

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2022.93.26.005>

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРЕХРЕБЕРНИКЕ НЕПАХУЧЕМ ЦВЕТКАХ

О.Л. Блинова, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь, oblinova@mail.ru

А.А. Гилева, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь, angelinaustinova@mail.ru

В.Д. Белоногова, доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь, belonogovavd@yandex.ru

В работе представлена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в *Tripleurospermum inodorum flores* спектрофотометрическим методом анализа. Установлены валидационные характеристики: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность. Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в образцах сырья составило $4,08 \pm 0,042\%$. Разработанная методика является валидной, точной, воспроизводимой и доступной.

Ключевые слова: валидация, методика, *Tripleurospermum inodorum (L.) Sch. Bip.*, лекарственное растительное сырье, флавоноиды, спектрофотометрия

В научной медицине широко используются ромашки аптечной цветки *Chamomilla recutitae flores* [1], обладающие спазмолитическим, противовоспалительным, желчегонным, антивирусным, акарицидным, репеллентным действием [2]. По внешним признакам к ромашке аптечной близок трехреберник

непахучий, который может быть ошибочно заготовлен вместо нее.

Трехреберник непахучий (ромашка непахучая, трехреберник перфорированный) – *Tripleurospermum inodorum (L.) Sch. Bip.* – относится к отделу *Magnoliophyta* – Цветковые растения, классу *Magnoliopsida* – Двудольные растения, порядку *Asterales* – Астроцветные, семейство *Asteraceae* – Астровые, роду *Tripleurospermum* – Трехреберник, виду *inodorum (L.) Sch. Bip.* – непахучий [3].

По литературным данным [4,5], в химическом составе трехреберника непахучего, обнаружены моно- и сесквитерпеноиды, фенилпропаноиды, производные фурана, бензола, дубильные вещества, органические кислоты и флавоноиды.

По сравнению с ромашкой аптечной трехреберник непахучий имеет достаточную сырьевую базу на территории России, которая обеспечена за счет дикорастущих видов [3], обладает близким фармакологическим действием. Так, порошок соцветий трехреберника непахучего обладает акарицидным действием, этанольный экстракт проявляет

антивирусную активность в отношении полиовируса II типа и вируса герпеса I типа, порошок соцветий – инсектицидную и репеллентную активность [5].

Таким образом, *Tripleurospermum inodorum* является перспективным видом для введения в научную медицину.

Поскольку отдельные виды фармакологической активности трехреберника непахучего обусловлены наличием фенольных соединений – флавоноидов (табл. 1), считаем целесообразным проводить стандартизацию сырья по данной группе веществ.

Ранее нами была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин для *Tripleurospermum inodorum flores* с использованием дифференциальной спектрофотометрии. Чтобы методика занимала достойное место в системе обеспечения качества и гарантировала достоверные и точные результаты анализа, она должна быть валидна [6].

Цель исследования – валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в *Tripleurospermum inodorum flores* с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Валидация методики проводилась в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания по параметрам: линейность, прецизионность и правильность [6]. Данные критерии определяли с помощью дифференциальной спектрофотометрии [7] на спектрофотометрах СФ-2000 и Shimadzu UV-1800.

Валидацию разработанной методики проводили на объединенном образце трехреберника непахучего цветков, полученном путем смешивания в равных количествах образцов,

собранных в Пермском крае, Свердловской области, окрестностях г. Курган, Удмурии и Чувашии в течение 2017–2020 гг.

Валидируемая методика [8]. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих через сито 2 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, добавляют 50 мл спирта 70%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане 60 мин., периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 50 мл, доводят до метки спиртом 70% (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, 1 мл алюминия хлорида раствора 2% в спирте 96%, 1 каплю уксусной кислоты 5% и доводят до метки 96% спиртом. Через 40 мин. измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (раствор Б).

Раствор сравнения: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, 1 каплю уксусной кислоты 5% и доводят до метки 96% спиртом.

Приготовление СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135°C в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96% спирта, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А – СО рутина).

1 мл раствора А СО рутина, 1 капля уксусной кислоты 5%, 1 мл алюминия хлорида раствора 2% в спирте 96%, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят 96% спиртом до метки (раствор Б – СО рутина).

Содержание суммы флавоноидов в трехребернике непахучем цветках в пересчете

Таблица 1

**СВЕДЕНИЯ О ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ ЦВЕТКОВ
И ТРЕХРЕБЕРНИКА НЕПАХУЧЕГО**

Биологически активные вещества	Ромашка аптечная	Трехреберник непахучий
1. Эфирное масло и горечи	0,24–1,9%	0,35–0,85%
2. Фенольные соединения:		
2.1. Флавоноиды:	1,48–2,76%	
2.1.1. Производные флавонола:		
Апигенин (5,7,4'-триоксифлавонол):	+	
Гликозиды апигенина:		
7-о-в-глюкозид	+	
7-в-Д-(2''-о-ацетил)-глюкозид	+	
7-(2'',3''-о-диацетил)-глюкозид	+	
7-(3'',4''-о-диацетил)-глюкозид	+	
5,4'-диокси-7-апио-7-глюкозид (апиин)	+	+
5,4'-диокси-7-в-Д-глюкозид (космосин)	+	
Лютеолин (5,7,3',4'-тетраоксифлавонол)	+	
Гликозиды лютеолина:		
4'-глюкозид	+	+
7-о-глюкозид (цинарозид)	+	
Хризозеолин (5,7,4'-триокси-3'-метоксифлавонол)	+	
2.1.2. Производные флавонола:		
Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонол)	+	
Гликозиды кверцетина:		
5,7,3',4'-тетраокси-3-в-Д-галактозид (гиперозид)	+	
5,7,3',4'-тетраокси-3-рутинозид (рутин)	+	
5,7,3',4'-тетраокси-7-в-Д-глюкозид (кверцетин)	+	
6,8-диметилэфир 6,8-дигидроксикверцетина	+	
3,6,7,3'-тетраметилэфир кверцетина	+	
6-метилэфир 6-гидрокси кемпферола	+	
Изорамнетин (3,5,7,4'-тетраокси-3'-метоксифлавонол)	+	
Патулетин (3,5,7,3',4'-пентаокси-6-метоксифлавонол)	+	
Яцендин (5,7,4'-триокси-3,6,3'-триметоксифлавонол)	+	
Хризоспленол (5,2'-диокси-3,7,4',5'-тетраметоксифлавонол)	+	
Спинацетин (3,5,7,4'-тетраокси-6,3'-диметоксифлавонол)	+	
Аксилларин (5,7,3',4'-тетраокси-3,6-диметоксифлавонол)	+	
Эупалитин	+	
2.2. Кумарины (умбеллиферон, герниарин)	+	
2.3. Фенолкарбоновые кислоты (салициловая, кофейная и др.) и их производные	+	
2.4. Дубильные вещества	+	+

Биологически активные вещества	Ромашка аптечная	Трехреберник непахучий
3. Полисахариды (слизи)	+	
4. Стероиды	+	
5. Азотсодержащие соединения (холин)	0,07%	
6. Полиацетиленовые соединения	+	+
7. Витамины (витамин С)	+	+
8. Макроэлементы (калий, кальций, магний, железо)	+	
9. Микроэлементы (марганец, медь, цинк, кобальт и др.)	+	
10. Пиретрины		+

на рутин на абсолютно сухое сырье в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 50}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность (раствор В) испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность (раствор Б) СО рутина; а₀ – навеска СО рутина в граммах; а – навеска сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании в %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении валидационных исследований были установлены характеристики разработанной методики: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в образцах сырья составило 4,08±0,042%.

Линейность определяли на пяти уровнях концентрации. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме:

- 1-й уровень: аликвота раствора А 1,0 мл – объем раствора Б 1,0 мл (100%);

- 2-й уровень: аликвота раствора А 1,5 мл – объем раствора Б 1,5 мл (150%);
- 3-й уровень: аликвота раствора А 2,0 мл – объем раствора Б 2,0 мл (200%);
- 4-й уровень: аликвота раствора А 2,5 мл – объем раствора Б 2,5 мл (250%);
- 5-й уровень: аликвота раствора А 3,0 мл – объем раствора Б 3,0 мл (300%).

Критерий приемлемости – коэффициент корреляции составил 1,000 (рис. 1). На осно-

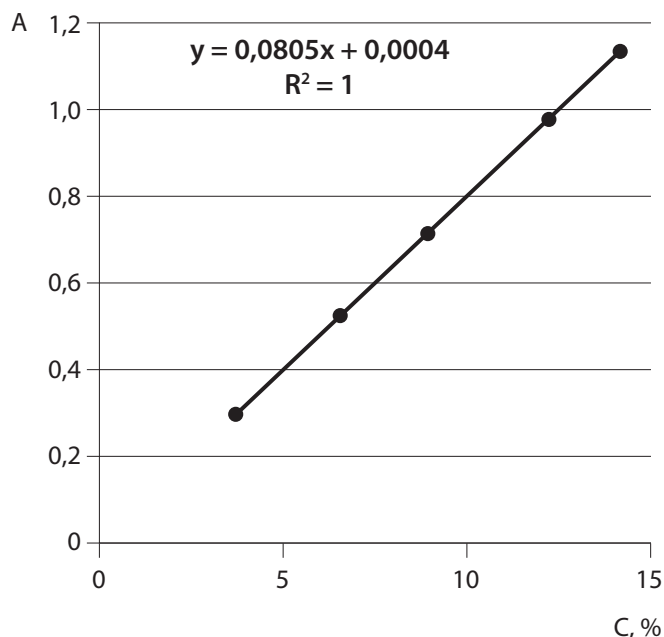


РИС. 1. Линейная зависимость оптической плотности раствора

Таблица 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВТОРЯЕМОСТИ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в трехребернике непахучем цветках, %
1	4,09
2	3,95
3	4,04
4	4,87
5	3,87
6	4,09
7	4,24
8	4,23
9	4,00
10	4,11
Среднее значение	4,15
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,278%

Таблица 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ МЕТОДИКИ

Повторность	Аналитик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в образцах травы якорцев стелющихся, %		
		Удмуртская Республика, с. Шаркан, 2018 г.	Окрестности г. Перми, 2020 г.	Чувашская Республика, п. Ибреси, 2020 г.
1	1	3,82	3,99	4,51
2	1	4,15	3,76	4,44
3	1	3,93	4,15	4,42
4	2	4,15	4,42	4,37
5	2	3,92	3,85	4,58
6	2	3,58	4,15	4,69
Среднее значение		3,93	4,05	4,50
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		0,215%	0,238%	0,118%

вании полученных данных можно утверждать, что соблюдается линейная зависимость между величинами оптической плотности и содержанием суммы флавоноидов в извлечениях из трехреберника непахучего цветков в интервале концентраций 100–300% от номинального значения определяемой величины.

Повторяемость методики определяли в десятикратной повторности, в одной лаборатории в идентичных условиях, с использованием одного и того же оборудования, одним и тем же исследователем, в пределах короткого промежутка времени. Критерий приемлемости выражался величиной относитель-

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЖЛАБОРАТОРНОЙ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ

№ п/п	Место сбора	Повторность	Содержание суммы флавоноидов, %	
			СФ-2000, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники	UV-1800 Shimadzu, РИЦ «Фарматест»
1.	Удмуртская Республика, с. Шаркан, 2018 г.	1	3,82	3,89
		2	4,15	3,98
		3	3,93	4,16
		Среднее значение	3,97	4,01
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,168%	0,137%
2.	Окрестности г. Перми, 2020 г.	1	3,99	3,69
		2	3,76	3,83
		3	4,15	4,35
		Среднее значение	3,97	3,96
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,196%	0,348%
3.	Чувашская Республика, п. Ибреси, 2020 г.	1	4,51	4,73
		2	4,44	4,15
		3	4,42	4,61
		Среднее значение	4,46	4,50
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,047%	0,306%

Таблица 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ

№ п/п	Место сбора	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, мг	Добавлено СО рутин, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %
1.	Удмуртская Республика, с. Шаркан, 2018 г.	38,2	0,05	38,25	38,46	0,55
		41,5	0,1	41,6	41,85	0,60
		39,3	0,15	39,45	39,50	0,13
2.	Окрестности г. Перми, 2020 г.	39,9	0,05	39,95	40,18	0,57
		37,6	0,1	37,7	37,9	0,53
		41,5	0,15	41,65	41,45	0,48
3.	Чувашская Республика, п. Ибреси, 2020 г.	45,1	0,05	45,15	45,38	0,51
		44,4	0,1	44,5	44,67	0,38
		44,2	0,15	44,35	44,77	0,94

ного стандартного отклонения RSD, которое не должно превышать 10% (табл. 2).

Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли два провизора-аналитика кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА. Исследования проводили на трех образцах в трехкратной повторности на спектрофотометре СФ-2000 (табл. 3).

Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трех-

кратной повторности в двух лабораториях (на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА на спектрофотометре СФ-2000 и в лаборатории РИЦ «Фарматест» на спектрофотометре Shimadzu UV-1800). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15% (табл. 4).

Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутри-

Таблица 6

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

n	f	\bar{X}	S ²	S	P, %	t(p,f)	$\Delta\bar{X}$	ϵ	δ , %
5	4	4,6466	0,0052	0,0722	95	2,57	0,0896	0,032	1,93

где n – количество повторностей; f – число степеней свободы (n – 1); \bar{X} – среднее арифметическое; S² – дисперсия; S – стандартное отклонение; P – доверительная вероятность; t(p,f) – критерий Стьюдента (табличное значение); $\Delta\bar{X}$ – ошибка среднего арифметического; ϵ – относительная ошибка результата отдельного определения; δ – относительная величина систематической ошибки

лабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору непосредственно в извлечение из трехреберника непахучего цветков (табл. 5).

Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 1,93% (табл. 6).

ВЫВОДЫ

Разработанная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в *Tripleurospermum inodorum flores* валидна, не требует дорогостоящих реактивов, является точной, воспроизводимой и доступной.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ФС.2.5.0037.15 Ромашки аптечной цветки [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издания. Режим доступа: resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/1211/index.html
2. Государственный реестр лекарственных средств. Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>
3. Плантариум: открытый онлайн-атлас и определитель растений. Режим доступа: <https://www.plantarium.ru>
4. Велиханова З.Р. Содержание биологически активных веществ в цветках трехреберника продырявленного / З.Р. Велиханова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Фармация, 2017; т. 66(8). – С. 9–12.
5. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 5. Семейство Asteraceae (Compositae). Часть 2. Роды *Echinops* – *Youngia* / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – С. 132–133.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. [Электронное издание] Режим доступа: http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=zz
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. ОФС.1.2.1.1.0003.15. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях. [Электронное издание] Режим доступа: http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/752/index.html#zoom=z.
8. Блинова О.Л. и др. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в трехребернике непахучем цветках / О.Л. Блинова, А.А. Гилева, А.В. Хлебников, В.Д. Белоногова, А.Ю. Турышев // Медико-фармацевтический журнал «Пульс» – 2021. – Т. 23, №6. – С. 48–50. [Электронное издание] Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2021-23-6> 2021.

VALIDATION OF THE TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE SUM OF FLAVONOIDS IN THE TRIPLEUROSPERMUM INODORUM FLORES

O.L. Blinova, A.A. Gileva, V.D. Belonogova

Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russia, Perm, Russia

The paper presents the validation of the method for the quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of rutin in Tripleurospermum inodorum flores by the spectrophotometric method of analysis. The validation characteristics were established: linearity, precision (repeatability, reproducibility) and correctness. The content of flavonoids in terms of rutin in the samples of raw materials was $4.08 \pm 0.042\%$. The developed technique is valid, accurate, reproducible and accessible.

Keywords: validation, methods, *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Bip., medicinal plant materials, flavonoids, spectrophotometry