

УДК 615.322: 582.734.4

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ МАНЖЕТКИ ТРИНАДЦАТИЛОПАСТНОЙ (ALCHEMILLA TREDECIMLOBA BUSER.)

Бабаян М.С., Коновалов Д.А.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: maruska14@mail.ru

Предложена методика определения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в траве манжетки тринадцатиллопастной, обладающей рядом ценных фармакологических свойств. Проведена валидация разработанной методики по параметрам линейности (область линейной зависимости находится при концентрациях рутина от 15 до 70 мг/мл), повторяемости (относительное стандартное отклонение равно 1,02 %) и правильности (средний процент открываемости составил 99,94 %). Полученные результаты показали, что методика позволяет объективно оценивать качество травы манжетки тринадцатиллопастной, что позволяет включить её в раздел «Количественное определение» проекта ФСП «Манжетки тринадцатиллопастной трава».

Ключевые слова: манжетка, флавоноиды, рутин, валидация.

VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS GRASS CUFF TRINADCATILETNIY (ALCHEMILLA TREDECIMLOBA BUSER.)

Babayan M.S., Konovalov D.A.

Pyatigorsk medical and pharmaceutical Institute - branch of the Volgograd State Medical University the Ministry of health of Russia, Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, Kalininaave., 11), e-mail: maruska14@mail.ru

Proposed a method for quantifying the content of total flavonoid in recalculation on rutin in the herb Alchemillatredecimloba, which has some valuable pharmacological properties. Conducted validation of the developed technique in the parameters of linearity (a region of linear dependence is routine at concentrations of 15 to 70 mg / ml), repeatability (relative standard deviation of 1,02%) and accuracy (average percentage openability was 99,94%). The results showed that the method makes it possible to objectively assess the quality of the herb Alchemillatredecimloba that allows you to include it in the section "Quantitative determination" of the project monograph of pharmacopoeia "Alchemillatredecimloba herb".

Keywords: Alchemillatredecimloba, flavonoids, rutin, validation.

Alchemilla (манжетка) – род многолетних, редко однолетних травянистых растений семейства Rosaceae (розоцветных), включающий около 40 трудноразличимых видов, по поводу которых у ботаников нет единого мнения. Наиболее распространенным сборным видом считается Alchemillavulgaris L. (манжетка обыкновенная) [4,6].

Во флоре России и сопредельных государств встречаются представители 305 видов рода Alchemilla. Ареал их распространения необычайно широк от Восточной Европы (Европейской части бывшего СССР) до Дальнего Востока, включая Кавказ, Среднюю Азию, Западную и Восточную Сибирь.

Анализируя флору манжеток Кавказа, нами было установлено, что на Северном Кавказе произрастает 24 вида манжеток, в Ставропольском крае – 7 видов, в Западном Северном Кавказе – 12 видов, в Западном Закавказье – 22 вида, на Кавказе – по данным А.А. Гроссгейма 36 видов, по данным С.К. Черепанова – 88 видов [7].

Для изучения мы выбрали эндемичный вид манжетку тринадцатиллопастную (*Alchemilla tredecimloba* Buser), так как сведений по её химическому составу в доступной литературе не обнаружено. Ранее нами установлено, что основной группой биологически активных веществ травы манжетки тринадцатиллопастной являются флавоноиды, преобладает среди которых рутин [5]. При разработке проекта ФСП «Манжетки тринадцатиллопастной трава» именно по содержанию флавоноидов предлагается оценивать как основной критерий доброкачественности сырья.

Целью настоящей работы явилась разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки тринадцатиллопастной и её валидация.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явилась трава манжетки тринадцатиллопастной (*Alchemilla tredecimloba* Buser), заготовленной на территории Северного Кавказа.

По результатам анализа фенольных соединений в траве манжетки тринадцатиллопастной методом ВЭЖХ преобладающим компонентом суммы флавоноидов является рутин, который мы сочли целесообразным использовать в качестве стандартного образца.

Для количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки тринадцатиллопастной нами был выбран метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на определении продуктов реакции комплексообразования с алюминия (III) хлоридом. За основу была взята методика количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки обыкновенной методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на лютеолин-7-гликозид [1,2].

Валидация методики проводилась по линейности, повторяемости и правильности [3].

Определение линейности проводили на 7 уровнях концентрации от теоретического содержания суммы флавоноидов. Растворы готовили путём разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для получения концентраций 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 % соответственно и измеряли их оптическую плотность.

Результаты исследований

По результатам анализа фенольных соединений в траве манжетки тринадцатиллопастной методом ВЭЖХ преобладающим компонентом суммы флавоноидов является рутин, который мы сочли целесообразным использовать в качестве стандартного образца.

Дифференциальные спектры комплексов с алюминия хлоридом флавоноидов травы манжетки тринадцатиллопастной по положению максимумов светопоглощения (410 нм) близки к дифференциальным спектрам комплексов рутина (рис. 1). Эта область спектра

достаточно далека от спектров поглощения сопутствующих фенольных соединений, содержащихся в извлечениях из растительного сырья. Использование в качестве раствора сравнения испытуемого раствора без добавления алюминия хлорида значительно повышает избирательность определения, позволяет выделить полосу поглощения комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом.

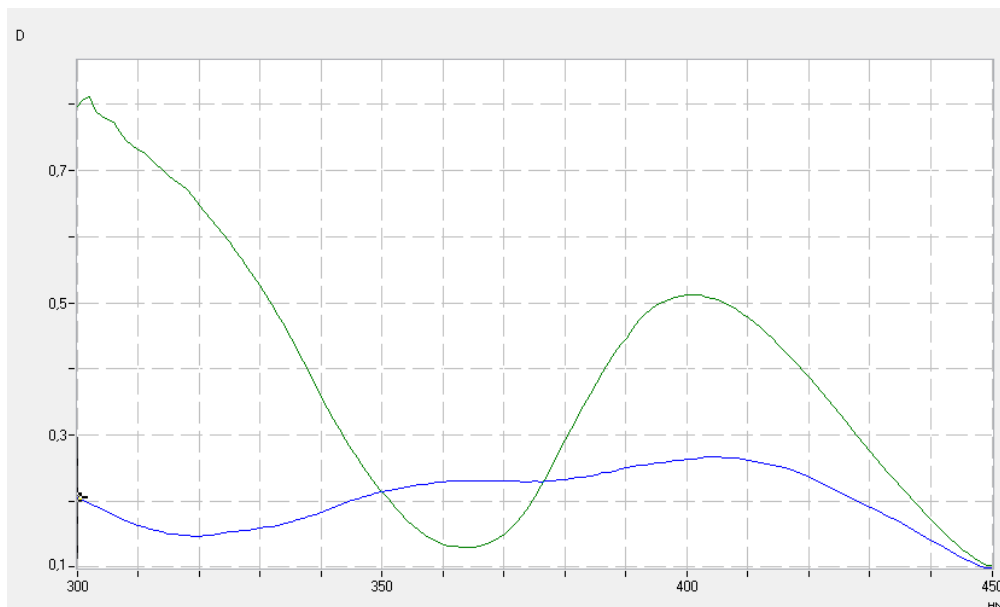


Рис.1. Дифференциальный спектр извлечения из травы манжетки тринадцатиллопастной после добавления раствора алюминия хлорида

Методика: 0,5 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 2 мм, помещали в термостойкую колбу вместимостью 100 мл, заливали 15 мл спирта этилового 70 %, нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Затем извлечение охлаждали, фильтровали в мерную колбу на 50 мл. Операцию повторяли дважды порциями спирта этилового 70 % по 15 мл. Затем объем в мерной колбе доводили до метки спиртом этиловым 70 % (раствор А). 1 мл раствора А помещали в колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл 5 % раствора уксусной кислоты и доводили до метки спиртом этиловым 95 %. Через 30 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при 410 нм относительно раствора сравнения, приготовленного по методике: 1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл спирта этилового 95 % 0,5 мл 33 % раствора кислоты уксусной, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали.

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

$$X = \frac{A_x \cdot m_{\text{нб}} \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot A_{\text{нб}} \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где: A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца;

$m_{ст}$ – масса стандартного образца рутин, г;

a – масса навески сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Результаты шести измерений, обработанные методом вариационной статистики, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения флавоноидов в траве манжетки
тринадцатиллопастной ($m_{ст} = 0,0545$, $A_{ст} = 0,580$)

Навеска, г	Оптическая плотность	Найдено (%) X	Метрологические Характеристики
0,5099	0,519	3,60	$\bar{X} = 3,46\%$ $S = 0,0765$ $S_{\bar{x}} = 0,0312$ $\Delta X = 0,0803$ $\varepsilon = 2,32\%$
0,5201	0,510	3,47	
0,4997	0,477	3,37	
0,5317	0,515	3,42	
0,4152	0,407	3,46	
0,5001	0,483	3,41	

Таким образом, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве манжетки тринадцатиллопастной составило 3,46 %.

Валидация методики проводилась по линейности, повторяемости и правильности.

Таблица 2

Определение линейности разработанной методики

Навеска ЛРС, г	Навеска, % от заявленной	Оптическая плотность, A	Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин, мг/мл
0,2771	50	0,267	17,00
0,4157	75	0,407	25,87
0,5543	100	0,541	34,42
0,6928	125	0,658	41,88
0,8314	150	0,812	51,63
0,9699	175	0,910	57,86

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Нижний допустимый предел этой величины 0,99. Вычисление коэффициента корреляции проводили с помощью программы MicrosoftExcel 2010 (рис. 2).

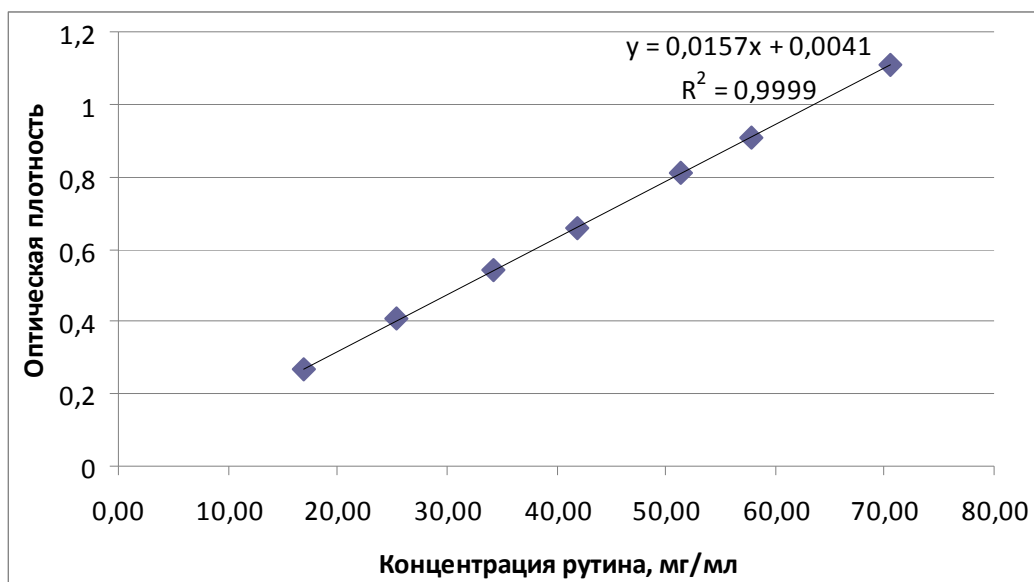


Рис.2. Зависимость оптической плотности от концентрации рутина

Из рисунка 2 видно, что почти все экспериментальные точки лежат на линии тренда. Величина коэффициента корреляции лежит в пределе $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$.

Прецизионность методики оценивали только по первому уровню – повторяемости. Повторяемость методики определяли в 9 навесках сырья (табл. 3).

Таблица 3

Определение повторяемости разработанной методики

Уровень	Рассчитанное количество флавоноидов, мг/мл	Получено	Открываемость, R, %	Метрологические характеристики
1:0,5	17,3	17	98,2659	X ср=99,94 SD=1,021 RSD=1,02
	17,3	17,4	100,578	
	17,3	17,6	101,7341	
1:1	34,6	34,4	99,42197	
	34,6	34,7	100,289	
	34,6	34,5	99,71098	
1:1,5	51,9	51,6	99,42197	
	51,9	52,3	100,7707	
	51,9	51,5	99,22929	

Средняя величина приемлемости (средний процент открываемости, скорректированный на 100 %) находится в пределах 97–103 %. В разработанной методике средний процент открываемости составил 99,94 %, а относительное стандартное отклонение

не превышает 3 %, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа.

Результаты проведённого анализа показали, что предложенная методика количественного определения флавоноидов в пересчёте на рутин в траве манжетки тринадцатиллопастной отвечает современным требованиям и может быть включена проект ФСП «Манжетки тринадцатиллопастной трава».

Список литературы

1. Азовцев Г.Р. Фенольные соединения кровохлебки и манжетки, перспектива их использования в медицине // Проблемы освоения лекарственных ресурсов Сибири и Дальнего Востока: тез. докл. Всесоюз. науч. конф. – Новосибирск, 1983. – С. 93-94.
2. Андреева, В.Ю. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L. / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – № 1. – С. 85-88.
3. Арзамасцев, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.А. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8-12.
4. Баева, В.М. Морфолого-анатомические особенности строения представителей рода манжетка / В.М. Баева, А.В. Павкин // Актуальные вопросы медицины., материалы Всероссийской студенческой конференции, посвященной 50-летию АМН России 4–6 октября, 1994. – М., 1994. – С. 60.
5. Бабаян М.С. Изучение химического состава травы манжетки тринадцатиллопастной // Научное обозрение. Естественные науки. – 2009. – № 2. – С. 40-44.
6. Сычак Н.Н. Род *Alchemilla* L. (Rosaceae) во флоре Западного Закавказья // Материалы юбил. Междунар. конф., посвящ. 160-летию Сухумского Ботанического сада 22–25 мая 2012. – Сухум, 2003. – С. 156-158.
7. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). – СПб.: Мир и семья, 1995. – 992 с.

Рецензенты:

Компанцев В.А., д.фарм.н., профессор кафедры неорганической химии, Пятигорского медико-фармацевтического института, филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Кодониди И.П., д.фарм.н., профессор кафедры органической химии, Пятигорского медико-фармацевтического института, филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.