

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА

О. В. Евдокимова

*ОАО «Красногорсклексредства», Московская область, г. Красногорск,  
Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова*

В статье представлены исследования по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника методом дифференциальной спектрофотометрии. Также была проведена валидация предложенной методики. Установлены критерии приемлемости разработанной методики. Предложена норма содержания биологически активных веществ в сырье тысячелистника. Полученные результаты включены в проект ФСП Тысячелистника трава.

В настоящее время, имеющееся в нормативной документации [1] на траву тысячелистника методика количественного определения имеет целый ряд недостатков. Во-первых, методикой предусматривается определение эфирных масел (не менее 0,1%) методом 3 (ГФ XI, вып.1, с.290) [2], а этой методикой предусмотрено использование декалина, который является летучим веществом и объем раствора эфирного масла в декалине получается на практике часто меньше чем объем самого декалина. Во-вторых, если использовать прибор Гинсберга (метод 1, ГФ XI, вып.1, с.290) [2], то ошибка определения составляет  $\pm 0,05$ — $0,06\%$ , что при содержании эфирного масла не менее 0,1% также затрудняет стандартизацию сырья тысячелистника.

В связи с тем, что всевозрастающие требования к стандартизации лекарственного растительного сырья вызывают необходимость количественной оценки содержания действующих веществ, а для сырья, из которого предусматривается изготовление водных извлечений, это флавоноиды, полисахариды, фенольный комплекс и т.п. Представляется целесообразным проводить оценку качества травы тысячелистника не по эфирным маслам, а по другим биологически активным веществам. Например, по флавоноидам. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о высоком содержании флавоноидных соединений в сырье тысячелистника. В траве тысячелистника обыкновенного обнаружены: апигенин, лютеолин, космоин, 7-0- $\beta$ -D-глюкопиранозид лютеолина, артемидин, кастицин, 7-глюкозид лютеолина, изорамнетин, рамнозилглюкозид кверцетина, рутин, 7-глюкозид апигенина [3—13].

Содержание флавоноидов во многом и обуславливает основное фармакологическое действие сырья тысячелистника — кровоостанавливающее и противовоспалительное. Так как флавоноиды тысячелистника обладают гемореологическими, антиаллергическими, бактерицидными, ранозаживляющими свойствами, влияют на реологические свойства крови. Кроме того, они снимают спазмы желудка, кишечника, желчных и мочевыводящих путей; тонизируют мускулатуру матки [14—18]. В связи с вышесказанным, представляется возможным рассмотреть вопрос о проведении стандартизации травы тысячелистника по сумме флавоноидов.

Целью нашей работы являлось разработка методики количественной оценки сырья тысячелистника и ее валидация.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследований проведен анализ спектров спиртовых извлечений и спиртовых извлечений после кислотного гидролиза из травы тысячелистника (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

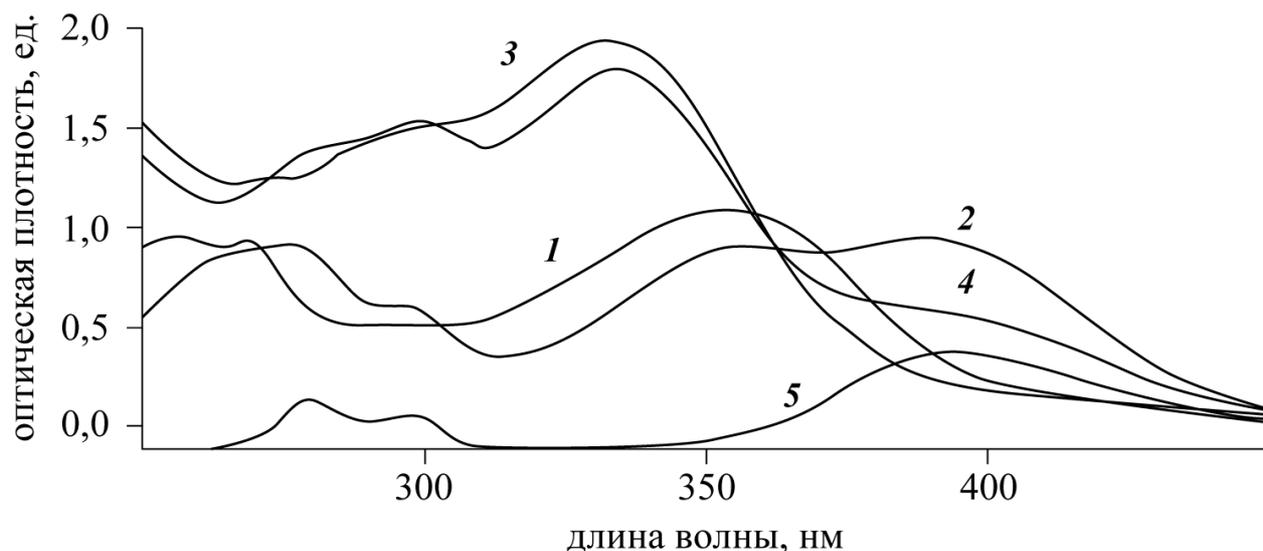


Рис. 1. Спектры спиртовых извлечений из травы тысячелистника: 1 — спектр спиртового раствора ГСО лютеолина; 2 — спектр спиртового раствора ГСО лютеолина с добавлением алюминия хлорида спектр; 3 — спектр спиртового извлечения из травы тысячелистника после кислотного гидролиза; 4 — спектр спиртовых извлечений из травы тысячелистника после кислотного гидролиза с добавлением 2% спиртового раствора алюминия хлорида; 5 — спектр комплексов лютеолина с алюминия хлорида в солянокислых спиртовых извлечениях травы тысячелистника

волны. Применение раствора исследуемого извлечения без добавления к нему реактива позволяет исключить влияние окрашенных сопутствующих веществ (рис. 1).

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 сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1,5 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 95 % этанола, содержащего 1% кислоту хлористоводородную концентрированную, колбу взвешивают с погрешностью  $\pm 0,01$  г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1,5 часа. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят 95% этанолом до первоначальной массы.

Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 3 мл 2 % спирто-

Таблица 1  
Результаты определения влияния условий экстракции на выход флавоноидов из травы тысячелистника

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, %	
Размер частиц сырья, мм	5—7	0,80
	1—2	0,83
Концентрация этанола с 1% HCl, %	60	0,82
	70	0,67
	95	0,83
Соотношение сырья и экстрагента	1:10	0,73
	1:20	0,72
	1:30	0,83
	1:40	0,74
Время экстракции, мин	60	0,59
	90	0,83
	120	0,61
	180	0,51

Таблица 2  
 Результаты определения условия проведения реакции лютеолина с алюминия хлоридом

Условия реакции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, %
Количество 2% спиртового раствора алюминия хлорида, мл	
1	0,76
2	0,83
3	0,83
4	0,82
5	0,83
Время реакции, мин	
10	0,51
20	0,75
30	0,83
40	0,83
50	0,83
60	0,82

вого раствора алюминия хлорида и доводят раствор до метки 95% этанолом. Через 40 минут измеряют оптическую плотность 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 1 мл раствора А, доведенного 95 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{(D \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100)}{549,41 \cdot M(100 - w)},$$

где  $D$  — оптическая плотность раствора, 549,41 — удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм [19],  $M$  — масса сырья в граммах,  $w$  — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Квалификации методики (валидация) проводилась по таким параметрам как: правильность, повторяемость, воспроизводимость и линейность методики [20—22].

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору для концентраций 135%, 150%, 190%. Критерием приемлемости являлся средний % восстановления при использовании растворов концентраций 135%, 150%, 190% скорректированный на 100% и его средняя величина должна находится в следующих пределах (100±5) %. Показано, что % восстановления находился в пределах от 97,67 до 102,09% и его средняя величина составила — 99,79% (табл. 3).

Таблица 3  
 Результаты опытов с добавками

Таблица 3

Найдено, опт. плотность	Добавлено, опт. плотность	Должно быть, опт. плотность	Найдено, опт. плотность	Ошибка, %
0,5154	—	—	—	—
	0,1789	0,6943	0,6979	100,52
			0,6946	100,04
			0,7088	102,09
	0,2684	0,7838	0,7784	99,31
			0,7764	99,06
			0,7928	101,15
	0,4474	0,9628	0,9608	99,79
			0,9404	97,67
			0,9478	98,44
Средний % восстановления	99,79			

Таблица 4  
Количественное содержание суммы флавоноидов  
в пересчете на лютеолин в сырье  
тысячелистника

№ измерения	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, %
1	0,7332
2	0,7145
3	0,7095
4	0,7118
5	0,7483
6	0,7343
Коэффициент вариации, %	2,15

Таблица 5  
Количественное содержание суммы флавоноидов  
в пересчете на лютеолин в сырье  
тысячелистника

Первая серия измерений			
Номер образца	1	2	3
Химик №1	0,64	0,71	0,72
Химик №2	0,63	0,64	0,66
Вторая серия измерений			
Номер образца	1	2	3
Химик №1	0,61	0,71	0,71
Химик №2	0,56	0,62	0,64
Третья серия измерений			
Номер образца	1	2	3
Химик №1	0,60	0,68	0,70
Химик №2	0,56	0,63	0,65
Среднее значение	0,60	0,67	0,68
Коэффициент вариации, %	5,68	6,03	5,01

Повторяемость методики определяли на одном образце сырья в 6 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации. Коэффициент вариации не должен превышать 4,0%. Он составил 2,15% (табл. 4), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Определение воспроизводимости методики проводили на 3 образцах в трех повторностях (выполняли 2 инженера-химика) (табл. 5). Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации. Коэффициент вариации не должен превышать 10%. Он составил 6,03%, что указывает на прецизионности методики в условиях воспроизводимости.

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолина сырье тысячелистника. Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в растворах, имеющих концентрацию 50%, 70%, 100%, 130%, 150%.

Мерой линейности является коэффициент корреляции и если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,98. Коэффициент корреляции составил 0,9956 (табл. 6, рис. 2).

В ходе исследований установлено, что методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоя-

Таблица 6  
Результаты опыта линейности методики

Концентрация флавоноидов (по отношению к декларируемому содержанию суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин), %	Объем аликвоты	Оптическая плотность растворов
50	0,5	0,282
70	0,7	0,397
100	1,0	0,536
130	1,3	0,642
150	1,5	0,736
Коэффициент корреляции		0,9971

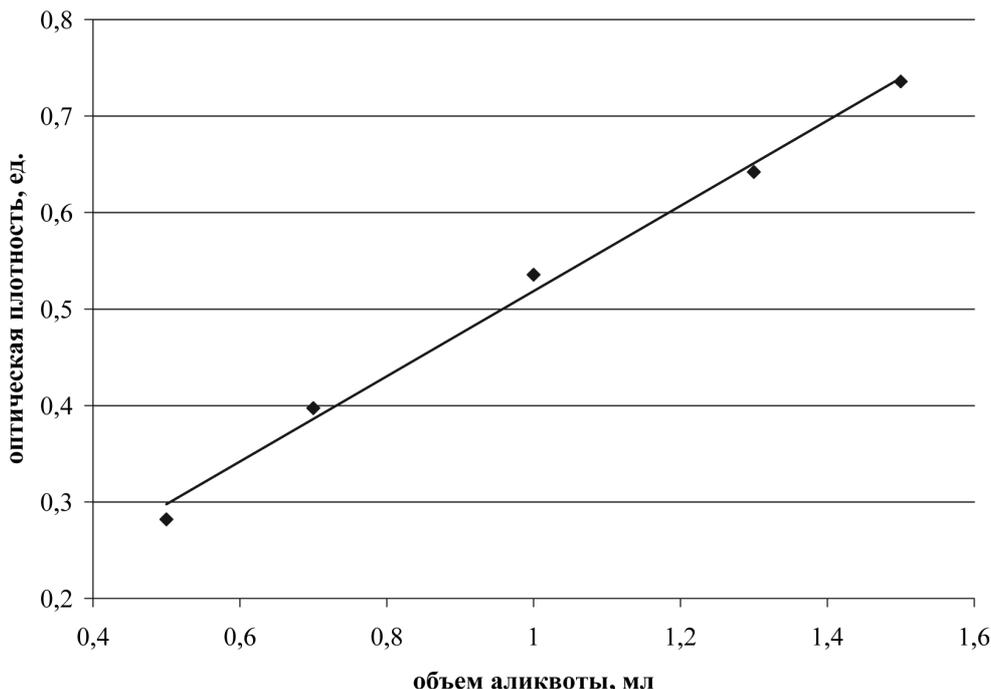


Рис. 2. Линейность методики

щих реактивов. Она позволяет объективно оценивать качество лекарственного растительного сырья тысячелистника. Предлагаемую методику количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в траве тысячелистника можно рассматривать как альтернативную фармакопейной методике, позволяющую оценивать качество растительного сырья.

Анализ промышленных партий сырья показал содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, предлагаемой методикой колеблется от 0,49 до 0,88%, что позволяет предложить норму содержания действующих веществ не менее 0,40%.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана альтернативная методика количественного содержания действующих веществ в сырье тысячелистника.

2. Установлены параметры правильности, повторяемости, воспроизводимости и линейности разработанной методики.

3. Предложена норма содержания биологически активных веществ в траве тысячелистника. Полученные результаты включены в проект ФСП Тысячелистника трава.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея СССР: вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье

/ МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с., ил.

2. Государственная фармакопея СССР: вып. 1. Общие методы анализа/ МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с., ил.

3. Калошина Н.А., Нешта И.Д. Флавоноиды *Achillea millefolium* // Химия природных соединений, 1973, №1, С. 273.

4. Нешта И.Д. и др. Рутин из *Achillea millefolium* // Химия природных соединений, 1972, №5, С. 676—677.

5. Тилляев К.С. и др. Химическая характеристика тысячелистника обыкновенного, произрастающего в Узбекистане / К.С.Тилляев, Х.Х.Халматов, И.Примухамедов, М.А.Талипова // Растительные ресурсы, 1973, Т.9, вып. 1, С. 58—62.

6. Aljancic I, Vajs V, Menkovic N, Karadzic I, Juranic N, Milosavljevic S, Macura S. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: antimicrobial activity // J. Nat. Prod. 1999. Vol. 62(6). P. 909—11.

7. Chandler R.F., Hooper S.N., Harvey M.J. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow *Achillea millefolium* (Compositae) // Econ. Bot. 1982. Vol. 36, N2. P. 203—223.

8. Falk A.J. et al. Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* // J. Pharm. Sci. 1975. V. 64, N 11. P. 1838—1842.

9. Horhammer L. Flavone concentration of medicinal plants with regard to their spasmolytic action// Congr. Sci. Farm. Conf. Comun., 21 st., Pisa. 1961. P. 578—588; Chem. Abstrs. 1964. V.61, N 3571.

10. Michaluk A. Identyfikacja flawonow w koszczykach krawawnika (*Achillea millefolium* L.) // Diss. pharm. et pharmacol. PAN. 1962. N.14, N3. S. 347—353.

11. Schulz H., Albroscheit G. High-performance liquid chromatographic characterization of some medical plant extracts used in cosmetic formulas // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.17; 442. P. 353—61.
12. Valant K. Charakteristische flavonoidglycoside und verwandtschaftliche Gliederung der Gattung Achillea // *Naturwissenschaften.* 1978. Jg 65. N.8. S. 437—438.
13. Valant-Vetschera K.M., Wollenweber E. Exudate flavonoid aglycones in the alpine species of Achillea sect. Ptarmica: Chemosystematics of *A. moschata* and related species (Compositae-Anthemideae) // *Biochem. Syst. Ecol.* 2001. Vol.1;29(2). P. 149—159.
14. Левчук А.П. Кровоостанавливающие и маточные средства // *Тр. Науч. хим. фарм. ин-та* 1927. Вып. 15. С. 3—79.
15. Осетров В.Д., Лебедь В.В. Фитотерапия болезней крови // 2 респ. конф. по мед. ботанике. Киев, 1988. С. 393—394.
16. Плотников М.Б., Колтунов А.А., Алиев О.И., Калинкина Г.И., Березовская Т.П., Тихонова Л.А. // Изучение действия флавоноидсодержащих соединений на реологические свойства крови *in vitro* // Теоретические и практические аспекты изучения лекарственных растений. — Томск, 1996. — С. 130—131.
17. Плотников М.Б., Колтунов А.А., Алиев О.И., Калинкина Г.И., Березовская Т.П., Андреева В.Ю., Тихонова Л.А. // Гемореологические свойства экстрактов из некоторых растений, содержащих флавоноиды // Растительные ресурсы. — 1998. — Т.34, вып. 1. — С. 87—91.
18. Поиск, создание и изучение новых лекарственных средств растительного и синтетического происхождения: Тезисы докладов научной конф., посвященной 50-летию каф. фармацевтической химии СМУ (23—25 сент. 1993) — Бийск: — НПО «Алтай». — 1993. — 126 с.
19. ГОСТ 21908-93 Трава душицы.
20. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Часть 3. // Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. — М.: Госстандарт, 28 с.
21. 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.
22. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве // Под ред. проф. Береговых В.В. — М.: «Издательский дом «Русский врач». — 2005. — С. 73—97.