.5	C=8.2031	DC=23.3531	D ² =37.49	C ² =14.8623
Коэффициент корреляции 0.996				

Повторяемость проверяли на одном образце побегов *Crataegus almaatensis* Pojark в нескольких повторностях в пределах одного рабочего дня ¹. Критерий повторяемости разработанной методики определяли в одном образце на девяти параллельных измерениях. Содержание флавоноидов составило от 1.65 до 1.95 (рис. 2).

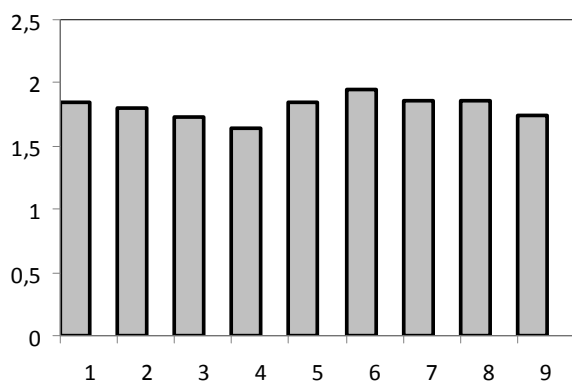


Рис. 2. Концентрация флавоноидов при определении повторяемости

Таблица 3

Повторяемость методики

X, %	Метрологическая характеристика
1.81	$S^2=0.08449$ $S=0.08961$ $S_x=0.02987$ $E_x=0.71688$ $E\%=3.86\%$

Чтобы установить правильность, мы рассчитывали относительное стандартное отклонение. Данный показатель составил 3.86% (табл. 3). Согласно требованиям, он не должен превышать 10% ⁶, поэтому можно утверждать о прецизионности новой методики в условиях повторяемости.

Внутрилабораторную воспроизводимость определяли по совпадению результатов измерений, полученных по разработанной методике на образцах побегов *Crataegus almaatensis* Pojark несколькими исследователями, в разные дни, на двух спектрофотометрах ¹. В каждой пробе проводили измерения оптической плотности по 5 раз и рассчитывали содержание флавоноидов (табл. 4).

Таблица 4

Воспроизводимость методики

№	Концентрация флавоноидов. %		
	1	2	3
1	1.78	1.93	1.76
2	1.78	1.96	1.79
3	1.86	1.97	1.75
4	1.78	1.98	1.76
5	1.88	1.96	1.77
X _{ср}	1.82	1.96	1.76
E. %	2.75	1.23	1.36

Относительное стандартное отклонение у исследуемых образцов составило от 1.23 до 2.75%. Так как этот показатель оказался не выше 15% (табл. 4), новая методика является прецизионной по данному показателю.

Правильность методики устанавливали, сравнивая среднее значение концентрации флавоноидов с показателем, который мы использовали в качестве истинного ¹. Для установления показателя «Правильность» определяли концентрацию флавоноидов в пробах, к которым был добавлен стандартный образец — 0.1 мл 0.001%-ного раствора витексина.

В качестве критерия приемлемости рассчитывали средний процент восстановления. Согласно полученным данным он был в пределах 95,81 до 104,61% при критическом значении 100±5% (табл. 5). Это свидетельствует о правильности используемой методики.

Закключение. Была проведена оценка пригодности новой методики количественного определения флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* Pojark, в результате чего можно сделать следующие выводы:

1. В выбранном диапазоне использования разработанной методики концентрация флавоноидов прямо пропорциональна оптической плотности измеряемой аналитической пробе.

Определение правильности методики

№	V пробы, мл	C флавоноидов пробе, мг	+ витексина, мг	Предполагаемая C, мг	Полученная C, мг	Отклонение, %
1	2	0.916	0.001	0.917	0.983	3.71
2	2.5	1.145	0.001	1.146	1.098	4.19
3	3.0	1.372	0.001	1.373	1.392	1.38
4	3.5	1.603	0.001	1.604	1.678	4.61
Среднее значение выхода – 101.38%						

2. Все критерии приемлемости при определении правильности, воспроизводимости и повторяемости находятся в допустимых пределах и не превышают критических значений.

Таким образом, все экспериментальные значения проведенной нами валидации методики количественного определения флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* Pojark. свидетельствуют о том, что основные изучен-

ные показатели валидации являются ниже критических, а новая разработанная методика дает точные и воспроизводимые данные. Поэтому данная методика является пригодной и может быть использована для стандартизации побегов *Crataegus almaatensis* Pojark. и включена в проект фармакопейной статьи на данный вид растительного сырья.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. I. 1814 с. /http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php.
2. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.А. Валидация аналитических методов // Фармация. – 2006. – №4. – С.8-12.
3. ГОСТ Р 51766-2001 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка. – М.: Госстандарт, 2001. – 18 с.
4. Юргель Н.В., Младенцев А.Л., Бурдейн А.В., Гетьман М.А., Малин А.А., Косенко В.В. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. – М.: Ассоциация российских фармацевтических производителей, 2007. – 48 с.
5. Краснов Е.А., Кадырова Т.В. Стандартизация лекарственных средств. – Томск: Сибирский Государственный Медицинский Университет, 2008. – 172 с.
6. Жалалова Н.К., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В. Разработка методики количественного определения флавоноидов в побегах *Crataegus allaatensis* Pojark // Баш. хим. ж. – 2021. – Т.28, №1. – С.83-89.
7. Проект ОФС 42-0113-09. Валидация аналитических методик. – М., 2009. – 12 с.
8. ГОСТ Р ИСО 5725-1-02 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1. Основные положения и определения. – М.: Госстандарт, 2002. – 45 с.
9. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 3. // Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. – М.: Госстандарт, 2002. – 28 с.
10. Мешковский А.П. Валидация аналитических методов // Сб. «Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий». – М., 2002. – С.26-30.

References

1. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya. T.I [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V.I]. 1814 p. /http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php.
2. Arzamastsev A.P. Sadchikova N.P., Kharitonov Yu.A. Validatsiya analiticheskikh metodov [Validation of analytical methods]. Farmatsiya [Pharmacy], 2006, no.4, pp.8-12.
3. GOST R 51766-2001 Syr'ye i produkty pishchevyye. Atomno-absorbtsionnyy metod opredeleniya mysh'yaka [State standard R 51766-2001 Raw materials and food products. Atomic absorption method for the determination of arsenic]. Moscow, Gosstandart Publ., 2001, 18 p.
4. Yurgel' N.V., Mladentsev A.L., Burdeyn A.V., Get'man M.A., Malin A.A., Kosenko V.V. Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv [Guidelines for the validation of methods for the analysis of medicinal products.]. Moscow, Association of Russian pharmaceutical manufacturers, 2007, 48 p.
5. Krasnov Ye.A. Kadyrova T.V. Standartizatsiya lekarstvennykh sredstv [Standardization of medicines]. Tomsk, Siberian State Medical University Publ., 2008, 172 p.
6. Zhalalova N.K., Khasanova S.R., Kudashkina N.V. Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v pobegakh Crataegus allaatensis Pojark [Development of a method for the quantitative determination of flavonoids in shoots of *Crataegus allaatensis* Pojark]. Bashkirskii khimicheskii zhurnal [Bashkir Chemical Journal], 2021, vol.28, no.1, pp.83-89.
7. Project OFS 42-0113-09. Validatsiya analiticheskikh metodik [Validation of analytical methods]. Moscow, 2009, 12 p.
8. GOST R ISO 5725-1-02 Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmereniy. Ch. 1. Osnovnyye polozheniya i opredeleniya [State standard R ISO 5725-1-02 Accuracy (correct-

11. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / Под ред. проф. Береговых В.В.— М.: Издательский дом «Русский врач», 2005.— С.73-97.
9. *GOST R ISO 5725-3-2002 Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmereniy. Ch. 3. Promezhutochnyye pokazateli pretsizionnosti standartnogo metoda izmereniy* [State standard R ISO 5725-3-2002 Accuracy (correctness and precision) of methods and results of measurements. P. 3. Intermediate indicators of the precision of the standard measurement method]. Moscow, Gosstandart Publ., 2002, 28 p.
10. Meshkovskiy A.P. *Validatsiya analiticheskikh metodov. V Sb. «Sovremennyye trebovaniya k organizatsii i deyatel'nosti kontrol'no-analiticheskikh laboratoriy otdelov kontrolya kachestva farmatsevticheskikh predpriyatiy»* [Validation of analytical methods. In «Modern requirements for the organization and activities of control and analytical laboratories of quality control departments of pharmaceutical enterprises»]. Moscow, 2002, pp.26-30.
11. *Osnovnyye printsipy provedeniya validatsii na farmatsevticheskom proizvodstve* [Basic principles of validation in pharmaceutical production]. Ed. Beregovykh V.V. Moscow, Izdatel'skiy dom «Russkiy vrach» Publ., 2005, pp.73-97.