

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ С ЭКСТРАКТОМ ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ НА ОСНОВЕ ГЕЛЯ ТИЗОЛЬ

Н.И. Накарякова

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

Е.Н. Люст

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

М.В. Махотина

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

А.А. Пескова

студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь)

В.В. Соловьева

студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь)

А.Д. Хорошавина

студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь)

Пион садовых сортов, ввиду богатого химического состава, представляет интерес в области создания фитопрепаратов для лечения дерматологических заболеваний. При разработке лекарственных препаратов важной составляющей является оценка качества продукта на всех этапах с использованием методик, дающих достоверные данные.

Цель исследования – разработка методики количественного определения одной из основных групп биологически активных веществ – флавоноидов, в мягкой лекарственной форме с экстрактом пиона садовых сортов сухим для применения данной методики на различных этапах контроля качества данной лекарственной формы.

Для достижения цели выполнена модификация методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте пиона садовых сортов сухом. Поскольку анализ мягкой лекарственной формы является затруднительным, что связано с необходимостью извлечения анализируемых веществ из мазовой основы, проведены комплексные исследования по подбору оптимального растворителя, соотношения объемов извлечения и 2%-ного раствора алюминия хлорида и времени устойчивости комплекса флавоноидов с хромогенным реагентом.

В результате проведенных исследований выбран экстрагент – спирт этиловый 70%-ный, навеска мази 1,0 г, алиquotная часть извлечения 2 мл, соотношение алиquotы с хромогенным реагентом 1:1, время образования устойчивого комплекса 30 мин. В данных условиях получено содержание флавоноидов в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого $0,338 \pm 0,015\%$, которое максимально приближено к содержанию данной группы биологически активных веществ в экстракте.

Ключевые слова: 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. 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. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-02-04>

В настоящее время препараты растительного происхождения являются востребованными и составляют более 40% лекарственных средств государственного реестра, что связано с их эффективностью и безопасностью. Одним из перспектив-

ных источников для получения фитопрепаратов является пион садовых сортов. Ранее проведенными исследованиями установлено его сходство с лекарственным видом – пионом уклоняющимся (*Paeonia anomala*). Химический состав данных рас-

тений представлен органическими кислотами, компонентами полифенольной и гликозидной природы, оказывающими противовоспалительное, ранозаживляющее, антиоксидантное действие [1, 2]. Изученный состав позволяет расширять область применения пиона садовых сортов, в том числе использование препаратов на его основе для лечения дерматологических заболеваний, что актуально.

В данной области широко используется такая лекарственная форма, как мазь. Главной составляющей мази является основа, которая обеспечивает доставку лекарственных средств, а также влияет на проявление их фармакологического эффекта. Поэтому важным аспектом при создании мягкой лекарственной формы является выбор основы, что влияет на эффективность и безопасность готового лекарственного препарата. Один из представителей группы гидрофильных основ – гель Тизоль. Наличие связанных молекул глицерина и атома титана в молекуле Тизоль определяет его гелевую структуру, обеспечивает хорошую проводимость лекарственных препаратов через кожу и слизистые, а также противовоспалительное, антимикробное, протекторное и дегидратирующее, противоотечное, местное анальгезирующее действие. Тизоль не разрушает введенные в него лекарственные вещества, быстро доставляет их в неизменном виде в патологический очаг, повышает их фармакологическую активность и тем самым – конечный лечебный эффект [3]. Представленные факторы делают основу Тизоль перспективной для разработки лекарственных препаратов на основе пиона садовых сортов, позволяя наиболее полно использовать ценные свойства данного растения.

Поскольку важной составляющей на этапе создания лекарственных препаратов является оценка качества, то первоочередной задачей становится разработка современных физико-химических методов анализа.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – разработка методики количественного определения основной группы биологически активных веществ (БАВ) в мягкой лекарственной форме с экстрактом пиона садовых сортов сухим на основе геля Тизоль.

В связи с этим решались следующие задачи:

- разработка способа введения экстракта пиона садовых сортов в гель Тизоль с учетом растворимости экстракта и физико-химических свойств основы;
- выбор оптимальных условий извлечения флавоноидов из геля Тизоль;

- разработка методики количественного определения флавоноидов в мягкой лекарственной форме с экстрактом пиона садовых сортов сухим на основе геля Тизоль.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экстракт пиона садовых сортов сухой получен на кафедре фармацевтической технологии Пермской государственной фармацевтической академии. Экстракт изготавливали из травы пиона садовых сортов методом трехкратной экстракции спиртом этиловым 40%-ным с последующим высушиванием методом распылительной сушки [4]. Полученный экстракт пиона стандартизовали по показателям: описание, потеря в массе при высушивании, содержание тяжелых металлов, содержание основных групп БАВ (монотерпеновых гликозидов – 11,50–11,66%, флавоноидов – 3,16–3,42%). Стандартизацию экстракта проводили согласно Государственной фармакопее XIV издания [5].

В качестве мазевой основы использовали перспективный в медицинских целях гель Тизоль, который благодаря дифильным свойствам сочетается как с гидрофобными, так и с гидрофильными лекарственными средствами, в том числе с растительными экстрактами.

В основе методики количественного определения БАВ в мази лежит методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте пиона садового сухом. В качестве стандартного образца (СО) использовали рутин (Quercetin-3-rutinoside, каталожный номер 153-18-4, чистота – более 98,5%) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

Начальный этап исследования посвящен разработке способа введения экстракта пиона садовых сортов в мазевую основу. Ввиду хорошей растворимости экстракта пиона в воде, была получена гомогенная мазь на основе геля Тизоль путем растирания экстракта сухого с равным количеством основы с последующим добавлением основы до получения однородной мази. Готовая мазь представляет собой плотную, слегка жирноватую и липкую на ощупь густую массу, темно-коричневого цвета со специфическим запахом.

С целью модификации методики количественного определения суммы флавоноидов применительно к мази с экстрактом пиона садовых сортов на основе геля Тизоль проведены комплексные исследования по подбору оптимального растворителя,

соотношения объемов извлечения и 2%-ного раствора алюминия хлорида и времени устойчивости комплекса флавоноидов с хромогенным реагентом.

На этапе выбора оптимального растворителя для наиболее эффективного извлечения БАВ из основы использовали воду очищенную как универсальный растворитель, раствор хлористоводород-

ной кислоты 7,3%-ный, являющейся растворителем для основы Тизоль, и спирт этиловый 70%-ный, оптимальный экстрагент для исследуемой группы БАВ [7, 8].

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мази с экстрактом пиона приведены в табл. 1.

Таблица 1. Содержание суммы флавоноидов в мази с экстрактом пиона в зависимости от типа растворителя

Растворитель	Концентрация флавоноидов, %	Выход флавоноидов, %
Вода очищенная	0,055±0,002	18,56
Раствор кислоты хлористоводородной 7,3%-ный	0,002±0,001	0,67
Спирт этиловый 70%-ный	0,293±0,012	98,85

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что при использовании в качестве растворителя воды очищенной и кислоты хлористоводородной наблюдается низкий аналитический сигнал, что свидетельствует о невысоком сродстве флавоноидов к данным экстрагентам. Вследствие этого невозможна достоверная оценка количественного содержания исследуемой группы БАВ в мази. Спирт этиловый 70%-ный, являясь оптимальным экстрагентом для флавоноидов, позволяет извлекать данные вещества из навески мази, о чем свидетельствуют высокие значения оптической плотности и концентрации флавоноидов. Поэтому в качестве растворителя для количественного определения суммы флавоноидов в мази с экстрактом пиона выбран спирт этиловый 70%-ный.

С целью обеспечения достоверных результатов и получения оптимального значения оптической плотности варьировали навески мази, аликвоты полученных извлечений, а также изучали соотношения объемов извлечения и 2%-ного раствора алюминия хлорида. Извлечения готовили растворением навесок 1,0 и 2,0 г (точные навески) в спирте этиловом 70%-ном. Отбирали аликвоты 1 и 2 мл, разведение готовили в мерной колбе вместимостью 25 мл в соотношениях с 2%-ным раствором алюминия хлорида 1:1 и 1:2. Оценку исследуемых факторов проводили по оптической плотности и полученной концентрации флавоноидов.

Для установления времени устойчивости комплекса флавоноидов с хромогенным реагентом измеряли величину оптической плотности фото-

метрируемого раствора через каждые 15 мин в течение 1 ч с момента получения комплекса. Результаты приведены на рис. 1.

На рисунке видно, что реакция стабилизируется через 30 мин после получения комплекса. При выдерживании более 30 мин возникают колебания оптической плотности, что ведет к недостоверным результатам.

На рис. 2 представлен УФ-спектр извлечения из мази с экстрактом пиона и спектр мазовой основы Тизоль.

Влияние основы было учтено при расчете содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в зависимости от навески и разведения мази с экстрактом пиона представлены в табл. 2.

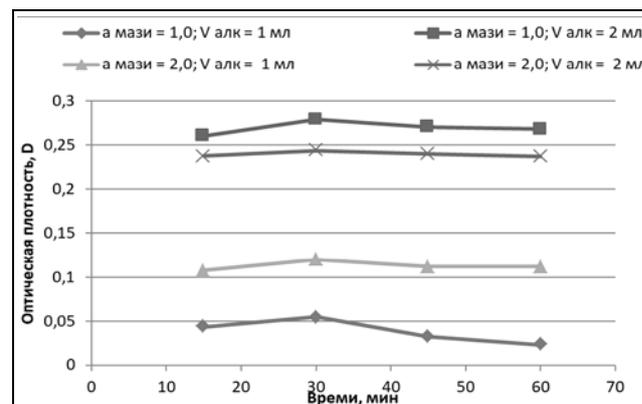


Рис. 1. Зависимость оптической плотности раствора от времени образования комплексного соединения флавоноидов с 2%-ным раствором алюминия хлорида

Таблица 2. Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухим ($n = 3$)

Навеска мази, г	Аликвота извлечения, мл	Соотношение объема извлечения и 2%-ного раствора алюминия хлорида	Содержание суммы флавоноидов, %
1,0	1	1:1	0,155±0,030
		1:2	0,149±0,022
	2	1:1	0,338±0,015
		1:2	0,340±0,039
2,0	1	1:1	0,159±0,033
		1:2	0,161±0,036
	2	1:1	0,165±0,031
		1:2	0,167±0,017

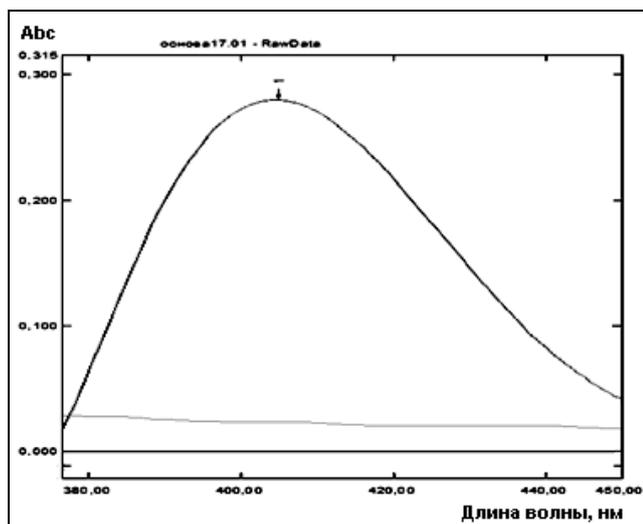


Рис. 2. УФ-спектр извлечения из мази с экстрактом пиона и спектр мазевой основы Тизоль

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что использование навески мази 1,0 и аликвоты извлечения 2 мл обеспечивает оптимальные значения оптической плотности и значения содержания флавоноидов, максимально приближенные к содержанию данной группы БАВ в экстракте. Более низкие величины оптической плотности при взятии навески мази 2,0, вероятно, связаны с недостаточным объемом экстрагента для полноценного извлечения БАВ. По результатам количественного анализа выбрано соотношение объема извлечения и 2% раствора алюминия хлорида 1:1.

На основании проведенного комплексного исследования разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мази с экстрактом пиона садовых сортов на основе геля Тизоль.

Методика. Около 1,0 г (точная навеска) мази помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл 70%-ного этанола, объем доводили 70%-ным этанолом до метки (раствор А). Затем 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30%-ной, перемешивали. Объем раствора доводили до метки этанолом 95%-ным. Через 30 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 2 мл раствора А и 1 капли уксусной кислоты разведенной 30%-ной, доведенный до метки 95%-ным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{A_x \times a_0 \times 1 \times 25 \times 25 \times 100}{A_0 \times 50 \times 25 \times a_x \times 2},$$

где A_x – оптическая плотность раствора мази; A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина; a_x – масса навески мази, г; a_0 – масса СО рутина, г.

Пригодность разработанной методики для аналитических целей подтверждена результатами валидационной оценки:

специфичность методики оценивали путем снятия спектра поглощения экстракта спиртового из мазевой основы и экстракта спиртового из мази с экстрактом пиона садовых сортов сухого. Установлено, что в данных условиях возможно вести определение суммы флавоноидов. Спектр мазевой основы не имеет интенсивного светопоглощения в аналитической длине волны 405 нм (рис. 2);

линейную зависимость оценивали в пределах аналитической области 80–120% от основного содержания суммы флавоноидов в мази. График зависимости оптической плотности от концентрации экстракта пиона в мази имеет линейный характер, описывается уравнением $y = 0,0041 \times x - 0,2567$, коэффициент корреляции $R > 0,99$ (0,9941);

правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определения по валидируемой методике от истинного значения. Для оценки правильности использовали подход приготовления модельных смесей с известным содержанием суммы флавоноидов на трех уровнях в трех параллелях: 80, 100, 120%. Рассчитывали средний процент восстановления, который равен 98,8% и находится в пределах $100 \pm 5\%$, правильность валидируемой методики признана удовлетворительной;

при оценке прецизионности в условиях повторяемости значения относительной ошибки среднего результата составили 2,12 и 1,78%, что не превышает критериев приемлемости $\pm 5\%$.

Выводы

Разработан способ введения экстракта пиона садовых сортов сухого в мазевую основу. Получена гомогенная мазь на основе аквакомплекса глицерофосфата титана – Тизоль.

Подобраны оптимальные параметры извлечения БАВ из геля Тизоль.

Представлена методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на

рутин в мази с экстрактом пиона садовых сортов сухим, которая может быть использована в дальнейших исследованиях по разработке мягкой лекарственной формы с экстрактом пиона для контроля качества на всех этапах, а также для включения в нормативную документацию с целью стандартизации готового продукта.

Получены удовлетворительные валидационные характеристики разработанной методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Накарякова Н.И., Смирнова М.М., Яборова О.В., Олешко О.А. Сравнительное изучение пиона уклоняющегося и пиона садового. Фундаментальные исследования. 2014; 11(2): 372–376.
2. Накарякова Н.И., Мащенко П.С., Смирнова М.М. Исследование состава экстракционных препаратов пиона садового методом ГХ-МС. Научно-практический журнал «Вестник» ПГФА. 2016; 18: 20–23.
3. 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.
4. Смирнова М.М., Накарякова Н.И., Люст Е.Н., Олешко О.А. Создание новых лекарственных средств на основе травы пиона садового. Сообщение 2. Биофармацевтический журнал. 2019; 11(4): 34–38.
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopoea.php>. Заглавие с экрана. (Дата обращения: 01.09.2020).
6. 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.
7. Махотина М.В. Совершенствование технологии аптечного изготовления мягких лекарственных форм на основе Тизоль® гель: Автореф. дисс. ... канд.ф.наук: 14.04.01/ Махотина Мария Вячеславовна. Е., 2018; 197 с.
8. Смирнова М.М., Люст Е.Н., Накарякова Н.И., Олешко О.А., Петрова А.А., Яборова О.В. Исследование по созданию новых лекарственных средств на основе травы пиона садового. Биофармацевтический журнал. 2016; 8(1): 9–12.

Поступила после доработки 25 декабря 2020 г.