



УДК 633.88:582.949.2:630*811.1

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ЧАБРЕЦА

В.Н. БУБЕНЧИКОВА¹
Ю.А. СТАРЧАК²

¹*Курский государственный
медицинский университет*

²*Орловский государственный
университет*

e-mail:fg.ksmu@mail.ru

При использовании современных требований к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, разработана спектрофотометрическая методика определения количественного содержания суммы флавоноидов в траве чабреца в пересчете на цинарозид. Данная методика валидирована по показателям линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности.

Ключевые слова: чабрец ползучий, стандартизация, метод спектрофотометрии, валидация метода.

Введение. Трава чабреца является официальным лекарственным сырьем, включенным в ГФ XI издания, используемая в качестве отхаркивающего средства.

Однако фармакопейная статья на траву чабреца не отвечает современным требованиям. Согласно данной ФС, качество сырья травы чабреца определяется по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 70% [2]. Возрастающие требования к стандартизации лекарственного растительного сырья вызывают необходимость количественной оценки содержания действующих веществ.

Литературные данные и наши исследования свидетельствуют о наличии в растениях рода тимьян наряду с эфирным маслом флавоноидных соединений. Флавоноиды представлены как агликонами: лютеолином и апигенином, так и их гликозидами: цинарозидом, космоссином [4]. Поэтому нами предпринята попытка проводить стандартизацию сырья чабреца по содержанию флавоноидов.

Целью работы являлось проведение валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца.

Материалы и методы. Объектом исследования явилась трава чабреца, заготовленная в 2010–2011 гг. в Ботаническом саду КГМУ.

На 1-м этапе нами проведены исследования по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов.

При разработке методики нами использован спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, при котором происходит bathochromный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 нм до 390–410 нм. В нашем случае при добавлении к спирто-водным извлечениям из травы чабреца, раствора алюминия хлорида в спектре полученных растворов появлялся максимум поглощения при 395 нм, который совпадал с максимумом поглощения цинарозида с алюминия хлоридом, что позволило проводить анализ при данной длине волны. Применение в качестве контроля исследуемого извлечения без алюминия хлорида позволило исключить влияние окрашенных сопутствующих веществ, а следовательно, исключить стадию очистки извлечений от экстрактивных веществ. Для получения более воспроизводимых результатов, реакцию комплексообразования вели в кислой среде.

В ходе исследований были подобраны оптимальные условия экстракции: степень измельчения сырья – 2 мм, экстрагент 70% спирт этиловый, соотношение сырья – экстрагент 1:100, нагревание в течение 60 минут.

На основании проведенных исследований предложена методика количественного определения суммы флавоноидов с использованием в качестве стандартного образца цинарозида.

Методика количественного определения флавоноидов: Около 1,0 г (точная навеска) измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 70% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).



Раствор сравнения. К 2,5 мл раствора А, добавляют 1 мл раствора кислоты уксусной 3% и доводят спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. 2,5 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл раствора алюминия хлорида 5% спирте этиловом 70% и через 10 мин 1 мл раствора кислоты уксусной 3%. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки. Через 30 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 395 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя раствор сравнения.

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

$$X = \frac{D \times 100 \times 100 \times 100}{345 \times m \times 4 \times V \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

345 – удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в 96% спирте этиловом;

m – навеска сырья в граммах;

V – количество извлечения, в миллилитрах;

W – влажность сырья, в процентах.

Результаты и их обсуждение. Валидация методики проводилась по параметрам линейности, повторяемости воспроизводимости и правильности методики [1-3].

Определение линейности проводили на 6 уровнях концентраций. Вначале был приготовлен исходный раствор СО цинарозида (ТУ 2638-014-80884467-10) с концентрацией 0,05%. Затем из него готовили разбавленные растворы, для этого в мерные колбы вместимостью 25 мл помещали по 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 полученного раствора цинарозида, прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, перемешивали и доводили объем тем же раствором до метки и снова перемешивали. Через 30 мин. измеряли оптическую плотность раствора на СФ-2000 при длине волны 395 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм в сравнении с контрольным опытом.

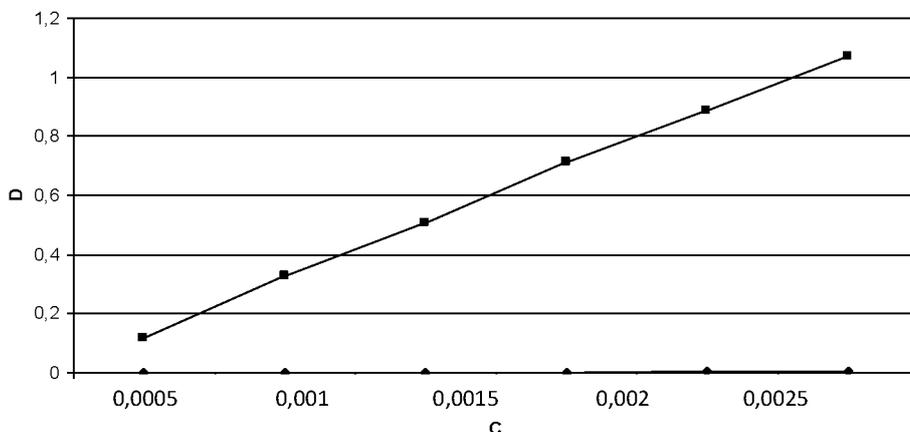


Рис. Зависимость оптической плотности раствора от концентрации цинарозида

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. По полученным экспериментальным данным рассчитывали коэффициент корреляции, который должен быть не ниже 0,99. В нашем случае коэффициент корреляции составил 0,999 (рис., табл. 1).

Таблица 1

Результаты статистической обработки данных, полученных при изучении линейной зависимости вида $y=vx+a$

| F | \bar{x} | \bar{y} | v | a | R |
|---|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| 4 | 0,00175 | 0,603017 | 378,7029 | -0,05971 | 0,999614 |

Повторяемость методики определяли на том же образце сырья в 6 повторностях (табл. 2). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое



не должно превышать 10 %. Он составил 4,43%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 2

Определение повторяемости разработанной методики

| № п/п | Содержание суммы флавоноидов, % | Метрологические характеристики |
|-------|---------------------------------|---|
| 1 | 1,34 | Хср.=1,35 S _x ² =0,000590 S _x =0,024290 Δх=0,06 Еотн=4,43% Хср.=1,35±0,06 |
| 2 | 1,39 | |
| 3 | 1,38 | |
| 4 | 1,35 | |
| 5 | 1,33 | |
| 6 | 1,34 | |

Определение воспроизводимости методики выполняли 2 инженера-химика. Исследование проводили на 3 образцах в 3 повторностях (табл. 3).

Таблица 3

Определение воспроизводимости методики

| Повторность | Аналитик | Содержание суммы флавоноидов в перерасчете на лютеолин в сырье травы чабреца, % | | |
|---|----------|---|-----------|-----------|
| | | Образец 1 | Образец 2 | Образец 3 |
| 1 | 1 | 1,37 | 0,98 | 1,39 |
| 2 | 1 | 1,34 | 0,96 | 1,45 |
| 3 | 1 | 1,31 | 0,97 | 1,41 |
| 4 | 2 | 1,33 | 0,99 | 1,44 |
| 5 | 2 | 1,35 | 0,96 | 1,42 |
| 6 | 2 | 1,36 | 0,98 | 1,41 |
| Среднее значение | | 1,34 | 0,97 | 1,42 |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | | 4,20 | 3,35 | 3,97 |

Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15%. Он составил 4,20%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в перерасчете на цинарозид в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандартного вещества к исследуемому раствору. Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 100%±5%. В разработанной методике процент восстановления находился в пределах от 96,6% до 102,4%. (табл.4).

Таблица 4

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

| Содержание суммы флавоноидов, мг | Добавлено РСО цинарозида, мг | Вычислено с добавкой, мг | Получено содержание, мг | Относительная ошибка, % |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,34 | - | 0,34 | 0,34 | - |
| 0,34 | 0,25 | 0,59 | 0,57 | 96,6% |
| 0,34 | 0,50 | 0,84 | 0,86 | 102,4% |
| 0,34 | 0,75 | 1,09 | 1,11 | 101,8% |

В ходе проведенных исследований установлено, что разработанная методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоящих реактивов. Анализ 5 образцов сырья чабреца показал, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид колеблется от 0,92 до 1,63%, что позволило предложить норму содержания действующих веществ не менее 0,9%. Полученные результаты включены в проект ФС «Чабреца трава»

Выводы:

1. Разработана методика количественного содержания флавоноидов в сырье чабреца.
2. Установлены параметры линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности разработанной методики.



Литература

1. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Ч. 3: Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. – М. : Госстандарт. – 28 с.
2. Государственная фармакопея СССР 11-е изд., доп. – Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.
3. Мешковский, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Мешковский // Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий : сб.. – М., 2002. – С. 26-30.
4. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 4. Семейства Carrifoliaceae – Lobeliaceae / отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб. ; М. : Товарищество научных изданий КМК, 2011. – 630 с.

VALIDATION OF TECHNIQUES OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE FLAVONOIDS AMOUNT IN THE THYMUS HERB

V.N. BUBENCHICOVA¹

Yu. A. STARCHAK²

¹⁾ *Kursk State Medical University*

²⁾ *Orel State University*

E-mail: fg.ksmu@mail.ru

A spectrophotometric method for determining the quantitative content of flavonoids amount in the Thymusherb in terms of cinaroside has been developed with modern requirements for standardization of medicinal plants containing flavonoids. This methodology has been validated in terms of linearity, repeatability, reproducibility and accuracy.

Keywords: *Thymus serpyllum* L., standardization, method of spectrophotometry, method's validation.