

УДК 615.322:582.099:543.48

3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

DOI: 10.37903/vsgma.2024.4.23 EDN: TOVENS

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ГРАНУЛАХ НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЭКСТРАКТ АЛЬФРЕДИИ ПОНИКШЕЙ (ALFREDIA CERNUA L.)© Шаталова Т.А.¹, Семёнова Н.Н.¹, Дуккардт Л.Н.¹, Мичник Л.А.¹, Крикова А.В.²¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ВолгГМУ, Россия, 357500, Пятигорск, пр. Калинина, 11²Смоленский государственный медицинский университет, Россия, 214019, Смоленск, ул. Крупской, 28*Резюме*

Цель. Проведение исследований по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии поникшей.

Методика. В исследованиях использовали гранулы полиэкстракта альфредии поникшей (*Alfredia cernua* L.). Для количественного определения суммы флавоноидов нами был выбран метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на определении продуктов реакции комплексообразования с алюминия (III) хлоридом. За основу была взята методика количественного определения суммы флавоноидов в траве альфредии поникшей. Валидация методики проводилась по показателям, предусмотренным Государственной фармакопеей 15 издания.

Результаты. В качестве объекта исследования были использованы гранулы полиэкстракта из нижних листьев альфредии поникшей, обладающие ноотропным действием. При разработке методики количественного анализа был изучен флавоноидный комплекс полиэкстракта альфредии, выявлено преобладание в нем изокверцитрина, который обуславливает церебропротекторные и ноотропные эффекты препаратов из альфредии поникшей. В качестве методики количественного анализа была предложена дифференциальная спектрофотометрия при аналитической длине волны 410 нм. Расчеты количественного содержания суммы флавоноидов проводились в пересчете на изокверцитрин. Содержание суммы флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии составило (10,59±0,33) мг в 1 пакете саше. Была проведена валидация методики количественного анализа. Средняя величина приемлемости (средний процент открываемости, скорректированный на 100%) находится в пределах 97-102%, средний процент открываемости составил 99,93%, а относительное стандартное отклонение не превышает 3%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа. Были проведены исследования внутри лабораторной повторяемости (прецизионности) и устойчивости методики при работе на приборах разных марок. При этом были получены сопоставимые результаты.

Заключение. Были разработаны методики качественного и количественного анализа гранул полиэкстракта альфредии поникшей. Для качественного анализа были предложены: цианидиновая проба и методика ТСХ. Для количественного анализа суммы флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии была предложена дифференциальная УФ-спектрофотометрия, основанная на определении продуктов реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия (III) хлоридом при аналитической длине волны 410 нм. Результаты проведенных исследований показали, что предложенная методика количественного определения флавоноидов в пересчете на изокверцитрин в препарате альфредии поникшей отвечает требованиям ГФ 15 издания.

Ключевые слова: альфредия поникшая, полиэкстракт, гранулы, флавоноиды, изокверцитрин, качественный и количественный анализ, дифференциальная УФ-спектрофотометрия, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN NOOTROPIC GRANULES CONTAINING POLYEXTRACT OF ALFREDIA PONTICA (ALFREDIA CERNUA L.)Shatalova T.A.¹, Semenova N.N.¹, Dukcardt L.N.¹, Michnik L.A.¹, Krikova A.V.²¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of Volgograd State Medical University 357532, Pyatigorsk, Russia²Smolensk State Medical University, 28, Krupskoj St., 214019, Smolensk, Russia

Abstract

Objective. Research on the development and validation of a technique for the quantitative determination of flavonoids in granules of *Alfredia cernua* L. polyextract.

Methodology. Granules of polyextract of *Alfredia cernua* L. were used in the studies. For the quantitative determination of the sum of flavonoids we chose the method of differential spectrophotometry based on the determination of the products of the complexation reaction with aluminum (III) chloride. The method for quantitative determination of the sum of flavonoids in the herb *Alfredia cernua* L. was taken as a basis. Validation of the method was carried out according to the indicators provided by the State Pharmacopoeia of the 15th edition.

Results. Granules of polyextract from the lower leaves of *Alfredia cernua* L., which have a nootropic effect, were used as an object of research. The flavonoid complex of *Alfredia* polyextract was studied and the predominance of isoquercitrin was revealed, which determines the cerebroprotective and nootropic effects of *Alfredia cernua* preparations. Differential spectrophotometry at an analytical wavelength of 410 nm was proposed as a technique for quantitative analysis. Calculations of the quantitative content of the sum of flavonoids were carried out in terms of isoquercitrin. The flavonoid sum content of *alfredia* polyextract granules was (10.59 ± 0.33) mg in 1 sachet packet. Validation of the quantification methodology was carried out. The average acceptability value (the average percentage of openability adjusted by 100%) is in the range of 97-102%, the average percentage of openability was 99.93%, and the relative standard deviation does not exceed 3%, which corresponds to the RSD value optimal for this method of analysis. Studies were conducted on the internal laboratory repeatability (precision) and stability of the technique when working on devices of different brands. At the same time, comparable results were obtained. The mean acceptability value (mean opening percentage adjusted to 100%) ranged from 97-102%, the mean opening percentage was 99.93%, and the relative standard deviation did not exceed 3%, which corresponds to the RSD value optimal for this method of analysis. Intra-laboratory repeatability (precision) and stability of the methodology when operated on different brands of instruments were investigated. Comparable results were obtained.

Conclusions. We have developed techniques for qualitative and quantitative analysis of *Alfredia cernua* L. polyextract granules. For qualitative analysis of flavonoid complex and isoquercitrin, we propose to use cyanidin assay and TLC technique. Differential UV-spectrophotometry, based on the determination of the reaction products of complexation of flavonoids with aluminium (III) chloride at an analytical wavelength of 410 nm, was proposed for the quantitative analysis of the amount of flavonoids in the pellets of polyextract of *Alfredia cernua* L. The results of the studies showed that the developed methodology for the quantitative determination of flavonoids in terms of isoquercitrin in the preparation of *Alfredia cernua* L. meets the requirements of GF 15 edition.

Keywords: *Alfredia cernua* L., polyextract, granules, flavonoids, isoquercitrin, qualitative and quantitative analysis, differential UV spectrophotometry, validation.

Введение

Одна из основных целей применения ноотропных средств в медицине – восстановление и улучшение нарушенных когнитивных способностей человека. В настоящее время большинство разновозрастных групп активного населения находятся в состоянии постоянного обучения. Это и школьники, и студенты, и специалисты, повышающие квалификацию, и даже пенсионеры, осваивающие компьютерные технологии, используемые в повседневной жизни. Активное познание продолжается постоянно. Неудивительно, что в современных условиях высокоскоростного ритма жизни, зачастую, происходят периодические сбои мозговой деятельности у людей даже сравнительно молодого возраста [1].

Ежедневное перенапряжение, хроническая усталость, постоянные стрессы, отсутствие полноценного отдыха вызывают: нарушения сна, плохое самочувствие, ухудшение памяти и другие отклонения. Снижение умственной и физической работоспособности, как правило, сопровождается головными болями, скачками артериального давления, шумом в ушах, общей рассеянностью, упадком сил, и, даже, депрессивными состояниями. Такие симптомы могут стать первыми показаниями к проведению серьёзного медицинского обследования на предмет изучения нарушения работы нервной и сосудистой систем: кровотока в мозге, гипертонии, гипоксии или атеросклероза. Если нарушения работоспособности происходят в результате описанных выше причин, то здесь как раз и могут помочь ноотропные препараты [1].

Ноотропные средства способны бороться с торможением передачи импульсов между нейронами, улучшают циркуляцию крови в сосудах, обеспечивают устойчивую связь между полушариями головного мозга. В результате заметно улучшается координация, концентрация внимания, общая обучаемость, функция запоминания, усиливается устойчивость нейронов к повреждающим факторам, влияющим на мозговую деятельность. Несколько классов ноотропов обладают широким спектром действия, и способны нормализовать кратковременные интеллектуальные нарушения. Здесь важны систематичность, комплексность применения совместно с назначаемым терапевтическим лечением [1]. Известные ноотропные препараты можно разделить на три группы: растительного, животного и синтетического происхождения. Ноотропы растительной природы хорошо переносятся человеком при приеме, имеют минимум побочных эффектов и доказали свою эффективность. Обычно устойчивый ноотропный эффект сохраняется довольно продолжительное время и после прекращения употребления препаратов данного класса [1].

Нами на основе сырья, нижних листьев травы альфредии поникшей, был разработан состав гранул ноотропного действия для приготовления напитка [1] в однодозовых саше-пакетах. В состав гранул входят: сахароза; мальтодекстрин; кальция глицерофосфат; крахмала гликолят натрия; натрия хлорид; полиэкстракт альфредии поникшей листьев сухой (в дальнейшем полиэкстракт альфредии [2]).

Требования к разработке нормативной документации на гранулы [3] включают проведение качественного и количественного анализа. Методика количественного анализа подлежит валидации с целью установления ее пригодности [4].

Целью работы явилось проведение исследований по разработке и валидации методики анализа гранул полиэкстракта альфредии.

Методика

Оценка методик количественного анализа проводится по следующим показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость (сходимость) и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность) [4].

В связи с тем, что методика количественного анализа должна быть специфичной, то есть должна позволять определять количество вещества, отвечающего главному фармакологический эффект гранул в присутствии вспомогательных веществ, нами было проведено изучение литературных источников на предмет установления основного компонента фитокомплекса растения - альфредии поникшей (*Alfredia cernua* L.) листьев и его главных фармакологических эффектов [2].

Для качественного анализа полиэкстракта были выбраны 2 методики: методика для определения комплекса флавоноидов (в том числе изокверцитрина) – цианидиновая проба и специфическая – тонкослойная хроматография (ТСХ). При проведении цианидиновой пробы к 1,0 сухого полиэкстракта прибавляли 1 мл воды очищенной, 0,1 г порошка магния и 0,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной) [4]. При выполнении методики ТСХ на линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке («Силуфол УФ 254» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ») размером 10×10 см наносили по 50 мкл испытуемых растворов экстрактов альфредии (растворы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), рядом наносили 50 мкл раствора стандартного образца (СО) изокверцитрина (Sigma Aldrich, чистота более 98,0% HPLC) и 50 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина [5]. Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе, помещали в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей: хлороформ – метанол – вода (26:14:3), и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителей проходил около 80-90% длины пластинки от линии старта, ее вынимали из камеры, высушивали до удаления следов растворителей, просматривали в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.). Затем пластинку обрабатывали 1% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида, выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 2-3 мин. и просматривали УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.

При разработке методики количественного анализа за основу был использован метод дифференциальной УФ-спектрофотометрии, основанный на определении продуктов реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия (III) хлоридом [6]. За основу была взята методика количественного определения суммы флавоноидов в траве альфредии поникшей, разработанная Шиловой И.В. с соавт. [7].

При получении безспиртовой лекарственной формы из полиэкстракта альфредии адсорбировали извлечения (спиртовые экстракты 1-6) на смесь крахмала и гликолята натрия (носитель) [8]. Поэтому предварительно необходимо было установить объемы спирта для элюирования флавоноидов с носителя и доказать, что при использовании выбранных объемов растворителя десорбция флавоноидов проходит полностью. Для этого проводили теоретические расчеты, которые подтверждали опытным путем.

Также с целью установления специфичности методики мы сравнивали дифференциальные спектры растворов полиэкстракта и фильтрата, полученного после смешивания модельной смеси вспомогательных веществ гранул (смесь крахмала и гликолята натрия) и этилового спирта 40%.

На следующем этапе исследований определяли: аналитическую область, линейность, правильность, прецизионность. Определение линейности устанавливали путем построения градуировочного графика зависимости оптической плотности растворов от их концентрации (7 уровней концентрации от теоретического содержания суммы флавоноидов в гранулах альфредии). Испытуемые растворы готовили путём разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для получения концентраций 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, соответственно, и измеряли их оптическую плотность. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Нижний допустимый предел этой величины 0,99. Вычисление коэффициента корреляции проводили с помощью программы Microsoft Excel 2010.

Правильность аналитической методики представляет собой степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по разработанной методике. Для подтверждения правильности разработанной методики количественного определения суммы флавоноидов в гранулах проводили серию анализов исследуемых растворов методом добавок. В растворы из гранул вносили раствор стандартного образца с содержанием изокверцитрина 40%, 60% и 100% от номинальной концентрации флавоноидов в испытуемом растворе. Полученные растворы анализировали в трех повторностях каждый.

Прецизионность методики оценивали по первому уровню – повторяемости. Повторяемость методики определяли в 9 навесках препарата. Наиболее часто используемые оценки точности – это стандартное отклонение (SD) и относительное стандартное отклонение (RSD). RSD также известен как коэффициент вариации (CV). По определению стандартное отклонение – это величина, рассчитанная для обозначения степени отклонения для группы в целом [9, 10].

Результаты исследования

Было установлено, что химический состав листьев альфредии поникшей представлен: простыми фенолами; флавоноидами: изокверцитрином, рутином, кверцетином, дигидрокверцетином, лютеолином, кемпферолом, лютеолин-7-глюкозидом; таксифолином, апигенином. Исследованиями Шиловой И.В. с соавторами [11] было показано, что среди флавоноидного комплекса преобладает изокверцитрин, который обуславливает церебропротекторные и ноотропные эффекты препаратов из альфредии поникшей. При разработке технологии полиэкстракта альфредии, выборе экстрагентов и условий экстрагирования, наши усилия были направлены на обеспечение максимального извлечения изокверцитрина из сырья [8].

В связи с тем, что при получении полиэкстракта альфредии были использованы семь видов извлечений из нижних листьев травы альфредии, полученных путем последовательного экстрагирования сырья 95%, 70%, 55%, 40%, 30%, 25% этанолом, водой очищенной (экстракты 1-7, соответственно), были проведены качественные реакции на присутствие флавоноидов (цианидиновая проба [12]) с каждым извлечением. В результате проведения пробы появлялось красное окрашивание, что свидетельствовало о наличии флавоноидов.

При просмотре в УФ-свете на хроматограмме (рис. 1) испытуемых растворов (растворы 1-7) обнаруживали зоны адсорбции: с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО изокверцитрина, 1 зона адсорбции желтого цвета (флавоноиды) выше зоны адсорбции СО изокверцитрина, 1 зона адсорбции желто-коричневого цвета (рутин) ниже зоны адсорбции СО изокверцитрина и 2 зоны адсорбции фиолетового цвета (фенолкарбоновые кислоты) (рис. 1).

После обработки пластинки 1% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида и детектировании в УФ-свете, на хроматограмме (рис. 1) раствора СО изокверцитрина обнаруживали одну зону адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета (при длине волны 365 нм), на хроматограмме раствора РО рутин – одну зону адсорбции желто-коричневого цвета (при длине волны 254 нм). На хроматограмме испытуемых растворов экстрактов (растворы 1-7) обнаруживали зону адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне СО изокверцитрина (при длине волны 365 нм), зону адсорбции желтого цвета (флавоноиды) выше зоны адсорбции СО изокверцитрина, и 1 зону адсорбции с флуоресценцией желто-коричневого цвета на уровне СО рутин (при длине волны 254 нм). По результатам анализа фенольных соединений в листьях альфредии поникшей методом ТСХ было установлено, что все извлечения содержали рутин и изокверцитрин.

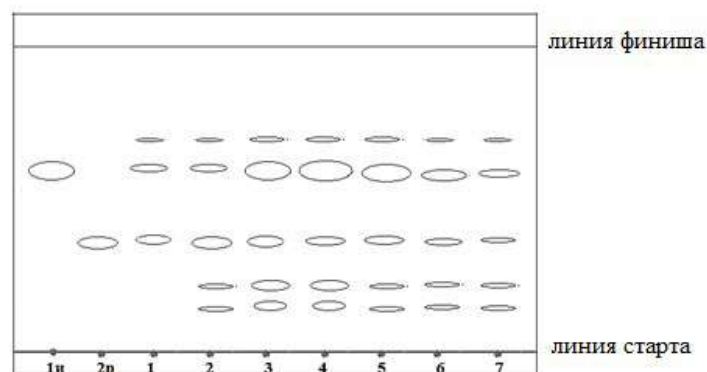


Рис. 1. Схема ТСХ – хроматограммы экстракта альфредии листьев: 1и – изокверцитрин, 2р – рутин, 1 – экстракт альфредии (95% этанол), 2 – экстракт альфредии (70% этанол), 3 – экстракт альфредии (55% этанол), 4 – экстракт альфредии (40% этанол), 5 – экстракт альфредии (30% этанол), 6 – экстракт альфредии (25% этанол), 7 – экстракт альфредии (вода очищенная)

На следующем этапе исследований были получены дифференциальные УФ-спектры каждого из компонентов (1-7) полиэкстракта. Было установлено, что дифференциальные спектры всех экстрактов альфредии поникшей (1-7) и полиэкстракта (рис. 2) с алюминия (III) хлоридом по положению максимума светопоглощения (410 нм) близки к дифференциальному спектру комплекса изокверцитрина 410 нм [2].

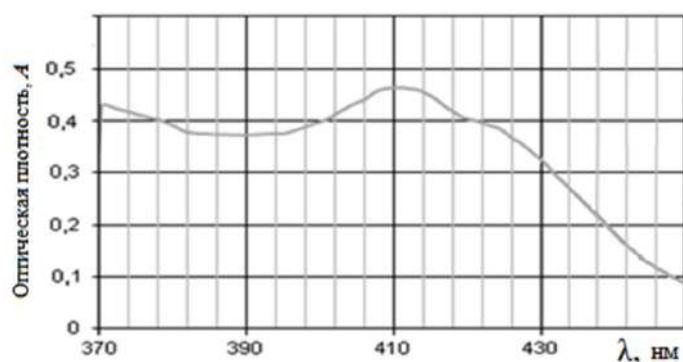


Рис. 2. Дифференциальный спектр полиэкстракта альфредии поникшей после добавления раствора алюминия хлорида

В связи с тем, что данные ТСХ подтвердили наличие изокверцитрина в экстрактах альфредии, дифференциальные УФ-спектры каждого из семи экстрактов, входящих в состав полиэкстракта, близки к дифференциальному спектру комплекса изокверцитрина 410 нм, а исследования Шиловой И.В. [7] связывают ноотропный эффект альфредии поникшей с изокверцитрином, мы сочли целесообразным проводить анализ при аналитической длине волны 410 нм и расчеты количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин. Результаты

теоретических расчетов, проведенных для установления объема спирта, необходимого для элюирования суммы флавоноидов с носителя, и экспериментальные данные анализа элюатов в зависимости от концентрации этанола, использованного для получения растворов, представлены на рис. 2.

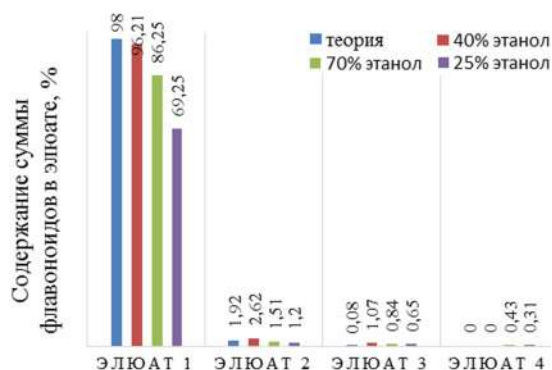


Рис. 3. Содержание флавоноидов, в пересчете на изокверцитрин (%), в порциях элюата при экстрагировании флавоноидов из гранул

Исследования показали, что объемы 40% спирта (1-я порция 50 мл, 2-я – 30 мл, 3-я – 20 мл), предложенные для проведения анализа, позволяют извлекать флавоноидный комплекс полностью. Это подтверждают результаты эксперимента – дифференциальный спектр 4-й порции элюата (рис. 4), который демонстрирует отсутствие флавоноидов в растворе.

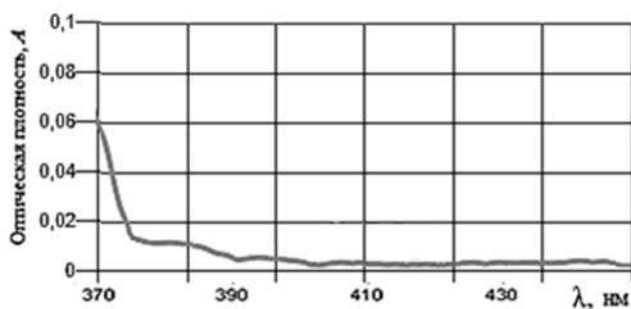


Рис. 4. Дифференциальный спектр раствора полиэкстракта альфредии поникшей после добавления раствора алюминия хлорида (4-я порция элюата)

Дифференциальный спектр модельной смеси вспомогательных веществ после добавления раствора алюминия хлорида (рис. 5) подтвердил, что вспомогательные вещества не мешают достоверно определять сумму флавоноидов, в пересчете на изокверцитрин.

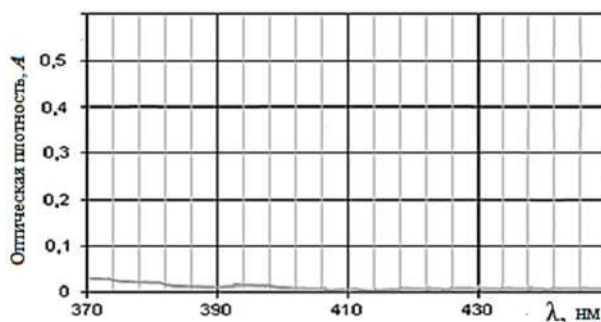


Рис. 5. Дифференциальный спектр раствора модельной смеси вспомогательных веществ после добавления раствора алюминия хлорида

Таким образом, была разработана следующая методика количественного определения суммы флавоноидов, в пересчете на изокверцитрин.

Около 2 г (точная навеска) измельченного гранулированного порошка обрабатывали 50 мл 40% спирта, перемешивали 10 минут. Раствор сливали с осадка и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. К осадку прибавляли 30 мл 40% спирта, перемешивали 10 минут. Раствор сливали с осадка и фильтровали через тот же бумажный фильтр в тот же мерную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывали 20 мл 40% спирта в тот же мерную колбу вместимостью 100 мл. При необходимости раствор в цилиндре доводили до метки 100 мл 40% спиртом (раствор А).

Раствор А (8 мл) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте, 1 каплю кислоты соляной разведенной 10% и доводили объем раствора 40% спиртом до метки; через 40 мин. измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (раствор Б испытуемого раствора). В качестве раствора сравнения использовали следующий раствор: 8 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 каплю кислоты соляной разведенной 10% и доводили объем раствора 40% спиртом до метки. Содержание флавоноидов должно составлять не менее 10,0 мг в 1 саше пакете. Для расчета содержания суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин в 1 саше пакете альфредии полиэкстракта в миллиграммах (X) предложена формула:

$$x = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_1 \cdot 1000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a_2 \cdot V \cdot (100 - W)}$$

, где А – оптическая плотность раствор испытуемого раствора; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса изокверцитрина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 295; W – потеря в массе при высушивании экстракта в процентах; a_1 – масса экстракта в саше пакете, г; a_2 – масса экстракта, взятого на анализ, г; V- объем раствора А, взятого на анализ, мл. Результаты количественного определения флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии представлены в таб. 1.

Таблица 1. Результаты количественного определения флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии (в пересчете на 1 пакет саше)

Навеска, г	Оптическая плотность, А	Найдено x, мг	Метрологические характеристики
2,0002	0,501	10,43	$\bar{x}=10,59$ $S=0,318$ $S_x=0,1298$ $\Delta x=0,33$ $\varepsilon=3,15\%$
1,9441	0,487	10,16	
2,0008	0,503	10,49	
2,0361	0,510	10,62	
2,0600	0,516	10,74	
2,1239	0,532	11,08	
-	-	$\bar{x}=10,59$	

Таким образом, содержание суммы флавоноидов (в пересчете на изокверцитрин) в гранулах полиэкстракта альфредии составило $(10,59 \pm 0,33)$ мг в 1 пакете саше. Результаты определения линейности разработанной методики представлены в табл. 2.

Таблица 2. Определение линейности разработанной методики

Навеска препарата, г	Навеска, % от заявленной	Оптическая плотность, А	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин, мг
1,0000	50	0,287	5,21
1,5000	75	0,385	7,86
2,0000	100	0,502	10,43
2,5000	125	0,594	13,03
3,0000	150	0,729	15,68
3,5000	175	0,813	18,24
4,0000	200	0,929	20,84

Данные и результаты расчета коэффициента корреляции представлены на рис. 6.

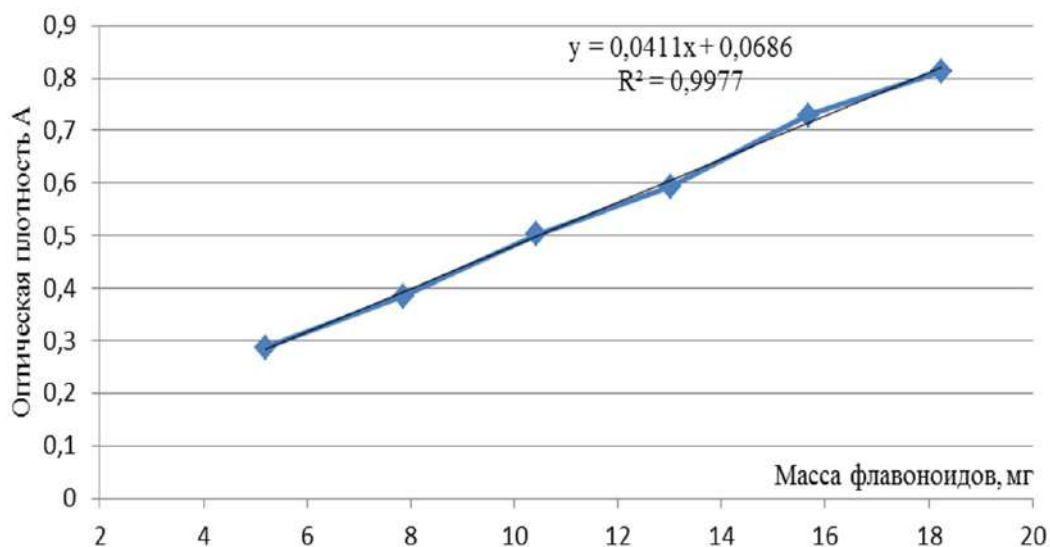


Рис. 6. Зависимость оптической плотности от концентрации изокверцитрина

Результаты, представленные на рис. 5 показывают, что практически все экспериментальные точки находятся на линии тренда, график имеет линейный характер и выражается уравнением: $y=0,0411x+0,0686$. Коэффициент корреляции составил 0,9988, что свидетельствует о достаточно жесткой линейной зависимости оптической плотности от концентрации. Методика линейна при содержании флавоноидов в растворе от 5 до 18 мг. Данные о повторяемости методики представлены в табл. 3.

Таблица 3. Определение повторяемости разработанной методики анализа суммы флавоноидов альфредии в пересчете на изокверцитрин

Уровень	Расчитанное количество флавоноидов, мг	Получено флавоноидов в пересчёте на изокверцитрин, мг	Открываемость, R, %	Метрологические характеристики
1:0,5	5,25	5,21	99,31	$\bar{R} = 99,93$ $SD=1,49$ $RSD=0,01491$
	5,25	5,31	101,09	
	5,25	5,36	102,18	
1:1	10,5	10,59	100,89	
	10,5	10,40	99,06	
	10,5	10,63	101,27	
1:1,5	15,75	15,61	99,15	
	15,75	15,58	98,97	
	15,75	15,35	97,46	

Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что средняя величина приемлемости (средний процент открываемости, скорректированный на 100%) находится в пределах 97-102%. В разработанной методике средний процент открываемости составил 99,93%, а относительное стандартное отклонение не превышает 3%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа.

Были проведены исследования внутри лабораторной повторяемости (прецизионности) методики. Данные представлены в табл. 4. Показателем приемлемости выступал коэффициент вариации, его значение, согласно требованиям НД, не должно превышать 3% [9]. Для 10 параллельных измерений в двух сериях он составил менее 2%, что не выходит за пределы допустимого показателя критерия приемлемости. Данные об устойчивости методики приведены в табл. 5.

Таблица 4. Данные о воспроизводимости методики анализа суммы флавоноидов альфредии в пересчете на изокверцитрин (прибор СФ-2000)

Первая серия измерений					
№ образца	1	2	3	4	5
Аналитик № 1	0,497	0,501	0,495	0,502	0,505
Аналитик № 2	0,501	0,496	0,503	0,494	0,504
Вторая серия измерений					
№ образца	1	2	3	4	5
Аналитик № 1	0,502	0,505	0,497	0,502	0,500
Аналитик № 2	0,499	0,503	0,508	0,504	0,506

Таблица 5. Данные об устойчивости методики анализа суммы флавоноидов альфредии в пересчете на изокверцитрин (приборы СФ-2000, LEKI SS-2108, LEKI SS-2107 UV)

Приборы	Оптическая плотность	
	Аналитики	
	1	2
Спектрофотометр СФ-2000	0,505	0,509
	0,493	0,511
	0,509	0,487
Спектрофотометр LEKI SS-2108	0,485	0,495
	0,486	0,508
	0,510	0,502
Спектрофотометр LEKI SS-2107 UV	0,506	0,512
	0,491	0,513
	0,486	0,507

Анализ результатов исследований, представленных в табл. 5, показал, что на приборах разных марок были получены сопоставимые результаты.

Для количественного анализа суммы флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии была предложена дифференциальная УФ-спектрофотометрия, основанная на определении продуктов реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия (III) хлоридом при аналитической длине волны 410 нм. В соответствии с требованиями ГФ РФ 15 издания была проведена валидация методики количественного анализа [4] и проведена ее валидация. Данные по валидации методики представлены в табл. 6.

Таблица 6. Данные по валидации методики количественного определения анализа суммы флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии в пересчете на изокверцитрин

Параметр	Результат
Диапазон линейности (мг/мл)	0,05-0,18
Коэффициент корреляции (r)	0,9988
Средний процент открываемости составил	99,93%
RSD% для повторяемости	1,491

Обсуждение результатов исследования

Ассортимент ноотропных средств растительного происхождения недостаточен. В настоящее время Шиловой И.В. с соавторами (Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия) проведены работы по изучению химического состава, фармакологического действия, введению в культуру альфредии поникшей (эндемичного растения Сибири). В их работах предлагалось использовать в качестве растительного сырья верхнюю часть (размер 25-50

см) травы альфредии в фазе цветения [13]. В результате исследований коллектива на рынке РФ появился продукт – высушенная трава альфредии поникшей в виде сбора для приготовления настоев и чаев в домашних условиях. Это потребует от пациента готовить скоропортящийся напиток ежедневно в течение всего курса лечения. Трудоемкость процесса и затраченное время часто вынуждают пациентов отказываться от лечения эти лекарственным средством.

Ранее лекарственным сырьем альфредии поникшей (высота растения до 3 м) считалась только верхняя часть с мелкими верхушечными листиками (длиной до 2 см), в то время как крупные нижние листья не заготавливались (имеют длину до 10 см) и не использовались в качестве сырья. От такого способа заготовки растения теряют свою жизнеспособность, его популяция вырождается. Нами было предложено использовать щадящую заготовку сырья, т.е. собирать только нижние листья растения, сохраняя верхушку с цветами и будущими семенами. В процессе проведенных исследований установлено, что нижние и верхние листья имеют идентичный качественный и количественный состав, а использование нижних листьев позволяеткратно по массе увеличить заготовку ценного сырья и увеличить популяцию растения.

Известно, что экстракты содержат биологически активные вещества в большей концентрации, чем настои. Поэтому нами ранее был разработан полиэкстракт альфредии, полученный с использованием спирта этилового различных концентраций, доказано его ноотропное действие. Для того, чтобы исключить токсическое влияние экстрагента на центральную нервную систему, нами на основе сырья, нижних листьев травы альфредии поникшей, был разработан состав быстрорастворимых гранул ноотропного действия для приготовления чая в однодозовых саше-пакетах. Гранулы имеют длительный срок годности, их состав стандартизирован.

Нормативная документация на гранулы с полиэкстрактом альфредии предусматривает наличие методик качественного и количественного анализа. Поэтому нами были разработаны методики контроля качества гранул и проведена их валидация. Оценка методик количественного анализа проводится по следующим показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость (сходимость) и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность). Данные по валидации представлены в табл. 7.

Таблица 7. Данные по валидации методики количественного определения анализа суммы флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии в пересчете на изокверцитрин

Параметр	Результат
Диапазон линейности (мг/мл)	0,05-0,18
Коэффициент корреляции (r)	0,9988
Средний процент открываемости составил	99,93%
RSD% для повторяемости	1,491

На основании проведенных исследований были разработаны проекты фармакопейных статей на «Альфредии поникшей листья нижние», «Альфредии поникшей листьев полиэкстракт сухой в саше пакетах по 3,86 г», которые прошли апробацию в производственных условиях.

Заключение

В ходе эксперимента были разработаны методики качественного и количественного анализа гранул полиэкстракта альфредии поникшей. Для качественного анализа были предложены: цианидиновая проба и методика ТСХ. Для количественного анализа суммы флавоноидов в гранулах полиэкстракта альфредии была предложена дифференциальная УФ-спектрофотометрия, основанная на определении продуктов реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия (III) хлоридом при аналитической длине волны 410 нм. Результаты проведенных исследований показали, что предложенная методика количественного определения флавоноидов в пересчете на изокверцитрин в препарате альфредии поникшей отвечает требованиям ГФ 15 издания.

Литература (references)

1. Семёнова Н.Н., Компанцев Д.В., Шаталова Т.А. и др. Разработка технологии гранул на основе полифракционного экстракта листьев альфредии поникшей (*Alfredia cernua* L.) // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2022. – Т.4, №2. – С. 47-55. [Semenova N.N., Kompantsev D.V., Shatalova T.A. i dr. *Mediko-farmaceuticheskij zhurnal Pul's*. Medical & Pharmaceutical Journal Pulse. – 2022. – V.24, N2. – P. 47-55. (in Russian)]
2. Семёнова Н.Н., Компанцев Д.В., Шаталова Т.А. и др. Разработка технологии сухого полифракционного экстракта листьев альфредии поникшей (*Alfredia cernua* L.) // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2022. – Т.24, №3. – С. 68-78. [Semenova N.N., Kompantsev D.V., Shatalova T.A. i dr. *Mediko-farmaceuticheskij zhurnal Pul's*. Medical & Pharmaceutical Journal Pulse. – 2022. – V.24, N3. – P. 68-78. (in Russian)]
3. Гранулы ОФС. 1.4.1.0004 Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. - 08.10.2024. URL:<https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-1-lekarstvennye-formy/granuly/>. [Granules OFS 1.4.1.0004 *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii XV izdaniya*. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition. (in Russian)].
4. Валидация аналитических методик ОФС.1.1.0012.15. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. [электронный ресурс]/ URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik> (дата обращения 08.10.2024). [Validation of analytical techniques. OFS.1.1.0012.15. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii XV izdaniya*. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition. 08.10.2024. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik>. (in Russian)]
5. Рутозида тригидрат ФС.2.1.0175.18. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. – 08.10.2024. URL:https://e-ecolog.ru/docs/60k_sjdFm-NmKfUsRLKPV?utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F [*Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii XV izdaniya*. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition. (in Russian)]
6. Коновалов Д.А., Коновалова Д.С. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве пиетрума девичьего и её валидация // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – №16(135). – С. 156-159. [Konovalov D.A., Konovalova D.S. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta*. - *Seriya: Medicina. Farmaciya*. Scientific Bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy. – 2012. – N16 (135). – P. 156-159. (in Russian)]
7. Шилова И.В. Химический состав растений Сибири и разработка ноотропных средств на их основе: Автореферат дисс. ... докт. фармац. наук. Пятигорск, 2011. – 49 с. [Shilova I.V. *Himicheskij sostav rastenij Sibiri i razrabotka nootropnyh sredstv na ih osnove (doktoral dis.)*. Chemical composition of Siberian plants and development of nootropic drugs based on them (Author's Abstract of Doctoral Thesis). - Pyatigorsk, 2011. – 49 p. (in Russian)]
8. Семёнова Н.Н., Компанцев Д.В., Шаталова Т.А. и др. Разработка технологии экстрагирования листьев альфредии поникшей (*Alfredia cernua*) // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т.20, №12. – С. 149-154. [Semenova N.N., Kompantsev D.V., Shatalova T.A. i dr. *Mediko-farmaceuticheskij zhurnal Pul's*. Medical & Pharmaceutical Journal Pulse. – 2018. – V.20, N12. – P. 149-154. (in Russian)]
9. Сорокоумова М.В., Благоразумная Н.В., Компанцев В.А. и др. Оптимизация способа получения нанокапсул, разработка методов определения степени включения циннаризина в лекарственную форму пролонгированного действия на основе поли-d, l-лактид-ко-гликолида и их валидация. // Фармация и фармакология. – 2019. – Т.7, №3. – С. 138-147. [Sorokoumova M.V., Blagorazumnaya N.V., Kompantsev V.A. i dr. Optimization of the method for obtaining nanocapsules, development of the methods of determining the degree of cinnarizine inclusion in a prolonged dosage form based on poly-d, l-lactid-co-glicolide, and its validation. *Farmaciya i farmakologiya* Pharmacy & Pharmacology. – 2019. – V.7, N3. – P. 138-147. (in English, in Russian)].
10. Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний ОФС.1.1.0013. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. – 08.10.2024. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-fizicheskikh-fiziko-khimicheskikh-i-khimicheskikh-ispytaniy/> [*Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii XV izdaniya*. General pharmacopoeia statistics. (in Russian)]
11. Суслов Н.И., Шилова И.В. Церебропротекторное средство // Патент РФ на изобретение № 2648451. Опубликовано 26.03.2018. [Suslov N.I., Shilova I.V. *Cerebroprotektornoe sredstvo*. Cerebroprotective agent. // (in Russian)]

12. Шилова И.В., Самылина И.А., Суслов Н.И. Разработка ноотропных средств на основе растений Сибири. – Томск: Печатная мануфактура, 2013. – 267 с. [Shilova I.V., Samylina I.A., Suslov N.I. *Razrabotka nootropnyh sredstv na osnove rastenij Sibiri*. Shilova I.V., Development of nootropic drugs based on Siberian plants. – Tomsk: *Pechatnaya manufaktura*, 2013. – 267 p. (in Russian)]

Информация об авторах

Шаталова Татьяна Анатольевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ – филиала ВолгГМУ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: shata61@bk.ru

Семёнова Наталья Николаевна – старший преподаватель кафедры физики и математики ПМФИ – филиала ВолгГМУ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: nata68agel@mail.ru

Дуккардт Людмила Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ПМФИ – филиала ВолгГМУ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: shata61@bk.ru

Мичник Людмила Андреевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ – филиала ВолгГМУ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: shata61@bk.ru

Крикова Анна Вячеславовна – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой управления и экономики фармации, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: anna.krikova@mail.ru

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.11.2024

Принята к печати 12.12.2024