

# РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ПАСТУШЬЕЙ СУМКИ

О.В. Евдокимова

ГОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (г. Москва)

## Development and validation the method's of quanti-tative determination of flavonoids' sum in *Capsella bursa – pastoris* (L.) Medik. Materials

O.V. Evdokimova

I.M. Sechenov First MSU (Moscow)

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время в НД на траву пастушьей сумки отсутствует методика количественного определения биологически активных веществ. В статье представлены исследования по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки методом дифференциальной спектрофотометрии. Также была проведена валидация предложенной методики. Установлены критерии приемлемости разработанной методики. Предложена норма содержания биологически активных веществ в сырье пастушьей сумки. Полученные результаты включены в ФСП ОАО «Красногорсклексредства» Пастушьей сумки трава.

**Ключевые слова:** пастушья сумка, флавоноиды, количественное определение.

### RESUME

Nowadays there isn't any method for quantitative definition of biologically active substances in the normative documentation for *Capsella bursa – pastoris* (L.) Medik. materials. As the requirements for the crude drugs' standardization increase steadily it is necessary to make a quantitative assessment of biologically active substances. This study's aim was to work out a method for *Capsella bursa–pastoris* (L.) Medik. materials crude quantitative assessment and its subsequent validation. The research team devised a method for *Capsella bursa–pastoris* materials active substances' quantitative determination. Application criteria for the accuracy, repeatability, reproducibility and linearity method were also determined. This method for *Capsella bursa–pastoris* materials active substances' quantitative determination was to the validation of compendial method. A norm of biologically active substances' content in nettle leaves was proposed. The results of the study were included in the normative documentation for "Krasnogorskleksredstva" House monography.

**Keywords:** *Capsella bursa–pastoris*, flavonoids, quantitative determination.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, согласно НД на траву пастушьей сумки, качество сырья определяется по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 70 % этанолом. Всевозрастающие требования к стандартизации лекарственного растительного сырья вызывают необходимость количественной оценки содержания биологически активных веществ.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о наличии в сырье пастушьей сумки флавоноидных соединений, – это и гликозиды кверцетина, лютеолина, диосме-

тина [1]; а также рутин, лютеолин, диосмин, кверцетин, гесперидин, 7-рутинозид лютеолина, 7-глюкогалактозид лютеолина [2, 3].

Содержание флавоноидов во многом и обеспечивает фармакологическую активность препаратов травы пастушьей сумки. Так, показано, что сумма флавоноидов травы пастушьей сумки влияет на проницаемость стенок кровеносных сосудов [4]. Гемостатический эффект вызван различными фракциями из травы и растения в целом [5, 6].

Установлено, что экстракты из травы пастушьей сумки понижают артериальное дав-

ление, усиливают моторику кишечника и матки, ускоряют свертывание крови [1], настой и жидкий экстракт в гинекологической практике применяется при атонии матки и как гемостатическое [7]. Препараты пастушьей сумки оказывают и вяжущее и противогинговое действие, при заболевании мочеточников и малярии. Флавоноиды пастушьей сумки обладают антимикробным действием [8].

В связи с вышесказанным, представляется целесообразным проводить стандартизацию травы пастушьей сумки по сумме флавоноидов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследований проведен анализ спектров спиртовых извлечений и спиртовых извлечений после кислотного гидролиза из травы пастушьей сумки (1:50). Показано, что по положению максимумов поглощения флавоноидов из-за наложения более интенсивных полос поглощения сопутствующих веществ вести определение методом прямой спектрофотометрии нецелесообразно.

При использовании спектрофотометрического метода, основанного на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, происходит bathochromный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 до 390–410 нм. При добавлении спиртового раствора хлорида алюминия в спектре извлечений появлялся максимум поглощения при 400 нм, который совпал с максимумом поглощения спектра лютеолина с хлоридом алюминия и это позволяет проводить анализ при данной длине волны. Применение раствора исследуемого извлечения без добавления к нему реактива позволяет исключить влияние окрашенных сопутствующих веществ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных результатов (табл. 1 и 2) подобраны оптимальные условия и предложена методика определения суммы флавоноидов с использованием в качестве стандартного образца лютеолина.

Методика: Аналитическую пробу пастушьей сумки травы измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 2 мм. Около 1,25 г (точная навеска) измельченной травы помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70 %, содержащего 1 % кислоты хлористоводородной концентрированной, колбу взвешивают с погрешностью

Таблица 1

#### Результаты определения влияния условий экстракции на выход флавоноидов из травы пастушьей сумки

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, %
Размер частиц сырья, мм	
5–7	0,13
1–2	0,66
Концентрация этанола с 1% HCl, %	
50	0,60
60	0,65
70	0,66
80	0,64
95	0,55
Соотношение сырья и экстрагента	
1:20	0,61
1:30	0,66
1:40	0,66
1:50	0,66
Время экстракции, мин	
60	0,61
90	0,60
120	0,66
150	0,60

Таблица 2

#### Определение условий реакции лютеолин с хлоридом алюминия

Условия реакции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин
Количество 2%-ного спиртового раствора хлорида алюминия, мл	
1	0,25
2	0,35
3	0,47
4	0,66
5	0,66
Время реакции, мин	
10	0,32
20	0,54
30	0,66
40	0,66
50	0,66

$\pm 0,01$  г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают, при необходимости доводят ее содержимое до первоначальной массы спиртом этиловым 95 %.

Содержимое колбы фильтруют через воронку диаметром 7 см с вложенным ватным тампоном толщиной не более 0,5 см, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

Таблица 3

## Результаты опыта линейности методики

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения (около)	Концентрация стандартного вещества (лютеолин), мкг/мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)
1	50	2,40	0,232
2	75	3,60	0,319
3	100	4,80	0,401
4	125	6,00	0,459
5	150	7,20	0,534

Таблица 4

## Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в сырье пастушьей сумки

Повторность	Найденное значение, %
1	0,372
2	0,384
3	0,379
4	0,369
5	0,383
6	0,397
Среднее значение	0,381
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	2,62

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл 2 %-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки (испытываемый раствор). Через 40 мин. измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного спиртом этиловым 95 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = D \times 25 \times 50 \times 100 / 549,41 \times m \times 2 \times (100 - W),$$

где D – оптическая плотность раствора; 549,41 – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм [9]; m – 1 масса сырья, г; W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Второй этап наших исследований был посвящен валидации разработанной ме-

тодики. Валидация методики проводилась по линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности методики [10–12].

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолина в сырье пастушьей сумки. Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в растворах, имеющих концентрацию 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции, и если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,995. Коэффициент корреляции составил 0,9976 (табл. 3).

Повторяемость методики определяли на одном образце сырья в 6 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10 %. Он составил 2,62 % (табл. 4), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики проводили на 3-х образцах в трех повторностях (выполняли 2 инженера-химика) (табл. 5). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно было превышать 15%. Он составил 5,18%, что указывает на прецизионности методики в условиях воспроизводимости.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин

Таблица 5

## Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в сырье пастушьей сумки

Повторность	Аналитик	Образец 1, найдено, %	Образец 2, найдено, %	Образец 3, найдено, %
1	1	0,39	0,28	0,31
2	1	0,43	0,30	0,36
3	1	0,39	0,31	0,35
4	2	0,40	0,25	0,31
5	2	0,39	0,27	0,33
6	2	0,40	0,28	0,32
Среднее значение		0,40	0,28	0,31
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		3,87	7,63	6,36

## Результаты опытов с добавками

№.№ п/п	Найдено, г	Добавлено СО лютеолина, г	Ожидаемое значение, г	Полученное значение, г	Выход, %
1	0,5717	0,1450	0,7167	0,7209	100,59
2	0,5717	0,1450	0,7167	0,7155	99,83
3	0,5717	0,1450	0,7167	0,7223	100,78
4	0,5717	0,2900	0,8617	0,8754	100,43
5	0,5717	0,2900	0,8617	0,8769	101,76
6	0,5717	0,2900	0,8617	0,8739	101,42
7	0,5717	0,3866	0,9583	0,9600	100,18
8	0,5717	0,3866	0,9583	0,9805	102,32
9	0,5717	0,3866	0,9583	0,9711	101,34
10	0,5717	0,5799	1,1516	1,1598	100,71
11	0,5717	0,5799	1,1516	1,1683	101,45
12	0,5717	0,5799	1,1516	1,1491	99,78
<b>Среднее значение выхода, %: 100,88</b>					

в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору для концентраций 125 %, 151 %, 168 %, 201 %. Критерием приемлемости являлся средний % восстановления при использовании растворов концентраций 125 %, 151 %, 168 %, 201 %, скорректированный на 100 % и его средняя величина должна находиться в следующих пределах ( $100 \pm 5$ ) %. Показано, что % восстановления находился в пределах от 99,78 до 102,32 %, и его средняя величина составила 100,88 % (табл. 6).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований установлено, что методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоящих реактивов. Она позволяет объективно оценивать качество лекарственного растительного сырья пастушьей сумки. Анализ промышленных партий сырья показал содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, предлагаемой методикой колеблется от 0,28 до 0,66 %, что позволяет предложить норму содержания действующих веществ не менее 0,20 %.

Полученные результаты включены в ФСП 9245-08 ОАО «Красногорсклексредства».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Фурса Н.С., Литвиненко В.И., Аветисян В.Е. Природные соединения семейства Brassicaceae как возможные хемотаксономические признаки. Сообщение №1. Флавоноиды. Растит. ресурсы. 1986; 22(1): 113
2. Корепанова Н.С., Олешко Г.И. Исследования по стандартизации и содержанию флавоноидов в траве

пастушьей сумки. Современные проблемы фармацевтической науки и практики. Научные труды НИИФ. 1999; XXXVIII: 229–233.

3. Юриссон С.М. Флавоноидные вещества пастушьей сумки – *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. Фармация. 1973; 22 (5): 34–35.

4. Юриссон С.М. Кумарины пастушьей сумки. Ученые записки Тартурского ун-та. 1980; 523: 41–42.

5. Kartning T. Modern methods in plan analysis. Int. pharm. J. 1989; 3 (10): 13.

6. Kuroda K., Takagi K. Physiologically active substance in *Capsella bursa-pastoris*. Nature. 1968; 220(168): 707–708.

7. Лекарственные препараты, разрешенные к применению в СССР. – М.: Медицина, 1979.

8. El-Abyad M.S., Morsi N.M., Zaki D.A., Shaaban M.T. Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity. Microbios. 1990.; 62(250): 47–57.

9. ГОСТ 21908-93 Травя душицы.

10. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. – М.: Госстандарт, 2002.

11. Мешковский А.П. Валидация аналитических методов. Сборник «Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий». – М., 2002. – С. 26–30.

12. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве: Береговых В.В. (ред.). – М.: «Издательский дом «Русский врач», 2005. – С. 73–97.

## Адрес автора

К.фарм.н Евдокимова О.В.

Доцент кафедры фармации ГОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова  
oeverdokimova@umail.ru