

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2023.5.82>

## **Количественное определение суммы флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой**

**О.А. Сушинская**

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2023. – Том 22, №5. – С. 82-89.

## **Quantitative determination of flavonoids amount in a liquid wormwood extract**

**O.A. Sushinskaya**

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2023;22(5):82-89.

---

### **Резюме.**

Цель исследования – валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой.

Материал и методы. Объектом исследования являлся жидкий экстракт полыни горькой травы 1:1, полученный методом реперколяции. Для установления содержания флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой использовали дифференциальную спектрофотометрию. Для нового объекта исследования провели валидацию методики количественного определения флавоноидов по критериям «специфичность», «линейность», «правильность», «прецизионность».

Результаты и обсуждение. Методом спектрофотометрии установили содержание флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой 1:1, которое составило  $1,54 \pm 0,04$  мг/мл в пересчете на рутин. Предложена норма содержания флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой 1:1 не менее 0,10%.

Заключение. Методика является точной и прецизионной в пределах диапазона применения, коэффициент корреляции и коэффициенты вариации для валидационных характеристик не превышали критерии приемлемости, доказана специфичность и линейность методики для нового экстракционного препарата из полыни горькой травы. Методика может быть рекомендована для рутинного контроля качества полученного экстракта по показателю «Количественное определение».

*Ключевые слова: жидкий экстракт, полынь горькая, количественное определение, флавоноиды, спектрофотометрия, валидация.*

### **Abstract.**

Objectives. To validate the methodology for quantitative determination of flavonoids amount in a liquid wormwood extract.

Material and methods. The object of the study was a 1:1 liquid extract of wormwood bitter herb obtained by the method of repercolation. Differential spectrophotometry was used to determine the amount of flavonoids in the liquid extract of wormwood. For the new object of research, the validation of the methodology for the quantitative determination of flavonoids amount was carried out according to the criteria of specificity, linearity, correctness, precision.

Results. Using spectrophotometry, the amount of flavonoids in the liquid extract of wormwood 1:1 was determined, which made up  $1.54 \pm 0.04$  mg/ml in terms of rutin. The norm of flavonoid amount in the liquid extract of wormwood 1:1 was proposed; it should be not less than 0.10%.

Conclusions. The technique is accurate and precise within the range of its application, the correlation coefficient and coefficients of variation for validation characteristics did not exceed the eligibility criteria, the specificity and linearity of the technique for a new extraction preparation from wormwood bitter herb was proved. The technique can be recommended for routine quality control of the obtained extract according to the indicator «Quantitative determination».

*Keywords: liquid extract, wormwood, quantitative determination, flavonoids, spectrophotometry, validation.*

## Введение

Полынь горькая (*A. absinthium*) входит в число перспективных видов растительного сырья флоры Республики Беларусь для фармацевтической разработки наружных лекарственных форм противовоспалительного действия. Это обусловлено содержанием в траве полыни горькой различных биологически активных веществ, которые обладают разными механизмами ингибирования воспаления. Известно, что данные фармакологические свойства в основном обусловлены содержанием эфирных масел и группы сесквитерпеновых лактонов [1]. Однако группа флавоноидов, например, артемизетин, рутин, изорафнетин, нарциссин, кверцетин, содержащихся в траве полыни горькой, также вносит значительный вклад в противовоспалительную активность данного вида сырья [2-4].

Флавоноиды, выделенные из полыни горькой, исследовали на различных моделях воспаления у крыс и обнаружили, что они обладают значительной активностью как в пролиферативной, так и в экссудативной фазах воспаления [5, 6]. Ли и соавт. исследовали противовоспалительный эффект 5,6,3',5'-тетраметокси-7,4'-гидроксифлавона *in vitro* и *in vivo*, выделенного из полыни горькой, и доказали, что изучаемый флавоноид обладает противовоспалительным действием, подавляя экспрессию провоспалительных медиаторов, таких как индуцибельная NO-синтаза, простагландин E2, оксид азота, циклооксигеназа-2 в клетках RAW 264.7, стимулированных липополисахаридом [7]. Зераати и соавт. выявили, что экстракты *A. absinthium* оказывают местное антиноцицептивное действие на экспериментальных мышцах [8]. В рандомизированных клинических исследованиях доказано, что наружное применение мази, содержащей экстракт полыни, улучшает клинические симптомы у людей, страдающих остеоартритом колена [9].

Цель исследования – валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой.

## Материал и методы

Объектом исследования являлся жидкий экстракт полыни горькой травы, полученный методом реперколяции в батарее из 3 лабораторных перколяторов в соотношении 1:1.

В качестве исходного сырья использовали полынь горькой траву производства ООО «Кали-

на» (Республика Беларусь), в качестве экстрагента использовали этанол 70% (ОАО «Бобруйский завод биотехнологий», марка «Экстра М», ТУ 700068910.014-2005). Для анализа также применялись следующие реактивы: алюминий хлористый б-водный (х.ч., АО «ЛенРеактив», ГОСТ 3759-75); ледяная уксусная кислота (х.ч., АО «ЛенРеактив», ГОСТ 61-75), стандартный образец рутина (95%, Sigma-Aldrich). Спектрофотометрические исследования проведены на спектрофотометре Varian Cary®50 (Agilent Technologies Inc., США).

Для установления содержания флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой использовали спектрофотометрию. Метод дифференциальной спектрофотометрии широко используется для определения содержания флавоноидов как в лекарственном растительном сырье, так и в экстракционных препаратах, полученных на их основе. Распространенность данного метода основана на реакции комплексообразования флавоноидных соединений с растворами металлов, в частности трехвалентных [10, 11]. В результате комплексообразующей реакции флавоноидов жидкого экстракта полыни с 2% раствором алюминия хлорида происходит bathochromный сдвиг максимума поглощения, что соответствует такому у раствора рутина с алюминия хлоридом [11]. Для количественного определения содержания флавоноидов в жидком экстракте полыни была выбрана длина волны  $410 \pm 2$  нм.

Количественное определение флавоноидов (в пересчете на рутин) определяли методикой, предложенной в ФС.3.4.0006.18 «Полынь горькой травы настойка» [12]. 2,0 мл жидкого экстракта полыни горькой помещали в мерную колбу, объем раствора доводили этанолом 70% до метки 25,0 мл (испытуемый раствор А). В отдельной мерной колбе к 5,0 мл испытуемого раствора прибавляли 5,0 мл раствора 2% алюминия хлорида, также каплю уксусной кислоты ледяной, доводили объем этанолом 96% до метки 25,0 мл (испытуемый раствор Б). Оптическую плотность раствора Б определяли на спектрофотометре через 30 минут после его приготовления. Раствор сравнения готовили по аналогичной методике, но без добавления алюминия хлорида. При тех же условиях определяли оптическую плотность раствора комплекса СО рутина с алюминия хлоридом. Содержание флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой вычисляли по следующей формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 1 \times 25 \times 25 \times P \times 100}{A_0 \times a \times 5 \times 100 \times 25 \times 100}, \quad (1)$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$a_0$  – навеска СО рутина, г;

P – содержание основного вещества в СО рутина, %;

$A_0$  – оптическая плотность раствора комплекса рутина;

a – объем экстракта, мл.

Валидация методики проводилась в соответствии с фармакопейными требованиями, а также Руководством по валидации аналитических методов проведения испытаний лекарственных средств Евразийской экономической комиссии по соответствующим критериям: специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость и сходимосť) и правильность [13-15].

Для валидации методики по критерию «специфичность» проводили оценку соответствия максимумов поглощения дифференциальных спектров стандарта рутина и жидкого экстракта полыни горькой спектрофотометрическим методом в диапазоне длин волн 350-500 нм.

Для определения линейности аналитической методики готовили растворы экстракта в виде 5 уровней концентрации: 1 уровень – объем аликвоты 1,0 мл (50% от исходного); 2 уровень – 1,5 мл (75%), 3 уровень – 2,0 мл (100%), 4 уровень – 2,5 мл (125%) и 5 уровень – 3,0 мл (150%). Определяли концентрацию флавоноидов по результатам измерения оптических плотностей испытуемых растворов. Диапазон применения методики определялся значениями, соответствующими области линейности. Далее определяли коэффициент корреляции r, который для данного валидационного показателя должен быть не ниже 0,9950 [13, 16].

Для подтверждения правильности методики количественного определения необходимо определение лабораторного смещения (систематической погрешности). Лабораторное смещение находится по разности между теоретическим значением результата (математическое ожидание) и его истинным значением, полученным экспериментально. Точность методики по данному валидационному показателю оценивали на 3 значениях концентраций в 3 повторностях в пределах диапазона применения. Испытуемые растворы готовили методом добавки стандарта

рутина в количестве 25, 50, 75% от его исходного содержания в жидком экстракте полыни горькой. Процент восстановления аналитической методики при использовании 3 уровней концентраций, скорректированный на 100%, должен находиться в пределах от 95 до 105% [16,17].

Повторяемость (сходимость) методики определяли на 1 образце сырья в 6 повторностях (6 серий жидкого экстракта). Для оценки данного показателя необходимо определение коэффициента вариации (CV, RSD), который является характеристикой случайных погрешностей и используется для оценки прецизионности измерений. Коэффициент вариации для 6 параллельных измерений должен быть не более 5% [13-17].

Для определения внутрилабораторной воспроизводимости методики использовали 3 образца жидкого экстракта полыни горькой, подготовленных независимо друг от друга. Методику проводили 2 аналитика в разные дни в 3 повторностях для каждого образца. Критерий внутрилабораторной воспроизводимости в виде коэффициента вариации должен быть не более 10% [13-17].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета анализа данных Microsoft Excel 2016 и программного обеспечения STATISTICA 10.0.

## Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены дифференциальные УФ-спектры жидкого экстракта полыни горькой 1:1 и комплекса рутина с 2% раствором алюминия хлорида. Максимум поглощения суммы флавоноидов жидкого экстракта в диапазоне длин волн от 350 до 500 нм при снятии УФ-спектра составляет  $410 \pm 2$  нм, что соответствует таковому для раствора рутина.

Линейность аналитической методики представлена на рисунке 2, результаты определения линейности методики в таблице 1.

Концентрация флавоноидов по результатам измерения оптических плотностей испытуемых растворов в диапазоне концентраций от 50% до 150% от их теоретического содержания составила от 0,9 до 2,0 мг/мл. Значение коэффициента детерминации составило 0,9965, значение коэффициента корреляции r – 0,9982, что соответствовало критерию приемлемости не ниже 0,9950.

Аналитическая область методики количественного определения флавоноидов в жидком

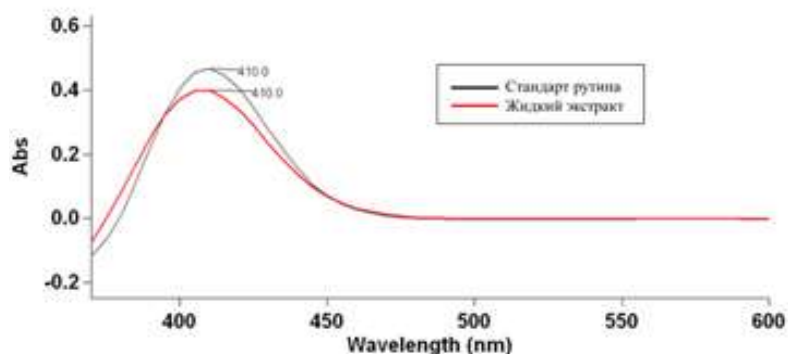


Рисунок 1 – Дифференциальные УФ-спектры жидкого экстракта полыни горькой 1:1 и комплекса рутина с 2% раствором алюминия хлорида

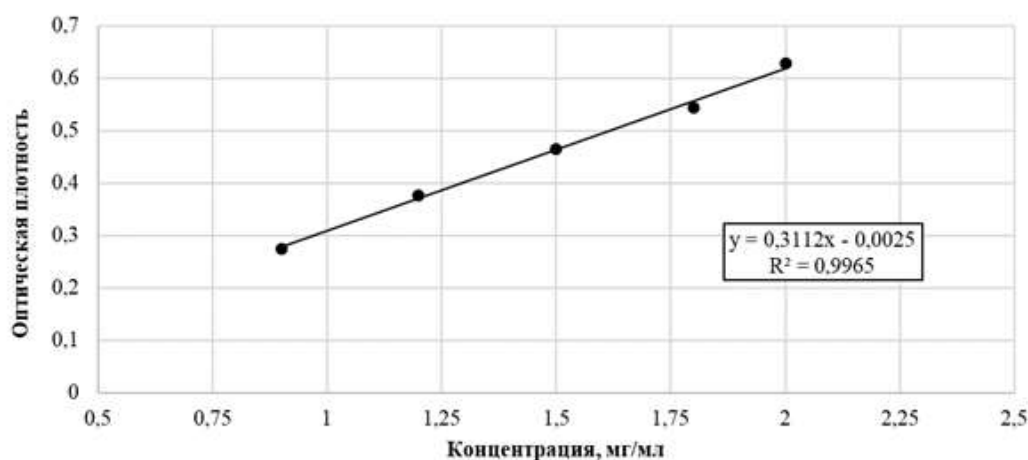


Рисунок 2 – График зависимости оптической плотности от содержания флавоноидов в аликвоте

Таблица 1 – Определение линейности методики количественного определения флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой

№	Содержание флавоноидов, % от нормируемого значения	Объем аликвоты, мл	Концентрация флавоноидов теоретическая, %	Концентрация флавоноидов фактическая, %	Оптическая плотность
1	50	1,0	0,0750	0,0885	0,275
2	75	1,5	0,1125	0,1214	0,377
3	100	2,0	0,1500	0,1497	0,465
4	125	2,5	0,1875	0,1754	0,545
5	150	3,0	0,2250	0,2022	0,628

экстракте полыни горькой в диапазоне концентраций 50-150% удовлетворяет требованиям.

Результаты определения правильности методики для жидкого экстракта полыни горькой представлены в таблице 2.

Требования критерия приемлемости для результатов испытания правильности методики составляет от 95 до 105%. Установлено, что среднее значение открываемости методики для жидкого экстракта полыни составило  $100,53 \pm 1,54\%$ , что

соответствует допустимым значениям [13, 16].

Результаты определения повторяемости методики для жидкого экстракта представлены в таблице 3.

Относительное стандартное отклонение для 6 измерений составило 2,86%, что удовлетворяет условию приемлемости не более 5% [13, 16].

Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости методики для жидкого экстракта представлены в таблице 4.

Таблица 2 – Результаты испытания правильности методики для жидкого экстракта полыни горькой

№	Исходная концентрация флавоноидов в экстракте, мг/мл	Добавление СО рутин, %	Ожидаемый результат, мг/мл	Полученный результат, мг/мл	Абсолютная ошибка, мг/мл	Процент восстановления, %		
1	1,50	25	1,88	1,90	-0,02	101,20		
2		50	2,25	2,29	-0,04	101,58		
3		75	2,63	2,63	0,00	100,00		
4		25	1,88	1,87	0,01	99,32		
5		50	2,25	2,30	-0,05	102,30		
6		75	2,63	2,66	-0,03	100,98		
7		25	1,88	1,87	0,01	99,66		
8		50	2,25	2,30	-0,05	102,16		
9		75	2,63	2,57	0,06	97,55		
Метрологические характеристики								
f	$\bar{x}$	S	$S_r$	$S^2$	P, %	t (P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$ , %
8	100,53	1,54	0,015	2,362	95	2,306	1,184	1,18

Таблица 3 – Результаты испытания повторяемости методики для жидкого экстракта полыни горькой

№ испытания	Количественное определение флавоноидов, %							
1	0,156							
2	0,161							
3	0,149							
4	0,150							
5	0,153							
6	0,152							
Метрологические характеристики								
f	$\bar{x}$	S	$S_r$	$S^2$	P, %	t (P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$ , %
5	0,154	0,004	0,0286	0,000019	95	2,571	0,0042	2,73

По таблице критерия Фишера критическое значение ( $F_{крит}$ ) составляет 3,44. Рассчитанное значение критерия ( $F_{исп}$ ) составило 1,26, что, следовательно, меньше критического значения [15]. Полученные значения коэффициента вариации не превышают 10%. На основании результатов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости можно считать методику прецизионной.

Результаты валидации спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой представлены в таблице 5.

Содержание суммы флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой в среднем составило от 0,14 до 0,16%. Согласно требованиям ФС.3.4.0006.18 «Полыни горькой травы настойка», содержание суммы флавоноидов в настойке полыни 1:5 должно составлять не менее 0,05% [9]. Поскольку в жидком экстракте полыни 1:1

среднее содержание суммы флавоноидов превышает значения настойки в 2,8 раза, предложенная норма содержания для экстракта составляет не менее 0,10%.

### Заключение

Методом спектрофотометрии установили содержание флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой 1:1, которое составило  $1,54 \pm 0,04$  мг/мл в пересчете на рутин. Установлены параметры сходимости, повторяемости, воспроизводимости и линейности спектрофотометрического определения флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой 1:1. В ходе исследования доказано, что методика является специфичной и линейной, точной и достоверной в пределах диапазона применения и может быть рекомендована для рутинного контроля качества полученного экстракта по показателю «Количественное определение».

Таблица 4 – Результаты испытания внутрилабораторной прецизионности методики для жидкого экстракта полыни горькой

№	Содержание суммы флавоноидов, %							
	День 1 Аналитик 1	День 2 Аналитик 2						
1	0,156	0,158						
2	0,136	0,160						
3	0,147	0,144						
4	0,152	0,147						
5	0,140	0,147						
6	0,149	0,154						
7	0,145	0,149						
8	0,151	0,153						
9	0,149	0,148						
Метрологические характеристики (день 1, аналитик 1)								
f	$\bar{x}$	S	$S_r$	$S^2$	P, %	t (P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
8	0,147	0,0063	0,0429	0,000039	95	2,306	0,0048	3,27
Метрологические характеристики (день 2, аналитик 2)								
f	$\bar{x}$	S	$S_r$	$S^2$	P, %	t (P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
8	0,151	0,0056	0,0371	0,000031	95	2,306	0,0043	2,85

Таблица 5 – Результаты валидации методики количественного определения флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой

Параметр	Критерий приемлемости	Результат
Специфичность	Совпадение максимумов поглощения испытуемого раствора и стандарта рутина	Совпадение (при 410±1 нм)
Правильность	Процент восстановления от 95,0% до 105,0%	От 97,55% до 102,30 %
Сходимость	Коэффициент вариации 6 измерений $RSD \leq 5\%$ .	$RSD \leq 2,86\%$
Линейность	$r \geq 0,9950$	$y = 0,3112x - 0,0025$ $r = 0,9982$
Воспроизводимость	$RSD < 10\%$ $F_{крит} \geq F_{исп}$	$RSD_1 \leq 4,29\%$ $RSD_2 \leq 3,71\%$ $F_{набл} = 1,26,$ $F_{крит} > F_{исп}$

Предложена норма содержания флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой 1:1 не менее 0,10%.

### Литература

1. Chemical Composition and Biological Uses of Artemisia absinthium (Wormwood) / R. R. Bhat [et al.] // Plant and Human Health / eds.: M. Ozturk, K. Hakeem. Springer, Cham, 2019. Vol. 3.
2. Азарова, О. В. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия / О. В. Азарова, Л. П. Галактионова // Химия растит. сырья. 2012. № 4. С. 61–78.
3. Сальникова, Е. Н. Химическое исследование флавоноидов полыни горькой (Artemisiaabsinthium L), П. Сиверса (A. Sieversiana Willd.) и П. Якутской (A. Jacutica Drob.) / Е. Н. Сальникова, Г. И. Калинина, С. Е. Дмитрук // Химия растит. сырья. 2001. № 3. С. 71–78.
4. Чиряпкин, А. С. Обзор биологической активности флавоноидов: кверцетина и кемпферола / А. С. Чиряпкин, Д. С. Золотых, Д. И. Поздняков // Juvenis Scientia. 2023. Т. 9, № 2. С. 5–20.
5. Bioactive Compounds, Pharmacological Actions, and Pharmacokinetics of Wormwood (Artemisia absinthium) / G. E. Batiha [et al.] //Antibiotics (Basel). 2020 Jun. Vol. 9, N 6. С. 353.
6. Сушинская, О. А. Противовоспалительная активность спрея на основе ибупрофена и жидкого экстракта полыни / О. А. Сушинская, Н. С. Голяк // Вестн. фармации.

2021. № 3. С. 73–78.
7. Tetramethoxy hydroxyflavone p7F downregulates inflammatory mediators via the inhibition of nuclear factor kappaB / H. G. Lee [et al.] // Ann. N Y Acad. Sci. 2004 Dec. Vol. 1030. P. 555–568.
  8. Evaluation of topical antinociceptive effect of Artemisia absinthium extract in mice and possible mechanisms / F. Zeraati [et al.] // Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2014. Vol. 8, N 19. P. 492–496.
  9. Topical effects of Artemisia Absinthium ointment and liniment in comparison with piroxicam gel in patients with knee joint osteoarthritis: A randomized double-blind controlled trial / Z. Basiri [et al.] // Iran J. Med. Sci. 2017 Nov. Vol. 42, N 6. P. 524–531.
  10. Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики расчета количества флавоноидов / М. А. Джавахян [и др.] // Разработка и регистрация лекарств. средств. 2020. Т. 9, № 3. С. 118–127.
  11. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в жидком и сухом экстрактах растительной композиции / М. А. Джавахян [и др.] // Воп. обеспечения качества лекарств. средств. 2021. № 2. С. 12–22.
  12. Полыни горькой травы настойка // Государственная фармакопея Российской Федерации / ред.: Г. В. Авраменко, О. Г. Потанина, Е. В. Буданова. 14-е изд. Т. 4. Москва, 2018. С. 1831.
  13. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств : решение Коллегии Евраз. эконом. комис., 17 июля 2018 г., № 113 // Pravo.by [Электронный ресурс] : Нац. правовой Интернет-портал Респ. Беларусь / Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь. Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800209>. Дата доступа: 15.11.2023.
  14. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2 / [сост.: Н. В. Александрова и др.]. Москва : Евраз. эконом. комис., 2023. 458 с.
  15. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФРБЛ) : в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» ; под общ. ред. А. А. Шерякова. Молодечно : Победа, 2012. Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств. 1220 с.
  16. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний : ТКП 432-2021 (02041). Изд. офиц. Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь. 2012, 18 с.
  17. Производство лекарственных средств. Применение статистических методов валидации : ТКП 438-2012 (02041). Изд. офиц. Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. 32 с.

Поступила 28.09.2023 г.

Принята в печать 17.10.2023 г.

## References

1. Bhat RR, Rehman MU, Shabir A, Mir MUR, Ahmad A, Khan R, et al. Chemical Composition and Biological Uses of Artemisia absinthium (Wormwood). In: Ozturk M, Hakeem K, eds. Plant and Human Health. Springer, Cham; 2019. Vol 3. doi: 10.1007/978-3-030-04408-4\_3
2. Azarova OV, Galaktionova LP. Flavonoids: mechanism of anti-inflammatory action. Khimiya Rastit Syr'ya. 2012;(4):61-78. (In Russ.)
3. Salnikova EN, Kalinina GI, Dmitruk SE. Chemical study of flavonoids of bitter wormwood (Artemisiaabsinthium l), P. Siversa (A. siversianaWilld.) and P. Yakutskoi (A. jacuticaDrob.). Khimiya Rastit Syr'ya. 2001;(3):71-8. (In Russ.)
4. Chiryapkin AS, Zolotykh DS, Pozdnyakov DI. Review of the biological activity of flavonoids: quercetin and kaempferol. Juvenis Scientia. 2023;9(2):5-20. (In Russ.). doi: 10.32415/jscientia\_2023\_9\_2\_5-20
5. Batiha GE, Olatunde A, El-Mleeh A, Hetta HF, Al-Rejaie S, Alghamdi S, et al. Bioactive Compounds, Pharmacological Actions, and Pharmacokinetics of Wormwood (Artemisia absinthium). Antibiotics (Basel). 2020 Jun;9(6):353. doi: 10.3390/antibiotics9060353
6. Sushinskaya OA, Golyak NS. Anti-inflammatory activity of a spray based on ibuprofen and liquid extract of wormwood. Vestn Farmatsii. 2021;(3):73-8. (In Russ.)
7. Lee HG, Kim H, Oh WK, Yu KA, Choe YK, Ahn JS, et al. Tetramethoxy hydroxyflavone p7F downregulates inflammatory mediators via the inhibition of nuclear factor kappaB. Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1030:555-68. doi: 10.1196/annals.1329.065
8. Zeraati F, Esna-Ashari F, Araghchian M, Emam AH, Rad MV, Seif S, et al. Evaluation of topical antinociceptive effect of Artemisia absinthium extract in mice and possible mechanisms. Afr J Pharm Pharmacol. 2014;8(19):492-6. doi: 10.5897/AJPP2012.1518
9. Basiri Z, Zeraati F, Esna-Ashari F, Mohammadi F, Razzaghi K, Araghchian M, et al. Topical effects of Artemisia Absinthium ointment and liniment in comparison with piroxicam gel in patients with knee joint osteoarthritis: A randomized double-blind controlled trial. Iran J Med Sci. 2017 Nov;42(6):524-31.
10. Dzhavakhyan MA, Tokareva MG, Prozhogina YuE, Kalenikova EI. Development of Sedoflav capsules, standardization and validation of the methodology for calculating the amount of flavonoids. Razrabotka Registratsiya Lekarstv Sredstv. 2020;9(3):118-27. (In Russ.). doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127
11. Dzhavakhyan MA, Tokareva MG, Fadeev NB, Dul VN, Prozhogina YuE, Kalenikova EI. Development and validation of the technique for quantitative determination of the sum of flavonoids in liquid and dry extracts of plant composition. Vop Obespecheniya Kachestva Lekarstv Sredstv. 2021;(2):12-22. (In Russ.). doi: 10.34907/IPQAI.2021.26.35.003
12. Wormwood bitter herb tincture. V: Avramenko GV, Potanina OG, Budanova EV, red. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. 14-e izd. T 4. Moscow, RF; 2018. P. 1831. (In Russ.)
13. Guidelines for validation of analytical methodologies for drug testing: reshenie Kollegii Evraz ekonom komis, 17

- iyulya 2018 g, № 113. Nats tsentr pravovoi inform Resp Belarus'. Pravo.by: Nats pravovoi Internet-portal Resp Belarus'. Available from: <https://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800209>. [Accessed 15th November 2023]. (In Russ.)
14. Aleksandrova NV, Golik GI, Borodko TA, Zanevskaya YuV, Kapitulets NN, Marchenko SI, i dr. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. T 1. Ch 2. Moscow, RF: Evraz ekonom komis; 2023. 458 p. (In Russ.)
  15. M-vo zdravookhraneniya Respubliki Belarus', UP «Tsentr ekspertiz i ispytaniy v zdravookhraneni»; Sheryakov AA, red. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus (GFRBII): v 2 t. Molodechno, RB: Pobeda; 2012. T 1: General methods of quality control of medicines. 1220 p. (In Russ.)
  16. Manufacture of medicinal products. Validation of test methods: TKP 432-2021 (02041). Izd. ofits. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniya Resp Belarus'; 2012. 18 p. (In Russ.)
  17. Manufacture of medicinal products. Application of statistical methods of validation: TKP 438-2012 (02041). Izd. ofits. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniya Resp Belarus'; 2012. 32 p. (In Russ.)

*Submitted 28.09.2023*

*Accepted 17.10.2023*

**Сведения об авторах:**

О.А. Сушинская – м.ф.н., аспирант кафедры фармацевтической технологии, Белорусский государственный медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0002-6801-7285>,  
e-mail: [sushinskayaoa@gmail.com](mailto:sushinskayaoa@gmail.com) – Сушинская Ольга Александровна.

**Information about authors:**

O.A. Sushinskaya – Master of Pharmaceutical Sciences, postgraduate of the Chair of Pharmaceutical Technology, Belarusian State Medical University, <https://orcid.org/0000-0002-6801-7285>,  
e-mail: [sushinskayaoa@gmail.com](mailto:sushinskayaoa@gmail.com) – Olga A. Sushinskaya.