

УДК 615.074

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2021.26.35.003>

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЖИДКОМ И СУХОМ ЭКСТРАКТАХ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ

М.А. Джавахян, доктор фарм. наук, доцент, ведущий научный сотрудник экспериментально-технологического отдела ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), преподаватель кафедры фармакологии Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (МГУ им. М. В. Ломоносова), г. Москва, akorovatarina13@mail.ru

М.Г. Токарева, аспирант Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (МГУ им. М. В. Ломоносова), научный сотрудник экспериментально-технологического отдела ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва, t-mehri@yandex.ru

Н.Б. Фадеев, старший научный сотрудник отдела растительных ресурсов ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва, nfadeev@mail.ru

В.Н. Дул, канд. фарм. наук, ведущий научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва, dvnslava@yandex.ru

Ю.Э. Прожогина, студент факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова), г. Москва, yulia-pro93@mail.ru

Е.И. Каленикова, доктор фарм. наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова), г. Москва, eikaleni@yandex.ru

Целью исследования была разработка методики количественного определения суммы флавоноидов как основных терапевтически активных соединений в экспериментальных жидком и сухом экстрактах уникальной растительной композиции, включающей траву пустырника, зверобоя, Melissa и чабреца, а также валидация созданных методик. Определение суммы флавоноидов проводилось методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 410 нм. Метод основан на реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом трехвалентного алюминия,

в результате чего происходит bathochromic сдвиг полосы поглощения с 330–350 нм до 390–410 нм, что позволяет провести количественное обнаружение искомых соединений в растворе по разнице аналитического сигнала тех же растворов без добавления солей алюминия. В качестве стандарта использован раствор стандартного образца (СО) рутин в 70% этиловом спирте. Валидация созданных методик проводилась согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ XIV издания, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». В результате разработаны методики

количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в жидком и сухом экстрактах уникальной растительной композиции. Созданные методики подверглись валидации, в ходе которой были установлены критерии их приемлемости, а именно: специфичность, линейность, правильность, сходимость и воспроизводимость, которые признаны положительными. Полученные в ходе валидации данные дают возможность считать разработанные методики пригодными для достоверного количественного определения суммы флавоноидов в изучаемых сухом и жидком экстрактах для их дальнейшей стандартизации и контроля качества.

Ключевые слова: количественное определение фенольных соединений, флавоноиды, стандартизация, валидация, дифференциальная УФ-спектрофотометрия

На сегодняшний день нервные расстройства и неврозы, вызванные ускоренным темпом жизни, стрессами и отсутствием адекватного отдыха, – одна из наиболее частых причин обращения пациентов как к врачам общей практики, так и к специалистам-неврологам. Назначаемые при этом седативные препараты, снижая реакцию на внешние раздражители, помогают уменьшить возбуждение, снять тревогу, облегчить наступление сна, устранить фобии, предотвращая наступление тяжелых соматических осложнений, к которым могут привести неврозы. Общеизвестно, что препараты растительного происхождения действуют мягче синтетических, что обусловлено включением в их состав сопутствующих компонентов из лекарственного растительного сырья [1–5]. Седативные препараты растительного происхождения представлены в основном средствами на основе валерианы, пустырника, пиона лекарственного, мяты перечной.

Нами разработана уникальная комбинация растительных компонентов, которая вклю-

чает измельченное сырье трав пустырника, зверобоя, мелиссы и чабреца в соотношении 4:2,5:2,5:1 соответственно [6–9]. Данные растения собраны в Северо-Кавказском филиале ФГБНУ ВИЛАР и высушены воздушно-теневым способом. Сравнительное фармакологическое изучение влияния на нервную и сердечно-сосудистую систему разработанной растительной композиции в сравнении с лекарственными препаратами растительного происхождения «Фито Ново-Седом» и «Ново-Пасситом» установило более выраженное седативное и гипотензивное действие для исследуемой комбинации растительных компонентов [7].

Полученные из данного сбора жидкий и сухой экстракты могут стать совершенно новыми и не имеющими аналогов по составу отечественными седативными препаратами. Несомненным преимуществом является произрастание в дикорастущем виде или культивирование используемых в сборе лекарственных растений на территории Российской Федерации, что исключает зависимость от зарубежных поставщиков.

В связи с тем, что возросшие требования к стандартизации лекарственных растительных препаратов приводят к необходимости количественной оценки содержания действующих веществ (а для сырья, из которого предусматривается изготовление экстрактов, это флавоноиды) [10], представляется целесообразным проводить оценку их качества по основным действующим веществам – флавоноидам [11–13].

Целью исследования являлась разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в жидком и сухом экстрактах новой растительной композиции, а также ее валидация.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовалось оборудование, прошедшее метрологическую аттеста-

Таблица 1

ОБОРУДОВАНИЕ И ПРИБОРЫ

Наименование прибора	Модель
Весы аналитические Vibra Shinko Denshi, класс 2	HRT-220CE
Весы аналитические AND, класс 2	ER-182A
Спектрофотометр Shimadzu	UV-1800
Спектрофотометр Cary	100 Scan Varian

цию и имеющее соответствующие сертификаты/акты/свидетельства (табл. 1).

Объектами исследования являлись жидкий и сухой экстракты растительной композиции, для анализа которых применялись следующие реактивы:

- вода очищенная (фармакопейная статья «Вода очищенная. ФС.2.2.0020.18», Государственная фармакопея РФ, XIV издание, том III);
- спирт этиловый (ГОСТ Р 5962-2013);
- алюминия хлорид (Ranreas, кат. номер: 7784-13-6);

- кислота уксусная (ГОСТ 61-75; СТ СЭВ 5375-85).

В качестве стандарта для пересчета содержания суммы флавоноидов на рутин использована субстанция – порошок рутина (Sigma-Aldrich, CAS-номер 207671-50-9), предназначенная для количественного анализа соединений фенольной природы.

Для оценки суммарного содержания флавоноидов в растительных препаратах широко используют дифференциальную спектрофотометрию, основанную на реакции комплексообразования флавоноидов с ионами трехвалентных металлов – Al, Zr, Ga и др. [14,15], обладающую большей селективностью по сравнению с прямым спектрофотометрическим методом [15,16]. В результате реакции комплексообразования с алюминия хлоридом происходит батохромный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 нм до 390–410 нм [10], что позволяет количественно обнаружить искомые действующие вещества по оптической плотности растворов в этой области спектра относительно тех же растворов без AlCl₃.

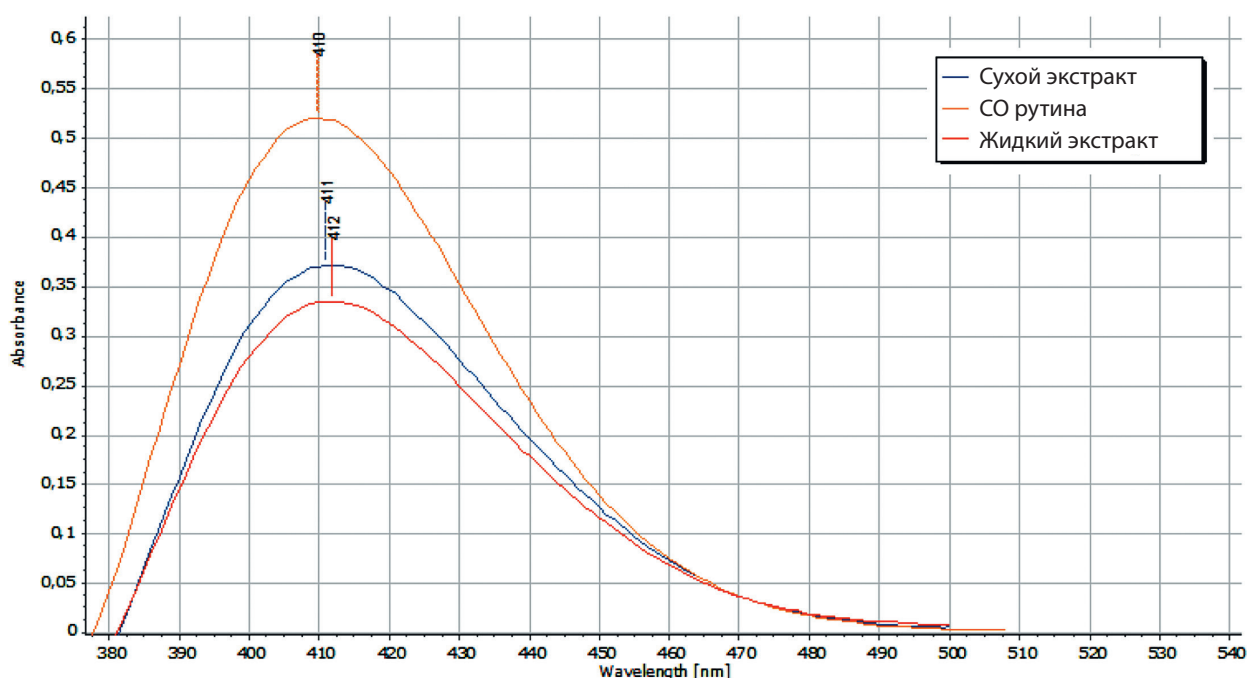


РИС. 1. Дифференциальные УФ-спектры изучаемых жидкого и сухого экстрактов и стандарта рутина с AlCl₃

Таблица 2

λ_{\max} РАСТВОРОВ ЖИДКОГО И СУХОГО ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ И СТАНДАРТА РУТИНА С $AlCl_3$

Наименование исследуемого образца	$\lambda_{\max}, X \pm \Delta x, \% (n=5)$
Стандарт рутина	410 \pm 2
Жидкий экстракт	412 \pm 1, $p > 0,05$ vs стандарт рутина*
Сухой экстракт	411 \pm 2, $p > 0,05$ vs стандарт рутина*

* *U-критерий Манна – Уитни*

При добавлении 5% раствора хлорида алюминия в 70% этиловом спирте к раствору изучаемого сухого экстракта или к жидкому экстракту в спектре извлечений наблюдается максимум поглощения, который совпадает с максимумом поглощения раствора рутина с хлоридом алюминия (рис. 1, табл. 2). Это определило выбор длины волны 410 \pm 2 нм как характеристической для количественного определения содержания флавоноидов в изучаемых растительных экстрактах.

Фармакопейные методики количественного определения флавоноидов в сырье пустырника, чабреца и зверобоя предусматривают добавление уксусной кислоты в раствор сравнения для подавления диссоциации флавоноидов и проведение спектрофотометрии через 30 минут после приготовления растворов [17]. В то же время в литературе описаны спектрофотометрические методики определения суммы флавоноидов без подкисления растворов или с подкислением не только раствора сравнения, но и испытуемого образца [18]. Нами было изучено влияние внесения уксусной кислоты в раствор сравнения (раствор жидкого экстракта без $AlCl_3$) на величину его оптической плотности. Показано, что подкисление раствора сравнения не влияет на величину его оптической плотности (рис. 2а). Дифференциальная оптическая плотность раствора жидкого экстракта относительно раствора сравнения с подкислением и без остается постоянной на протяжении как минимум двух часов (рис. 2б). Полученные данные свидетельствуют о возможности проведения измерений оптической плотности растворов изучаемых экстрактов в течение двух часов после приготовления растворов и без подкисления раствора сравнения.

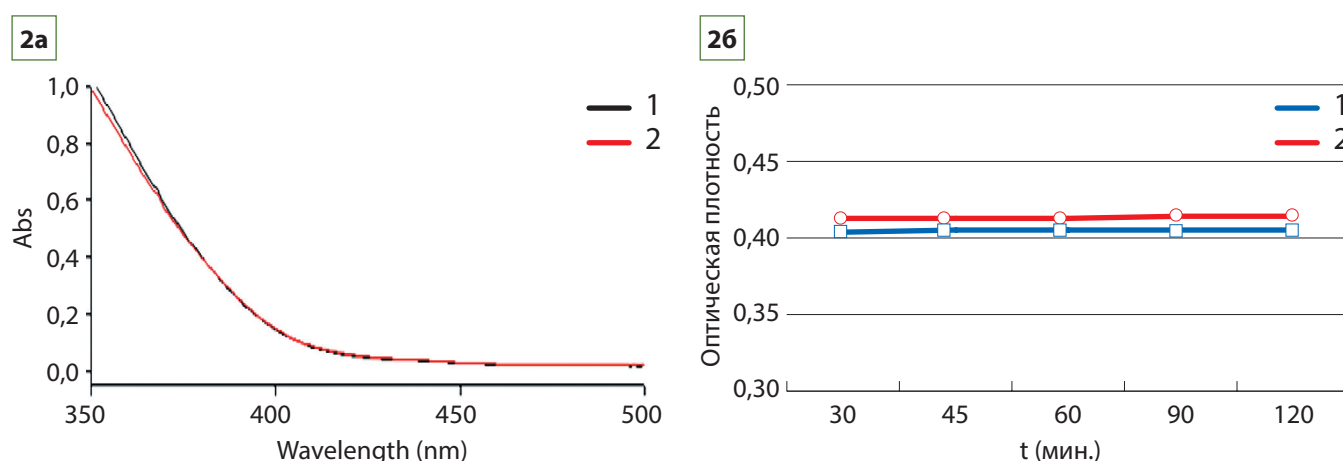


РИС. 2. *Постоянство оптической плотности в аналитической области спектра растворов жидкого экстракта растительной композиции с добавлением и без добавления $AlCl_3$; а – оптическая плотность раствора сравнения – жидкого экстракта без $AlCl_3$ с внесением уксусной кислоты (1) и без внесения (2) относительно 70% спирта этилового; б – дифференциальная оптическая плотность (410 нм) раствора жидкого экстракта с $AlCl_3$ относительно раствора сравнения с внесением уксусной кислоты (1) и без внесения (2)*

Методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте растительной композиции

Приготовление 5% раствора алюминия хлорида

В плоскодонную коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 200 мл помещают 5 г алюминия хлорида и прибавляют 100 мл этилового спирта 70%, перемешивают. Срок годности раствора – один месяц.

Аналитическую пробу сухого экстракта около 0,1 г (точная навеска) переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяют в 20 мл спирта этилового 70%; объем доводят до метки 70% спиртом этиловым и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 1 мл раствора А, 5 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и объем доводят до метки 70% этиловым спиртом (раствор Б). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 1 мл раствора А, объем доводят до метки 70% спиртом этиловым (раствор В) [12].

Оптическую плотность раствора Б измеряют через 30 мин. на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор В.

Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора (раствора А) при 410 нм; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса стандарта рутин с алюминием хлористым при 410 нм, равный 260; m – масса сухого экстракта, взятого для анализа, г; W – влажность сухого экстракта, %.

Методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в жидком экстракте растительной композиции

Аналитическую пробу жидкого экстракта (1 мл) в мерной колбе вместимостью 50 мл растворяют в 20 мл спирта этилового 70% и объем доводят до метки 70% спиртом этиловым, перемешивают (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл раствора А, 5 мл 5% раствора алюминия хлорида и объем доводят до метки 70% этиловым спиртом (раствор Б). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл раствора А, объем доводят до метки 70% этиловым спиртом (раствор В). Оптическую плотность раствора Б измеряют через 30 мин. на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор В [13]. Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25}{V_a \cdot 2 \cdot A_{1\text{см}}^{1\%}},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора (раствора А) при 410 нм; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса стандарта рутин с алюминием хлористым при 410 нм, равный 260; V_a – объем жидкого экстракта, взятого для анализа, мл.

Статистическая обработка результатов проведена в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания [9] с использованием программного пакета Statistica 8.0.

Валидация методики

Квалификации методики (валидация) проводилась в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания по критериям: специфичность, линейность, правильность, сходимость и воспроизводимость [17].

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ЛИНЕЙНОСТИ МЕТОДИКИ СТАНДАРТА РУТИНА

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения (около)	Объем аликвоты р-ра стандарта (рутин), мл	Концентрация стандарта (рутин), мкг/мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)
1	40	0,4	6,40	0,135
2	60	0,6	9,60	0,219
3	90	0,9	14,40	0,371
4	110	1,1	17,60	0,5
5	140	1,4	22,40	0,701
6	160	1,6	25,60	0,793
7	190	1,9	30,40	0,908

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты испытания специфичности

Дифференциальный УФ-спектр суммы флавоноидов сухого и жидкого экстрактов в диапазоне длин волн от 350 до 500 нм (рис. 1) имеет максимум поглощения при длине волны

410±2 нм. Аналогичный максимум поглощения имеет дифференциальный спектр раствора стандартного образца рутина.

Результаты испытаний валидности методики по критериям: линейность, правильность, сходимость и воспроизводимость представлены в табл. 3–7 соответственно.

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ ДЛЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА

№ п/п	Найдено, мг/г	Добавлено стандарта рутина, мг/г	Ожидаемое значение, мг/г	Полученное значение, мг/г	Абсолютная ошибка, мг/г	Выход, %
1.1	4,57	1,14	5,71	5,77	-0,06	100,98
2.1	4,57	2,29	6,86	7,04	-0,19	102,72
3.1	4,57	3,43	8,00	7,91	0,08	98,95
1.2	4,57	1,14	5,71	5,61	0,10	98,29
2.2	4,57	2,29	6,86	6,60	0,25	96,33
3.2	4,57	3,43	8,00	8,17	-0,17	102,16
1.3	4,57	1,14	5,71	5,61	0,11	98,12
2.3	4,57	2,29	6,86	6,86	-0,01	100,14
3.3	4,57	3,43	8,00	7,92	0,08	99,01
Среднее значение выхода, %				99,6		

Таблица 5

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ
ДЛЯ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА**

№ п/п	Найдено, мг/мл	Добавлено стандарта рутина, мг/мл	Ожидаемое значение, мг/мл	Полученное значение, мг/мл	Абсолютная ошибка, мг/мл	Выход, %
1.1	88,00	22,00	110,00	108,17	1,83	98,34
2.1	88,00	44,00	132,00	130,77	1,23	99,07
3.1	88,00	66,00	154,00	152,88	1,12	99,28
1.2	88,00	22,00	110,00	106,25	3,75	96,59
2.2	88,00	44,00	132,00	132,21	-0,21	100,16
3.2	88,00	66,00	154,00	153,85	0,15	99,90
1.3	88,00	22,00	110,00	107,45	2,55	97,68
2.3	88,00	44,00	132,00	130,05	1,95	98,52
3.3	88,00	66,00	154,00	156,01	-2,01	101,30
Среднее значение выхода, %				98,98		

Таблица 6

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ СХОДИМОСТИ МЕТОДИКИ ДЛЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА

№ испытания	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализе, %	
	Сухой экстракт	Жидкий экстракт
1	4,71	0,88
2	4,68	0,85
3	4,58	0,90
4	4,81	0,88
5	4,77	0,87
6	4,70	0,87
Среднее значение содержания, %	4,71	0,87
S, % (единица измерения испытаний)	0,0794	0,015
CV, %	1,69	1,66
ε, %	1,8	1,7

Таблица 7

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ МЕТОДИКИ
ДЛЯ СУХОГО И ЖИДКОГО ЭКСТРАКТОВ**

	Аналитик 1	Аналитик 2	Аналитик 1	Аналитик 2
	Сухой экстракт		Жидкий экстракт	
Образец №	День 1	День 2	День 1	День 2
1	4,78	4,90	0,88	0,88
2	4,70	4,68	0,89	0,89
3	4,55	4,76	0,86	0,87
4	4,72	4,61	0,86	0,90
5	4,71	4,74	0,87	0,87
6	4,66	4,76	0,88	0,87
7	4,90	4,83	0,86	0,86
8	4,83	4,82	0,89	0,88
9	4,77	4,79	0,88	0,87
Среднее содержание рутина, %	4,74	4,77	0,87	0,88
S, %	0,1009	0,0852	0,0124	0,0125
CV, %	2,13	1,79	1,42	1,42
D	0,010178	0,007253	0,00015325	0,0001555
Критерий Фишера F (95%, $f_1=8$, $f_2=8$)=3,44	1,40		0,99	

Определение линейности проводили на 7 уровнях концентрации 40%, 60%, 90%, 110%, 140%, 160% и 190% теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (в диапазоне 6,4–30,4 мкг/мл). Коэффициент корреляции (R^2) составил 0,9937, что соответствует критерию приемлемости: коэффициент между рядом полученных значений не ниже 0,995 (рис. 3).

Контроль правильности методики оценивали на модельных смесях с добавлением стандарта рутина 25, 50, 75% к его исходной концентрации в жидком и сухом экстрактах. Установлено, что процент восстановления для сухого экстракта находится в пределах от 96,21% до 102,62% и имеет среднее значение 99,6%, а для жидкого экстракта – в пределах

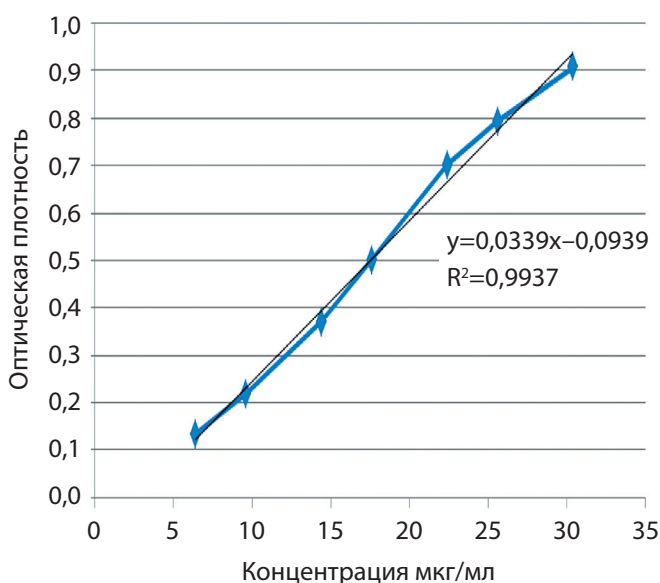


РИС. 3. Зависимость оптической плотности раствора комплекса рутина с $AlCl_3$ от его концентрации

РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИОННОЙ ОЦЕНКИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ПЕРЕСЧЕТЕ НА РУТИН

Параметр	Критерий валидности	Результат	
		Сухой экстракт	Жидкий экстракт
Специфичность	Совпадение спектральных характеристик со стандартом рутина	Совпадение λ_{\max}	Совпадение λ_{\max}
Сходимость	Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений $CV \leq 5\%$	$CV \leq 1,69\%$	$CV \leq 1,66\%$
Воспроизводи- мость	$CV < 0\%$ $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	$CV1 \leq 2,13\%$ $CV2 \leq 1,79\%$ $t_{\text{выч}} = 1,40,$ $(t_{\text{табл}} = 3,44),$ $n = 9$	$CV1 \leq 1,42\%$ $CV2 \leq 1,42\%$ $t_{\text{выч}} = 0,99,$ $(t_{\text{табл}} = 3,44),$ $n = 9$
Линейность	$R^2 \geq 0,99$	$R^2 = 0,9937;$ $y = 0,0339x - 0,0939$	
Правильность (точность)	Процент восстановления $R \in [95,0\%; 105,0\%]$	$R \in [96,21\%; 102,62\%]$	$R \in [96,64\%; 101,30\%]$

от 96,64% до 101,3% и имеет среднее значение 98,98%, что соответствует требованиям критерия приемлемости (от 95,0% до 105,0% для растительного сырья).

Сходимость методики определяли на одном образце сырья в 6 повторностях. Коэффициент вариации для 6 определений составил 1,69% для сухого экстракта и 1,66% для жидкого, что удовлетворяет условию не более 5%.

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики проводили два аналитика на 9 повторностях образца сухого и жидкого. Полученные значения коэффициента вариации не превышают 10%, что позволяет считать внутрилабораторную воспроизводимость результатов приемлемой.

Полученные данные дают возможность считать разработанные методики пригодными для достоверного количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в изучаемых экстрактах.

ВЫВОДЫ

Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом и жидком спиртовых экстрактах растительной композиции, которая включает измельченное сырье трав пустырника, зверобоя, Melissa и чабреца в соотношении 4:2,5:2,5:1. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 0,99\%$ для жидкого экстракта и $\pm 1,40\%$ для сухого.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганопольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д. Перспективы использования фитопре-

- паратов в современной фармакологии // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2017. – Т. 15. – №2.
2. Gulyaev S.M., Taraskin V.V., Radnaeva L.D., Nikolaev S.M. Antiamnestic effect of Phlojodicarpus sibiricus extract in a scopolamine-induced amnesia model // *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2017. – V. 15. – №4. – P. 53–57.
 3. Рачин А.П. Открытое сравнительное рандомизированное исследование эффективности и безопасности применения растительных препаратов Персен® и Персен® Ночь у пациентов с кратковременной инсомнией // *Нервно-мышечные болезни*. – 2016. – Т. 6. – №2.
 4. Титов А.Ю., Абрицова М.В. Использование препарата растительного происхождения // *Лечащий врач*. – 2018. – №4 – 2014. – С. 59.
 5. Шавловская О.А. Терапия тревожных состояний препаратами растительного происхождения // *Эффективная фармакотерапия*. – 2016. – №25. – С. 62.
 6. Токарева М.Г., Прожогина Ю.Э., Каленикова Е.И., Джавахян М.А. Фармакогностические и фармакологические аспекты создания новых седативных препаратов на основе лекарственного растительного сырья // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2018. – Т. 21. – №3. – С. 3–10.
 7. Патент 2683643 Российская Федерация, МПК А61К 36/53, А61К 36/533, А61К 36/38, В01D 11/02, А61Р9/02, А61Р 25/20. Способ получения водно-спиртового экстракта лекарственных растений, обладающего седативным и гипотензивным действием / Джавахян М.А. и др.; заявитель и патентообладатель – ФГБНУ ВИЛАР. – №2018118635, заявл. 22.05.2018, опубл. 01.04.2019. – Бюлл. №10.
 8. Токарева М.Г., Куляк О.Ю., Дул В.Н., Рудь Н.К. Разработка технологии получения сухого экстракта из седативной растительной композиции / *Международная научная конференция «Перспективы лекарственного растениеводства»*. Посвящается 100-летию со дня рождения профессора Алексея Ивановича Шретера. Сб. науч. трудов, – М., ВИЛАР, 2018. – С. 608–611.
 9. Панин В.П., Панина М.И., Токарева М.Г., Джавахян М.А. Фармакологический скрининг при разработке фармацевтических композиций из лекарственного растительного сырья / *Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина, «Достижения современной фармакологической науки»*. – 2018. – С. 84–85.
 10. Евдокимова О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: «Химия. Биология. Фармация»*. – 2007. – №2. – С. 155–160.
 11. Лесовая Ж.С., Писарев Д.И., Новиков О.О., Романова Т.А. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* Lsl // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: «Медицина. Фармация»*. – 2010. – Т. 12. – №22(93).
 12. Ал Ш., Киселева Т.Л. Разработка и валидация методик количественного определения суммы флавоноидов в сборах №1 и №2 для профилактики и лечения отморожений // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: «Медицина. Фармация»*. – 2013. – Т. 22. – №11(154).
 13. Бубенчиков Р.А. Спектрофотометрический метод определения содержания суммы флавоноидов в надземной части *Viola odorata* // *Научные ведомости Белгород-*

- ского государственного университета. Серия: «Естественные науки». – 2011. – Т. 15. – №9–2(104).
14. Турсыматова О.И., Дильмаханова М.М. Физико-химические свойства флавоноидов // Наука и мир. – 2015. – Т. 1. – №5. – С. 30–31.
15. Марахова А.И. Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе: дисс. ... доктора фарм. наук (14.04.02) / Марахова Анна Игоревна; Первый МГМУ им. И.М. Сеченова. – Москва. – 2016.
16. Бабаджанян А.А., Кайшева Н.Ш., Умняхина И.В. Применение фотометрических методов в анализе растительных лекарственных средств // ББК 52.82 Б 43. – 2015. – С. 17.
17. Государственная фармакопея РФ XIV издания.
18. Марахова А.И., Сорокина А.А., Станишевский Я.М. Применение принципа сквозной стандартизации в анализе флавоноидов травы пустырника и препаратов на его основе // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №1. – С. 150–154.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF FLAVONOIDS IN LIQUID AND DRY EXTRACTS OF HERBAL COMPOSITION

M.A. Dzhavakhyan¹, M.G. Tokareva^{1,2}, N.B. Fadeev¹, V.N. Dul¹, Y.E. Prozhogina², E.I. Kalenikova¹

¹ All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants

² Moscow State University named after M.V. Lomonosov

The aim of the study was to develop methods for quantifying the amount of flavonoids as the main therapeutically active compounds in experimental liquid and dry extracts of a unique plant composition, including motherwort, St. John's wort, Melissa and thyme, as well as their validation. Determination of the flavonoid sum was carried out by differential spectrophotometry at a wavelength of 410 nm. The method is based on the complexation reaction of flavonoids with trivalent aluminum chloride, resulting in a bathochromic shift of the absorption band from 330–350 nm to 390–410 nm, which allows quantitative detection of the desired compounds in the solution by the difference in the analytical signal of the same solutions without the addition of aluminum salts. As a standard, a solution of the standard sample rutin in 70% ethyl alcohol was used. Validation of the created methods was carried out according to the requirements of XIV edition of the State Pharmacopoeia of Russian Federation, General Pharmacopoeia article 1.1.0012.15 «Validation of analytical techniques». Methods of quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of rutin in liquid and dry extracts of a unique plant composition have been developed. The developed methods underwent validation, during which the criteria of their acceptability were established, namely: specificity, linearity, correctness, convergence and reproducibility, which were recognized as positive. The data obtained during validation make it possible to consider the developed methods suitable for reliable quantitative determination of the amount of flavonoids in the studied dry and liquid extracts for their further standardization and quality control.

Keywords: quantitative determination of phenolic compounds, flavonoids, standardization, validation, differential UV-spectrometry