

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, С. С. Воропаева

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 07.09.2013 г.

Аннотация. Разработана и валидирована методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях крапивы двудомной методом дифференциальной спектрофотометрии. Выбраны оптимальные условия извлечения флавоноидов из листьев крапивы двудомной. Согласно полученным результатам, методика валидна и пригодна для использования в целях стандартизации данного вида лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: флавоноиды, валидация, листья крапивы двудомной.

Abstract. It is developed and validated a technique of quantitative definition of the maintenance of the sum flavonoids in terms of routines in nettle leaves by a two-blast furnace a method of a differential spectrophotometry. Optimum conditions of extraction flavonoids are chosen from nettle leaves as a two-blast furnace. According to the received results, the technique is valid and suitable for use for standardization of this type of medicinal vegetable raw materials.

Keywords: flavonoids, validation, nettle leaves two-blast furnace.

Огромные запасы дикорастущих лекарственных растений очень важно рационально использовать, так как количество их не безгранично. Существует проблема их рационального использования, и уже сегодня многие занесены в Красную книгу. Крапива двудомная издавна используется в медицине и ее запасы легко воспроизводимы. Данное лекарственное растение разрешено к применению для детей до 14 лет. Листья крапивы являются официальным растительным сырьем, включенным в ГФ XI изд. Однако в ФС отсутствуют методики количественного определения действующих веществ, что не соответствует современному уровню развития фармацевтической науки в целом [1].

В литературе представлены сведения по определению суммы флавоноидов в пересчете на кверцетрин в листьях крапивы таких видов, как узколистная, жгучая и коноплевая [2-4]. Содержание флавоноидов в листьях крапивы двудомной не нормируется [5-7]. Однако, стандартизация лекарственного растительного сырья (ЛРС) по содержанию флавоноидов является весьма актуальной.

Ранее методом ТСХ в извлечении из листьев крапивы двудомной были идентифицированы

флавоноиды по характерному свечению в УФ-свете, одним из которых являлся рутин при сравнении с достоверным стандартным образцом [8].

Целью работы являлась разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях крапивы двудомной с использованием дифференциальной СФ.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественного определения флавоноидов в сырье крапивы двудомной разработана методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс со спиртовым раствором алюминия хлорида, который вызывает bathochromный сдвиг длинноволновой полосы поглощения [9-12] и при этом даёт основной максимум поглощения при длине волны 411 ± 2 нм (рис. 1). Аналогичный максимум поглощения при длине волны 412 ± 2 нм отмечен для комплекса рутина со спиртовым раствором алюминия хлорида, использованного нами в методике в качестве стандартного образца (рис. 1).

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после до-

бавления комплексообразователя в течение 1 часа. Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 15 минут и сохраняется в течение наблюдаемого периода (рис. 2).

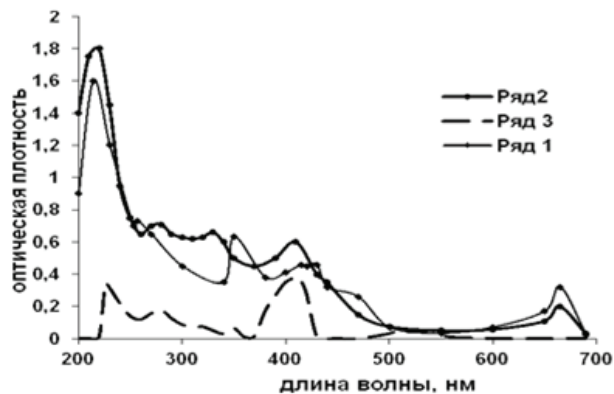


Рис. 1. Спектры поглощения (1 - спиртового извлечения из листьев крапивы двудомной (1:50), разведенного в 20 раз относительно спирта; 2 - комплекса спиртового извлечения с алюминия хлоридом относительно спирта; 3 - дифференциальный спектр поглощения комплекса извлечения с алюминия хлоридом).

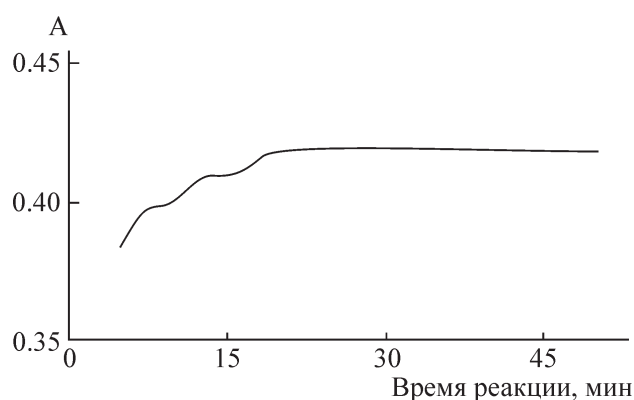


Рис. 2. Зависимость оптической плотности извлечения с комплексообразователем от времени реакции.

Согласно экспериментальным данным, для получения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента 2 % спиртового раствора алюминия хлорида в соотношении экстракт-комплексообразователь 1:2 (рис. 3 и табл. 1).

Для установления полноты экстракции флавоноидов из листьев крапивы двудомной изучали влияние степени измельченности сырья (рис. 4), полярности экстрагента (рис. 5), соотношения сырья и экстрагента и оптимального времени экстракции (рис. 6). При выборе степени измельчен-

ности использовали частицы сырья, проходящие через сито с диаметром отверстий 0.2; 0.5; 1; и 2 мм (рис. 4). Показано, что максимальное извлечение флавоноидов достигается при измельчении сырья до размера частиц менее 0.2 мм.

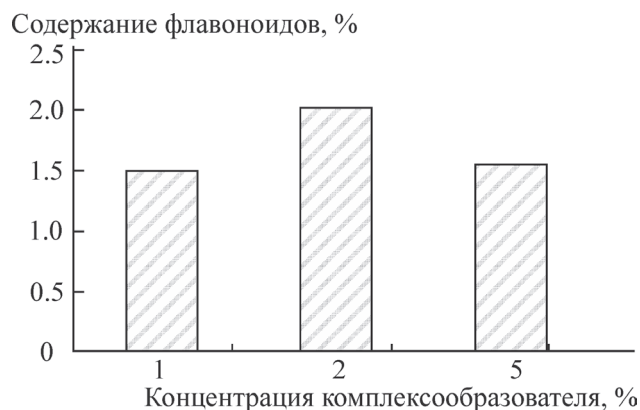


Рис. 3. Влияние концентрации комплексообразователя на результаты определения флавоноидов в извлечении.

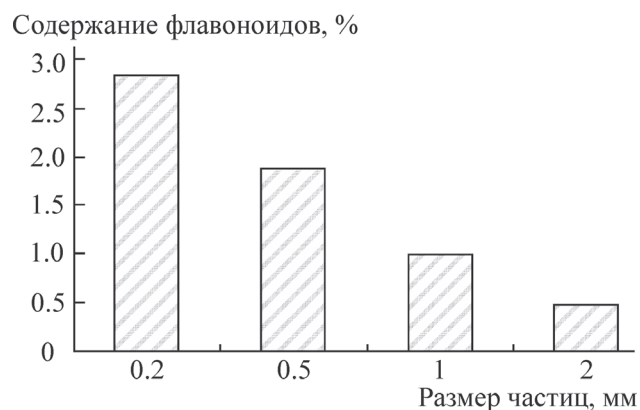


Рис. 4. Влияние степени измельченности лрс на выход флавоноидов в извлечение.

Лучшим экстрагентом для выделения флавоноидов является 96 % этанол при соотношении сырья и экстрагента 1:50 (табл. 2,3).

При исследовании влияния полярности экстрагента на выход флавоноидов (рис. 5) установлено, что неполярные растворители не способны извлекать данные БАВ из ЛРС. С увеличением полярности до 2.5 единиц происходит повышение экстрагируемости флавоноидов, которое сохраняется до 5.5 единиц. Дальнейшее увеличение полярности экстрагента нецелесообразно, ввиду снижения содержания флавоноидов в извлечении (рис. 5). Полярность экстрагента влияет не только на суммарный выход флавоноидов из ЛРС, а также на их качественный состав в извлечении. Экспериментально установлено, что значение

максимума поглощения комплекса флавоноидов листьев крапивы двудомной с раствором алюминия хлорида при варьировании полярности экстрагентов, находится при различных длинах волн (табл. 4). Это можно объяснить, вероятнее всего, влиянием полярности растворителя на преобладающий выход того или иного флавоноида в извлечение.

Таблица 1
Влияние соотношения объема извлечения из листьев крапивы двудомной и комплексобразователя на содержание флавоноидов.

№ п/п	Соотношение извлечения и комплексобразователя	Содержание флавоноидов, %
1	1:1	1.671±0.036
2	1:2	2.021±0.044
3	1:5	1.695±0.037

Таблица 2
Влияние экстрагента на извлечение флавоноидов из листьев крапивы двудомной.

№ п/п	Экстрагент	Полярность экстрагента	Содержание флавоноидов, %
1	Гексан	0	-
2	Гексан-96% этанол (1:1)	2.60	1.867±0.0410
3	96% этанол	5.20	1.885±0.0413
4	70% этанол	6.34	1.323±0.0290
5	40% этанол	7.48	0.382±0.0080
6	Вода	9.00	-

«-» при использовании экстрагента флавоноиды не извлекались.

Таблица 3
Влияние соотношения сырья и экстрагента на извлечение флавоноидов из листьев крапивы двудомной.

№ п/п	Соотношение сырья и экстрагента	Содержание флавоноидов, %
1	1:30	1.328±0.029
2	1:50	2.827±0.062
3	1:70	1.671±0.037

Таблица 4
Влияние полярности экстрагента на флавоноидный состав извлечения

№ п/п	Полярность экстрагента	Максимум поглощения, нм	Флавоноид [9]
1	2.60	399	3-метилкемпферол
2	5.20	411	рутин
3	6.34	402	кверцетрин
4	7.48	405	гиперозид

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 45 минут (рис. 6).



Рис. 5. Влияние полярности экстрагента на извлечение флавоноидов из листьев крапивы двудомной.



Рис. 6. Влияние времени экстракции на содержание флавоноидов и извлечении.

Количественное определение. Около 1 г сырья (точная навеска), помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 96% этилового спирта и взвешивают с погрешностью ±0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 96% этиловым спиртом. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). 2 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл 2% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте и 4 капли раство-

ра уксусной кислоты разведенной. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки (раствор Б) и оставляют на 15 мин. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония) при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: 2 мл извлечения, 4 капли раствора разведенной уксусной кислоты и 96% этиловый спирт, добавленный до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора РСО рутин, приготовленного аналогично испытываемому раствору. Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{A_E \cdot 0,025 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A_E \cdot 0,025 \cdot 5000}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где A — оптическая плотность испытываемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора РСО рутин; m — масса сырья, г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Примечание. Приготовление раствора рутин стандартного образца. Около 0.025 г (точная навеска) РСО рутин, в пересчете на сухое вещество помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 35 мл 96% этилового спирта и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А), 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте и капли раствора разведенной уксусной кислоты, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: 1 мл исходного раствора, 4 капли раствора разведенной уксусной кислоты и 96% этиловый спирт, добавленный до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Для приготовления 2% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте 2 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл 96% этилового спирта и доводят объем раствора до метки тем же спиртом.

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что относительная ошибка методики с доверительной вероятностью 95% составляет около 5%, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики (табл. 5).

Однако для того, чтобы предлагаемая аналитическая методика заняла достойное место в системе обеспечения качества, т.е. гарантировала достоверные и точные результаты анализа, дополнительно была проведена процедура ее валидации (аттестации). При проведении валидационных исследований были установлены такие характеристики разработанной методики, как предел определения, линейность, специфичность, правильность и сходимости. Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в образцах ЛРС составило $1.5519 \pm 0.034\%$ (принятое опорное значение).

Специфичность методики определяли методом добавок. Как следует из рис. 7, при введении РСО рутин дифференциальный спектр извлечения имеет аналогичный вид с характерными максимумами поглощения при 224 ± 2 ; 270 ± 2 и 410 ± 2 нм.

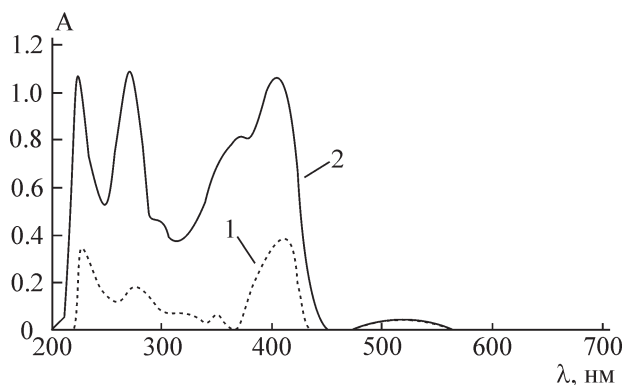


Рис. 7. Вид дифференциального спектра поглощения извлечения из листьев крапивы двудомной (1 – без добавки РСО рутин; 2 – с добавкой РСО рутин).

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору для концентраций 125; 131.25; 162.5; 225%. Критерий приемлемости - средний процент восстановления при использовании растворов заданных кон-

Таблица 5

Метрологическая характеристика метода анализа ($P = 95\%$; $n = 6$).

f	x_{cp}	S^2	S	Sx_{cp}	$S_r, \%$	t(P,t)	Δx	Δx_{cp}	$\epsilon_{cp}, \%$	$\epsilon, \%$
5	1.5519	0.00105	0.0324	0.0132	2.09	2.57	0.083	0.034	2.19	5.37

центраций, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. В разработанной методике средняя величина процента восстановления составила 98.19% (табл. 6).

Линейность определяли на пяти уровнях концентраций. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме: 1 уровень: аликвота раствора А 0.75 мл – объем раствора Б 25.0 (37.5%); 2 уровень: аликвота раствора А 1.0 мл – объем раствора Б 25.0 (50.0%); 3 уровень: аликвота раствора А 2.0 мл – объем раствора Б 25.0 (100.0%); 4 уровень: аликвота раствора А 2.5 мл – объем раствора Б 25.0 (125.0%); 5 уровень: аликвота раствора А 3.0 мл – объем раствора Б 25.0 (150.0%). Критерий приемлимости – коэффициент корреляции не менее 0.995 (рис.

8). Другие характеристики линейности (наклон прямой, отрезок на оси ординат) приведены в табл. 7.

Повторяемость (сходимость) методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95%, вычисленные значения RSD – 2.09% и относительного доверительного интервала среднего значения – 2.19% не превышают критериев приемлемости – 5%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 7).

Таблица 6

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками).

№ п/п	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, г	Добавлено РСО рутина, г	Ожидаемое содержание, г	Полученное содержание, г	Средний процент восстановления, %
1	0.00080	0.00100	0.00180	0.00220	98.19
2		0.00050	0.00130	0.00120	
3		0.00050	0.00130	0.00110	
4		0.00025	0.00105	0.00126	
5		0.00025	0.00105	0.00091	
6		0.00020	0.00100	0.00091	
7		0.00020	0.00100	0.00091	

Таблица 7

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях крапивы двудомной.

Характеристика	Статистические характеристики		Результаты
Линейность	Уравнение прямой		$y=0.0747x - 0.029$
	Наклон (a)		0.0747
	Отрезок на оси ординат b		0.029
	Коэффициент корреляции		0.9969
	Диапазон линейности (грамм флавоноидов в 1 гр. сырья)		$3.1 - 9.3 \cdot 10^{-4}$
Повторяемость	проба	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %
	1	0.303	1.5797
	2	0.296	1.5432
	3	0.302	1.5745
	4	0.291	1.5172
	5	0.304	1.5849
	6	0.290	1.5119
	Наименьшее значение, %		1.5119
	Наибольшее значение, %		1.5849
	Среднее значение, %		1.5519
	Доверительный интервал (P=95%), %		1.5519 ± 0.034 $1.5179 - 1.5859$
Стандартное отклонение, %		0.0324	
Коэффициент вариации, %		2.09	
Предел определения, г	Количество грамм флавоноидов в 1 гр. сырья		$2.33 \cdot 10^{-4}$

Полученные результаты позволяют поставить листья крапивы двудомной по содержанию флавоноидов в один ряд с известными лекарственными растениями – источниками флавоноидов (табл. 8).

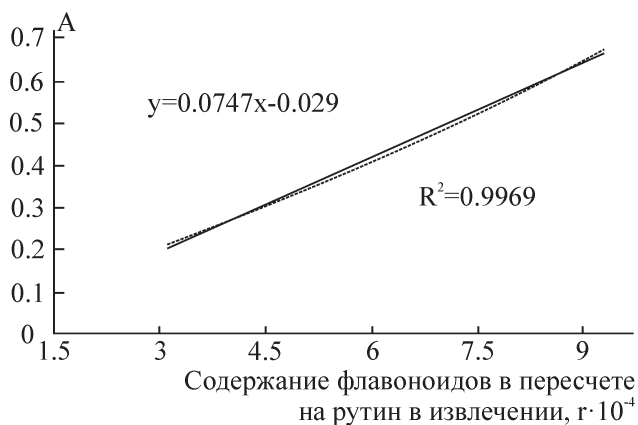


Рис. 8. Зависимость оптической плотности раствора от объема исследуемого извлечения.

Таблица 8
Содержание флавоноидов в некоторых видах ЛРС

№ п/п	Наименование ЛРС	Содержание суммы флавоноидов по НД, %
1	Цветки бессмертника песчаного	Не менее 6.0
2	Цветки пижмы обыкновенной	Не менее 2.5
3	Листья крапивы двудомной	1.5519±0.034
4	Трава зверобоя продырявленного	Не менее 1.5
5	Листья вахты трехлистной	Не менее 1.0
6	Трава горцев перечного и птичьего	Не менее 0.5
7	Цветки боярышника	Не менее 0.5
8	Трава сушеницы топяной	Не менее 0.2
9	Плоды боярышника	Не менее 0.06

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, разработанная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях крапивы двудомной валидна и пригодна для использования в целях стандартизации данного ЛРС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лупинская С.М. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы, душицы и сывороточных экстрактов на их основе / С.М. Лу-

пинская, С.В. Орехова, О.Г. Васильева // Химия растит. сырья. — 2010. - №3. — С. 143-145.

2. Пещуха В.С. Фармакогностическое изучение крапивы коноплевой / В.С. Пещуха // Автореф. канд. фарм. н. Улан-Удэ. — 2009. — 26 с.

3. Губин К.В. Изучение химического состава надземной части крапивы коно-плевоы флоры сибири / К.В. Губин, М.А. Ханина // Химия растит. сырья. — 2009. — №2. — С. 89-92.

4. Матюшенко Н.В. Влияние условий сушки на содержание флавоноидов и гидроксикоричных кислот в листьях крапивы узколистной / Н.В. Матюшенко // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». — Пятигорск. — 2012. — С. 78-79.

5. Копытько Я.Ф. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор) / Я.Ф. Копытько, Е.С. Лапинская, Т.А. Сокольская // Хим.-фарм. журн. — Том 45. — №10. — 2011. — С. 32-40.

6. Лапинская Е.С. Изучение состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной и крапивы жгучей / Е.С. Лапинская, Я.Ф. Копытько // Хим.-фарм. журн. — Т. 42. — №12. — 2008. — С. 26-29.

7. Федосеева Л.М. Изучение некоторых фенольных соединений крапивы коноплевой травы, произрастающей на территории алтайского края / Л.М. Федосеева, В.О. Кирьякова // Химия растит. сырья. - 2012. - №2. - С. 133-138.

8. Тринева О.В. Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ / О.В. Тринева, С.С. Ворopaева, А.И. Сливкин // Сорбц. и хромат. процессы. — 2013. — Т.13. — Вып. 2. — С. 213-219.

9. Клышев Л.К. Флавоноиды растений / Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина // Алмата, 1978. — 220 с.

10. Куркин В.А. Определение флавоноидов в траве чистотела большого / В.А. Куркин, Е.С. Артамонова // Фармация. — 2007. — № 5. — С. 10-12.

11. Хасаншина А.Р. Определение флавоноидов в побегах караганы древовидной / А.Р. Хасаншина, Е.И. Барабанов, Л.И. Бабаскина // Фармация. — 2009. — № 5. — С. 20-22.

12. Хазиев Р.Ш. Экстрагируемость флавоноидов травы зверобоя в настои / Р.Ш. Хазиев, А.А. Тынчерова // Фармация. — 2006. — №6. — С. 32-34.

Тринева Ольга Валерьевна — кандидат фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: trineeva@mail.ru

Сливкин Алексей Иванович — доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Воропаева Светлана Сергеевна — студент фармацевтического факультета ВГУ.

Trineeva Olga V. — the candidate pharm. sciences, the assistant to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VSU; e-mail: trineeva@mail.ru

Slivkin Alexey I. — the doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VSU; e-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Voropaeva Svetlana S. — student of pharmaceutical faculty of VSU.