

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ИКОТНИКА СЕРОГО

© Дроздова И.Л., Лупилина Т.И.

Кафедра фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: [irina-drozdova@yandex.ru](mailto:irina-drozdova@yandex.ru)

Флавоноиды обладают широким спектром биологической активности. Перспективным доступным отечественным сырьевым источником флавоноидов может стать икотник серый *Berteroa incana* (L.) DC. семейства Крестоцветные (Brassicaceae). Возможность использования нового вида сырья в научной медицине делает необходимым разработку методики количественного определения флавоноидов травы икотника серого спектрофотометрическим методом и проведение валидации методики по параметрам: повторяемость, воспроизводимость, линейность, правильность. Установлено, что все исследуемые валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости. Предложены нормы содержания флавоноидов для исследуемого сырья.

**Ключевые слова:** икотник серый, *Berteroa incana* (L.) DC., флавоноиды, методика количественного определения, лютеолин, валидация.

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN BERTEROA INCANA HERB

*Drozdova I.L., Lupilina T.I.*

**Department of Pharmacognosy and Botany of Kursk State Medical University, Kursk**

Flavonoids have a broad spectrum of pharmacological activity. The perspective and available domestic raw material source of flavonoids may be *Berteroa incana* (L.) DC. of Brassicaceae family. The ability to use a new type of raw material in scientific medicine makes it necessary to develop a method of quantitative determination of *Berteroa incana* flavonoids by spectrophotometry. The validation of the developed technique was carried out according to the parameters of repeatability, reproducibility, linearity, and accuracy. Statistical calculations proved the validation parameters to be within the boundaries of acceptance criteria. Norms of contents of flavonoids were proposed.

**Keywords:** *Berteroa incana* (L.) DC, flavonoids, method of quantitative determination, luteolin, validation.

Флавоноидные соединения обладают широким спектром биологической активности, обусловленной прежде всего их высокой антирадикальной активностью, благодаря чему в различных органах и тканях происходит нормализация патохимических процессов [10]. За последние 15-20 лет число фармакопейных видов лекарственного сырья, отнесенных к флавоноидам, увеличилось с 11 до 30 наименований [12]. В условиях импортозамещения перспективным доступным отечественным сырьевым источником природных флавоноидов могут стать представители рода Икотник (*Berteroa* DC.) семейства Крестоцветные (Brassicaceae V. Juss.), которые издавна используются в народной медицине [11]. На территории центральных областей России из представителей данного рода произрастает только икотник серый (*Berteroa incana* (L.) DC.) – двулетнее травянистое растение, имеющее достаточную сырьевую базу [11, 14].

В настоящее время икотник серый используется только в народной медицине при различных заболеваниях (икоте, заболеваниях пищеварительной, нервной и костно-мышечной систем, при травмах, растяжении связок, женских

и инфекционных болезнях, при недомогании и утомляемости для общего укрепления организма, а также наружно для промывания ран) [14]. При проведении скрининговых фармакологических исследований нами установлена антиоксидантная, диуретическая, антимикробная, противовоспалительная активность травы икотника серого [3, 4, 6, 7]. Проведенные нами ранее фитохимические исследования показали, что трава икотника серого содержит различные группы БАВ, в т.ч. фенольные соединения (в первую очередь флавоноиды, а также фенолокислоты, кумарины, дубильные вещества) [8], которые во многом обеспечивают фармакологические свойства растения.

Возможность использования травы икотника серого в научной медицине, а также современные требования к стандартизации лекарственного растительного сырья вызывают необходимость количественной оценки содержания биологически активных веществ.

Цель нашего исследования – разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в траве икотника серого.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа сырья травы икотника серого нами впервые разработана методика определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии непосредственно в извлечении из лекарственного сырья. В основе данной методики лежит реакция образования комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом в среде спирта этилового 70% в сочетании с дифференциальным спектрофотометрическим методом определения оптической плотности полученных комплексов [2]. Данная методика отличается экспрессностью, простотой в исполнении, хорошей воспроизводимостью, использованием оборудования, доступного для любой контролирующей лаборатории, и рекомендуется ГФ-ХІ для анализа лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды [5]. Определение оптимальных условий экстракции флавоноидов из травы икотника серого проводили на одном образце сырья.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами проведены исследования по изучению оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов из лекарственного сырья, а также выбор оптимальных условий проведения реакции комплексообразования с алюминия хлоридом и разработка методики количественного определения флавоноидов.

Для выбора оптимальных условий извлечения суммы флавоноидов исследовали влияние степени измельчения сырья, типа экстрагента и времени экстракции.

Результаты изучения влияния степени измельчения на экстракцию флавоноидов показали, что максимальное извлечение наблюдается при степени измельчения сырья икотника серого до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, что согласуется с литературными данными [5]. В качестве растворителя для экстрагирования суммы флавоноидов из лекарственного растительного сырья применяются спирты и спирто-водные растворы [5]. При выборе оптимальной концентрации спирта этилового установлено, что максимальный выход суммы флавоноидов обеспечивается при использовании спирта этилового 70%. Извлечение суммы

флавоноидов из травы икотника серого проводили путем экстракции сырья с нагреванием на кипящей водяной бане до наступления равновесия [13]. Было установлено, что максимальный выход флавоноидов из травы икотника серого (при экстракции сырья кипящим спиртом этиловым 70% и соотношении сырье - экстрагент 1:100) наблюдается через 60 минут с последующим наступлением равновесия. При разработке методики определения суммы флавоноидов в траве икотника серого мы использовали реакцию образования комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом с использованием спирта этилового 70%. Установлено, что в составе суммы флавоноидов травы икотника серого содержатся производные лютеолина, апигенина, кверцетина, дигидрокверцетина, нарингенина, одним из преобладающих является лютеолин. Полученные экспериментальные данные показали, что максимум поглощения спирто-водного извлечения из травы икотника серого с алюминия хлоридом находится при 400 нм и совпадает с максимумом поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом. Поэтому в качестве стандартного образца нами применен лютеолин-стандарт.

Для расчета суммы флавоноидов мы использовали удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом, который равен 549,41 [9]. Раствором сравнения являлось исходное извлечение травы икотника серого без добавления алюминия хлорида (т.е. применен дифференциальный вариант спектрофотометрии, позволяющий исключить влияние сопутствующих веществ, имеющих оптическую плотность, близкую к области максимума поглощения суммы флавоноидов исследуемого сырья). Для лучшей воспроизводимости результатов к пробам добавляли кислоту уксусную с целью перевода в недиссоциированную форму флавоноидов и других БАВ, являющихся сопутствующими в сырье [9]. Результаты показали, что устойчивое окрашивание извлечения из травы икотника серого с алюминия хлоридом развивается через 45 минут после добавления реактива и сохраняется в течение 1,5 часов. Результаты представлены в таблице 1.

На основании проведенных исследований впервые разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве икотника серого (таблица 2).

Таблица 1

Определение оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов из травы икотника серого методом спектрофотометрии и проведения реакции комплексообразования

Показатель	Значение показателя	Содержание суммы флавоноидов (абсолютно сухое сырье), %
Степень измельчения сырья, мм	0,5	0,96
	1,0	1,17
	2,0	1,26
	3,0	0,72
Концентрация спирта этилового (растворитель), %	30	0,88
	50	0,90
	70	1,26
	96	0,41
Время экстрагирования, мин	30	0,96
	45	1,14
	60	1,27
	75	1,27
Время устойчивости окраски извлечений с алюминия хлоридом, мин	30	1,04
	45	1,27
	60	1,26
	90	1,26

Таблица 2

Оптимальные условия количественного определения суммы флавоноидов в траве икотника серого методом спектрофотометрии

Наименование параметра (условий)		Величина показателя
Степень измельчения сырья, мм		2
Условия экстракции	Концентрация спирта этилового, %	70
	Время, мин	60
Параметры спектрофотометрирования	Количество извлечения, мл	3,0
	Концентрация спирта этилового, %	70
	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	400
	Время образования комплексов с $\text{AlCl}_3$ , мин	45
Стандартное вещество		Лютеолин
Содержание суммы флавоноидов, %		от $1,04 \pm 0,01$ до $1,31 \pm 0,01$

*Методика количественного определения суммы флавоноидов*

Около 1,0 г (точная навеска) сырья травы икотника серого, измельченного и просеянного через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл спирта этилового 70% и взвешивают. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

3,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл раствора

алюминия хлорида 5% в спирте этиловом 70% и через 10 минут 2 капли кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводят до метки спиртом этиловым 70% и оставляют на 45 минут (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3,0 мл исходного извлечения, 2 капель разведенной уксусной кислоты и доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{D \times 25 \times 100 \times 100}{549,41 \times m \times 3 \times (100 - W)}; \text{ где}$$

$D$  – оптическая плотность исследуемого раствора;

549,41 – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при 400 нм;

$m$  – масса сырья в граммах;

$W$  – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Второй этап наших исследований был посвящен валидации разработанной методики. Валидация количественного определения суммы флавоноидов в траве икотника серого проводилась по показателям повторяемости, воспроизводимости, линейности и правильности [1, 15, 16].

Повторяемость методики определяли на одном образце сырья в 6 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 4%. В нашем случае оно составило 1,66%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (таблица 3).

Воспроизводимость определяли 2 химика-аналитика на 3 образцах в 3 повторностях [15]. Относительное стандартное отклонение составило не более 3,10%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости (таблица 4).

Таблица 3

Результаты определения повторяемости методики

№ опыта	Содержание суммы флавоноидов, %
1	1,20
2	1,20
3	1,21
4	1,21
5	1,20
6	1,21
Относительное стандартное отклонение, %	1,66

Таблица 4

Результаты определения воспроизводимости методики

Химик-аналитик	№ образца	Повторность	Сумма флавоноидов, %	Относительное стандартное отклонение, %
1 химик	1	1	1,10	3,10
		2	1,10	
		3	1,12	
2 химик	1	1	1,13	
		2	1,10	
		3	1,10	
1 химик	2	1	1,20	1,66
		2	1,21	
		3	1,20	
2 химик	2	1	1,21	
		2	1,20	
		3	1,21	
1 химик	3	1	1,33	2,48
		2	1,30	
		3	1,30	
2 химик	3	1	1,31	
		2	1,32	
		3	1,30	

Результаты исследования методики по показателю линейность

Навеска сырья, %	Навеска сырья, г	Оптическая плотность раствора	Содержание суммы флавоноидов, %
70	0,7017	0,3582	0,89
80	0,8025	0,4744	1,03
90	0,9016	0,5895	1,14
100	1,0021	0,7293	1,27
110	1,1019	0,8848	1,40
120	1,2013	0,9574	1,52
Коэффициент корреляции			0,9971

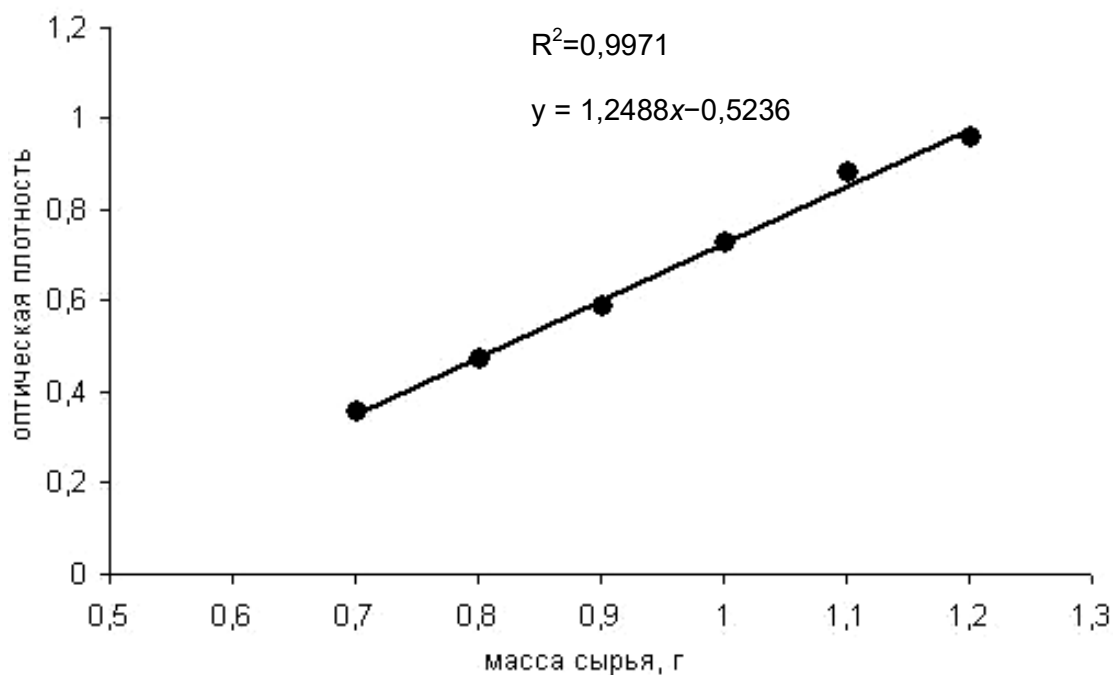


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от массы навески сырья при спектрофотометрическом определении суммы флавоноидов травы икотника серого

Линейность устанавливается на основании измерения в 6 экспериментальных точках. Определение линейности проводили на 6 уровнях концентраций от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин сырья икотника серого. Растворы готовили путем уменьшения и увеличения навески для получения концентрации 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% (таблица 5, рисунок 1). Мерой линейности служит коэффициент корреляции. Если величина данного коэффициента близка к единице, то совокупность полученных данных можно описать прямой линией. Нижний допустимый предел этой величины 0,98. Вычисление коэффициента корреляции проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010 [9, 10, 17].

Из рис. 1 видно, что практически все экспериментальные точки лежат на одной прямой линии. Значение коэффициента корреляции равно

0,9971 и лежит в пределах  $0,98 \leq R^2 \leq 1,0$ , поэтому линейная зависимость наблюдается в области массы навески сырья от 0,7 г до 1,2 г. Полученная зависимость аппроксимируется уравнением прямой  $y = 1,2488x - 0,5236$ .

Правильность методики устанавливали определением количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в растворах, полученных с помощью добавления 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл стандартного раствора лютеолина к исследуемому раствору. Критерием приемлемости является средний процент восстановления при использовании растворов концентраций, скорректированный на 100%. Средняя величина данного показателя должна находиться в пределах  $100 \pm 3\%$ . Мы проводили 9 измерений оптической плотности на 3 уровнях концентраций (таблица 6).

Таблица 6

## Результаты определения правильности методики

Содержание в исходном растворе, мг	Добавлено РСО лютеолина, мг	Расчетное содержание, мг	Полученное содержание, мг	Открываемость, %	Статистическая обработка результатов
12,70	1,25	13,95	13,79	98,85	$\bar{X},\% = 100,72$ $S^2 = 1,1448$ $S = 1,069953$ $\Delta X = 2,47159$ $\varepsilon, \% = 2,45$
12,70	1,25	13,95	13,92	99,78	
12,70	1,25	13,95	14,14	101,36	
12,70	2,50	15,20	15,52	102,10	
12,70	2,50	15,20	15,39	101,25	
12,70	2,50	15,20	15,17	99,80	
12,70	3,75	16,45	16,82	102,25	
12,70	3,75	16,45	16,69	101,46	
12,70	3,75	16,45	16,39	99,63	
Средний процент восстановления, %				100,72	

Таблица 7

## Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов

№ партии, место и время сбора сырья	n	$\bar{X}$	$S^2$	$S_{\bar{x}}$	P, %	t(P <sub>f</sub> )	$\Delta\bar{X}$	$E_{отн}$
1. окр. г. Курска, 2012 г.	5	1,04	0,0001	0,0045	95	2,78	0,01	2,67%
2. окр. г. Курчатова, 2012 г.	5	1,06	0,0001	0,0045	95	2,78	0,01	2,62%
3. окр. г. Льгова, 2012 г.	5	1,10	0,0001	0,0045	95	2,78	0,01	2,53%
4. окр. г. Курска, 2013 г.	5	1,31	0,0001	0,0045	95	2,78	0,01	2,12%
5. окр. г. Льгова, 2013 г.	5	1,15	0,0001	0,0050	95	2,78	0,01	2,70%

Из таблицы 6 видно, что процент восстановления находится в пределах 98,85-102,25%; средняя величина данного показателя составляет 100,72%, а относительное стандартное отклонение не превышает 3%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

В ходе исследований установлено, что разработанная методика доступна любой контролирующей лаборатории, хорошо воспроизводима, занимает минимум рабочего времени, не требует для проведения дорогостоящих реактивов и оборудования, позволяет объективно оценить качество лекарственного растительного сырья – травы икотника серого.

По данной методике проанализировано 5 партий травы икотника серого, заготовленной в различных районах Курской области в разные годы. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Из таблицы 7 видно, что количественное содержание суммы флавоноидов в траве икотника серого колеблется от 1,04% до 1,31%. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не более 2,70%. В связи с этим предлагаем установить показатель содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в траве икотника серого не менее 1,0%.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Впервые для стандартизации сырья разработана методика количественного определения флавоноидов травы икотника серого методом спектрофотометрии. Установлено, что содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в траве икотника серого колеблется от 1,04% до 1,31%.

2. Проведена валидация разработанной методики по параметрам: повторяемость, воспроизводимость, линейность, правильность. Исследования по валидации показали, что разработанная методика соответствует критериям приемлемости и может быть использована для аналитических целей.

3. Анализ 5 партий сырья, заготовленного в различных районах Курской области в разные годы, позволил рекомендовать установить норму содержания флавоноидов в пересчете на лютеолин в сырье исследуемого растения – не менее 1,0%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8-12.
2. Бубенчикова В.Н., Дроздова И.Л. Разработка показателей качества листьев земляники лесной // Фармация. – 2002. – № 6. – С. 16-18.

3. *Гладченко М.П., Артюшкова Е.Б., Дроздова И.Л., Лупилина Т.И.* Изучение диуретической активности травы икотника серого // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – Режим доступа: [www.science-education.ru/118-13985](http://www.science-education.ru/118-13985), свободный (11.11.2015).
4. *Гладченко М.П., Артюшкова Е.Б., Дроздова И.Л., Лупилина Т.И.* Сравнительное изучение действия настоя и водорастворимых полисахаридов травы икотника серого на различные стадии воспаления // Ученые зап. Орлов. гос. ун-та (серия «Естественные, технические и медицинские науки»). – 2014. – № 7 (63). – С. 191-192.
5. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.
6. *Дроздова И.Л., Печенин О.Д., Лупилина Т.И.* Изучение антимикробных свойств пектиновых веществ и настоя из травы икотника серого - *Berteroa incana* (L.) DC. // Традиционная медицина. – 2014. – № 3(38). – С. 15-17.
7. *Дроздова И.Л., Григорьева Т.М., Лупилина Т.И.* Изучение антиоксидантной активности травы икотника серого методами ТСХ и хемилюминесценции // Ученые зап. Орлов. гос. ун-та (серия «Естественные, технические и медицинские науки»). – 2013. – № 6. – С. 210-213.
8. *Дроздова И.Л., Лупилина Т.И.* Изучение состава фенольных соединений травы икотника серого методом ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т. 13. – № 6. – С. 891-895.
9. *Евдокимова О.В.* Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки // Традиционная медицина. – 2011. – № 1 (24). – С. 50–54.
10. *Евсеева О.С., Андреева О.А., Оганесян Э.Т.* Разработка и валидация флавоноидов в некоторых видах рода *Citrus* // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. – 2013. – № 25 (168), вып. 21/1. – С. 55-60.
11. *Киселева К.В., Майоров С.Р., Новиков В.С.* Флора средней полосы России : Атлас-определитель / под ред. проф. В.С. Новикова. – М. : Фитон+, 2010. – 544 с.
12. *Куркина А.В.* Флавоноиды фармакопейных растений : монография. – Самара : Офорт; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
13. *Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В.* Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия раст. сырья. – 2004. – № 1. – С. 47-52.
14. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.2. Семейства Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae. / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М. : Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 513 с.
15. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, М.И. Харченко, А.Б. Белова, И.Е. Шохина, Е.А. Дориной. – М. : Изд-во Перо, 2014. – 656 с.
16. Руководство ICH «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1) // Фармация. – 2008. – №4. – С. 3-8.
17. *Степанова Э.Ф., Якусевич Р.В., Дайронас Ж.В.* Разработка методики количественного определения флавоноидов в сиропе пижмы // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 183-186.