



ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И ФАРМАКОГНОЗИЯ

УДК 615.015.32

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В СБОРАХ № 1 и № 2 ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОТМОРОЖЕНИЙ

А.А. ШАЦКИХ¹
Т.Л. КИСЕЛЕВА²

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, г. Москва

² НИЦ НО «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов», г. Москва

e-mail: KiselevaTL@yandex.ru

В статье представлены результаты разработки спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в Сборах №1 и №2, используемых для профилактики и лечения отморожений. Проведена валидация методик по критериям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость и правильность. По результатам анализа серийных образцов предложены нормы содержания суммы флавоноидов в препаратах: в Сборе № 1 – не менее 2,5%, в Сборе № 2 – не менее 2,2%.

Ключевые слова: сборы, отморожения, количественное определение, флавоноиды, валидация методик.

В последние годы прослеживается четкая тенденция к увеличению числа пострадавших от холодовой травмы в регионах с умеренным климатом [9, 19]. Несмотря на то, что сегодня патогенез отморожений во многом изучен, клиническая ситуация, связанная с оказанием эффективной помощи пострадавшим, еще далека от совершенства [20].

Основой терапии отморожений в ранние сроки после травмы является введение антиспастических, сосудорасширяющих, антикоагулянтных и других препаратов синтетического происхождения, обладающих выраженными побочными видами действия, в том числе гормональных. Нами разработаны рецептуры двух растительных препаратов – (Сборов № 1 и № 2) для профилактики и лечения отморожений. Доклинические исследования [1-3] подтвердили наличие у них выраженного фригопротекторного эффекта. Составы сборов защищены патентами [17, 18].

Важнейшим этапом создания новых препаратов, в том числе растительных, является разработка методов их стандартизации. В качестве одного из критериев оценки качества сборов нами предложено количественное содержание суммы флавоноидов, которые присутствуют во всех ингредиентах сборов, имеют широкий спектр фармакологической активности и во многом обуславливают суммарный терапевтический эффект сборов.

Целью настоящей работы являлась разработка и валидация методик количественного определения суммы флавоноидов в Сборах № 1 и № 2, рекомендуемых для профилактики и лечения отморожений.

В основу разработанных методик положен спектрофотометрический метод после реакции комплексообразования суммы флавоноидов со спиртовым раствором $AlCl_3$ [4, 10-12, 15]. В результате образования комплекса наблюдается батохромный сдвиг



длинноволновой полосы поглощения флавоноидов до 390-410 нм [4, 11, 15]. Эта область достаточно удалена от спектров поглощения других фенольных соединений, содержащихся в исходном сырье (фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества и др.), что практически исключает их влияние на результаты количественного определения флавоноидов [4, 11].

Для подбора оптимальных условий извлечения суммы флавоноидов использовали по одному экспериментальному образцу каждого сбора (табл. 1-3: среднее из 5 определений, масса каждой навески 2,5 г, кипящая водяная баня с обратным холодильником).

Таким образом, оптимальными условиями выделения суммы флавоноидов из сборов № 1 и № 2 являются: измельченность сборов 1 и 3 мм соответственно; экстрагент – 40% спирт; соотношение сырья и экстрагента 1:20; двукратная экстракция (по 30 мин.) на кипящей водяной бане с обратным холодильником.

Затем были отработаны условия проведения фотометрической реакции комплексообразования суммы флавоноидов водно-спиртовых извлечений из сборов со спиртовым раствором $AlCl_3$: область максимального поглощения света комплексом, концентрация и количество спиртового раствора $AlCl_3$, необходимые для полного связывания суммы флавоноидов в комплексное соединение, зависимость светопоглощения фотометрируемых соединений от времени [5].

Таблица 1

Влияние концентрации спирта на выход суммы флавоноидов из сборов (измельченность – 3 мм, продолжительность экстракции – 1 час)

Конц. спирта, %	Выход суммы флавоноидов из сбора, % на абс. сухое сырье	
	Сбор №1	Сбор №2
40	1,70	2,26
50	1,06	2,07
70	1,34	1,92

Таблица 3

Влияние измельченности сборов на выход суммы флавоноидов при двукратной экстракции

Условия экстрагирования		Выход суммы флавоноидов из сбора, %, в пересчете на абс. сухое сырье	
Конц. спирта, %	Измельченность, мм	Сбор	
		№1	№2
40	1	3,05	2,27
	3	1,80	2,66
	5	1,73	1,96

Таблица 2

Влияние продолжительности однократной экстракции и кратности экстрагирования на выход суммы флавоноидов из сборов

Условия экстрагирования			Выход суммы флавоноидов из сбора, в % на абс. сухое сырье	
Кратность экстракции	Время экстракции, мин	Кол-во 40% спирта, мл	Сбор	
			№ 1	№2
1-кратная	60	50,0	1,70	2,26
	120	50,0	1,72	2,41
2-кратная	30	25,0	1,80	2,66
	30	25,0		

Оптическую плотность предложено регистрировать при длине волны 410 нм, а расчет процентного содержания суммы флавоноидов в сборах проводить в пересчете на СО рутина, поскольку области максимального светопоглощения комплекса суммы флавоноидов извлечений из сборов и комплекса СО рутина со спиртовым раствором $AlCl_3$ совпадают (рис. 1).

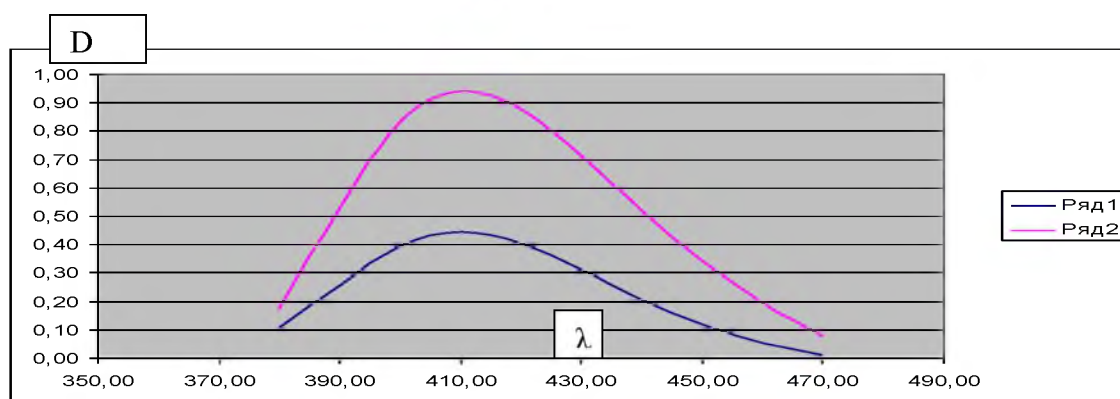


Рис. 1. УФ-спектр продуктов реакции комплексообразования раствора СО рутина (ряд 1) и суммы флавоноидов водно-спиртового извлечения из сбора № 1 (ряд 2) с 3% спиртовым раствором $AlCl_3$

На основании полученных данных для проведения фотометрической реакции в дальнейшем использовали 3% спиртовой раствор $AlCl_3$

Как видно из данных табл. 5, при использовании 2 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$ наблюдается наибольшее увеличение значений суммы флавоноидов в обоих сборах.

Для изучения зависимости светопоглощения от времени фотометрической реакции комплексообразования регистрировали оптическую плотность растворов через каждые 5 мин. Установлено, что в течение 30-35 мин. идет процесс образования комплексов, при этом оптическая плотность растет. При дальнейшем наблюдении какого-либо значительного роста оптической плотности не происходит, что соответствует на графиках почти горизонтальным участкам. Поэтому регистрацию оптической плотности предложено осуществлять через 40 мин. после добавления реактива.

Таблица 4

Влияние концентрации спиртового раствора $AlCl_3$ на полноту протекания реакции комплексообразования с суммой флавоноидов сборов (средние из 5 определений)

Концентрация раствора $AlCl_3$, %	Сумма флавоноидов в сборах, % в пересчете на абс. сухое сырье	
	Сбор № 1	Сбор № 2
1	2,57	2,08
2	2,58	2,17
3	3,05	2,66

Таблица 5

Влияние количества 3% раствора $AlCl_3$ на полноту протекания реакции комплексообразования с суммой флавоноидов сборов

Кол-во 3% раствора $AlCl_3$, мл	Сумма флавоноидов в сборах, в % на абс. сухое сырье	
	Сбор №1	Сбор №2
1	3,04	2,60
2	3,20	2,66
3	3,19	2,55
4	3,19	2,51

Методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в сборах. Около 2,5 г (точная навеска) Сбора № 1 или Сбора № 2, измельченного до размера частиц 1 или 3 мм, соответственно, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют мерной пипеткой 25 мл 40% спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Горячее извлечение перемешивают и фильтруют через фильтр «Красная лента», избегая попадания сырья на фильтр, в мерную колбу, вместимостью 50 мл. Экстракцию повторяют в тех же условиях. Горячее извлечение перемешивают и филь-



труют в ту же мерную колбу через тот же фильтр. Затем доводят объем раствора в мерной колбе до метки 40% спиртом, перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора $AlCl_3$, доводят объем колбы 95% спиртом до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Красная лента». В качестве раствора сравнения используют смесь 1 мл раствора А, помещенного в мерную колбу вместимостью 25 мл, 2-3 каплей кислоты уксусной разведенной и доведенной 95% спиртом до метки. Оптическую плотность полученных растворов измеряют через 40 минут на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм в области максимума при длине волны 410 нм. Параллельно, в указанных выше условиях, измеряют оптическую плотность 0,05% раствора СО рутина, приготовленного аналогично испытываемому раствору.

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

$$X(\%) = \frac{D \times m_0 \times 1 \times 50 \times 25 \times 100}{D_0 \times 100 \times 25 \times m \times 1 \times (100 - W)} \times 100\%$$

где D – оптическая плотность испытываемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора СО рутина; m – масса навески сбора, г; m_0 – масса навески СО рутина, г; W – потеря в массе при высушивании сбора, %.

Валидацию методик проводили по следующим критериям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость и правильность [6-8, 13, 14, 16].

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций рутина – 30%, 50%, 100%, 150%, 200%, от нормируемого значения. Значение оптической плотности (A) рассчитывалось как среднее из трех измерений.

Таблица 6

Результаты проверки линейности методик

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения (около)	Концентрация стандартного вещества (рутина), мкг/мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)
Сбор №1			
1	30	3,6	0,161
2	50	6	0,243
3	100	12	0,577
4	150	18	0,763
5	200	24	0,993
Сбор №2			
1	30	3,6	0,157
2	50	6	0,233
3	100	12	0,545
4	150	18	0,759
5	200	24	0,982

Критерием приемлемости линейности являлся коэффициент корреляции, и если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не менее 0,995.

Коэффициент корреляции составил 0,9951 (для Сбора № 1) и 0,9973 (для Сбора № 2) (табл. 6, рис. 2, 3).

Повторяемость методик определяли на одном образце каждого сбора в 6 повторностях в течение короткого промежутка времени с использованием одних и тех же реактивов и оборудования. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Он составил 1,28% (для Сбора № 1) и 1,42% (для Сбора № 2) (табл. 7), что свидетельствует о прецизионности методик в условиях повторяемости.

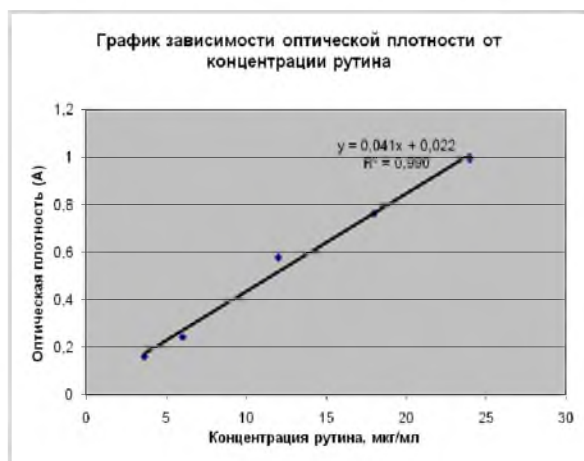


Рис. 2. График зависимости оптической плотности спиртовых извлечений Сбора № 1 от концентрации рутина

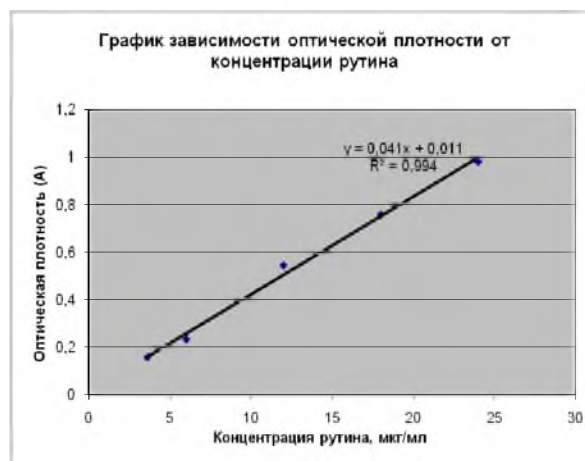


Рис. 3. График зависимости оптической плотности спиртовых извлечений Сбора № 2 от концентрации рутина

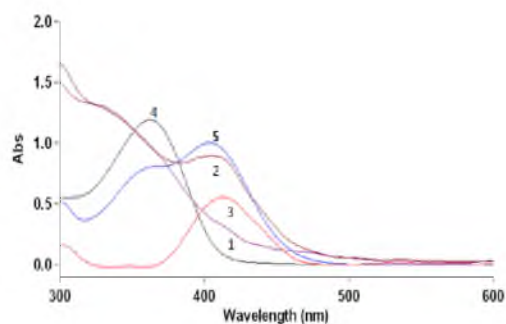


Рис. 4. Спектры спиртовых извлечений из Сбора № 1

1 - спектр спиртового извлечения из Сбора № 1, 2 - спектр спиртового извлечения из Сбора № 1 с добавлением 2% спиртового раствора $AlCl_3$, 3 - спектр комплексов рутина $AlCl_3$ в спиртовых извлечениях Сбора № 1, 4 - спектр спиртового раствора СО рутина, 5 - спектр спиртового раствора СО рутина с добавлением $AlCl_3$. По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – оптическая плотность, ед.

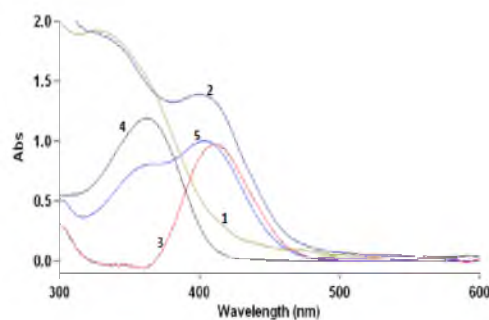


Рис. 5. Спектры спиртовых извлечений из Сбора № 2

1 - спектр спиртового извлечения из Сбора № 2, 2 - спектр спиртового извлечения из Сбора № 2 с добавлением 2% спиртового раствора $AlCl_3$, 3 - спектр комплексов рутина с $AlCl_3$ в спиртовых извлечениях Сбора № 1, 4 - спектр спиртового раствора СО рутина, 5 - спектр спиртового раствора СО рутина с добавлением $AlCl_3$. По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – оптическая плотность, ед.

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методик проводили два инженера-химика на 3 образцах в трех повторностях (табл. 8). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно было превышать 15%. Он составил 3,88% (для Сбора № 1) и 2,57% (для Сбора № 2), что указывает на прецизионности методик в условиях воспроизводимости.

Правильность методик 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%, 151%, 177%, 202% (для Сбора № 1) и 125%, 147%, 175%, 200% (для Сбора № 2) (четыре уровня). Критерием приемлемости являлся средний % восстановления при использовании растворов концентраций 125%, 151%, 177%, 202% (для Сбора № 1) и 125%, 147%, 175%, 200% (для Сбора № 2), скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 100 ± 5 %. Показано, что % восстановления находился для Сбора № 1 в пределах от 99,40% до 103,64%, и его средняя величина составила – 101,07%, а для Сбора № 2 в пределах от 97,52% до 102,37%, и его средняя величина составила – 100,31% (табл. 9).



Таблица 7

Результаты проверки повторяемости методик

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %	Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Сбор №1		Сбор №2	
1	2,88	1	2,39
2	2,96	2	2,35
3	2,99	3	2,36
4	2,95	4	2,3
5	2,96	5	2,31
6	2,97	6	2,35
Среднее значение	2,95		2,34
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,28		1,42

Таблица 8

Результаты проверки воспроизводимости методик

Повторность	Анализик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
Сбор №1				
1	1	2,88	3,00	2,81
2	1	2,96	3,05	2,99
3	1	2,99	3,01	2,71
4	2	2,95	2,94	2,96
5	2	2,96	2,91	2,95
6	2	2,97	2,99	2,97
Среднее значение		2,95	2,98	2,90
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		1,28	1,69	3,88
Сбор №2				
1	1	2,39	2,29	2,33
2	1	2,35	2,40	2,39
3	1	2,36	2,33	2,36
4	2	2,30	2,51	2,39
5	2	2,31	2,6	2,45
6	2	2,35	2,34	2,50
Среднее значение		2,34	2,41	2,40
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		1,42	4,97	2,57

На основании полученных результатов данные методики можно считать прошедшими валидацию.



Таблица 9

Результаты проверки правильности методик

№№ п/п	Найдено, мг	Добавлено СО рутина, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Выход %
Сбор №1					
1	1,4600	0,3750	1,8350	1,8240	99,40
2	1,4600	0,3750	1,8350	1,8655	101,66
3	1,4600	0,3750	1,8350	1,8761	102,24
4	1,4600	0,7500	2,2100	2,2330	101,04
5	1,4600	0,7500	2,2100	2,2345	101,11
6	1,4600	0,7500	2,2100	2,2905	103,64
7	1,4600	1,1250	2,5850	2,6050	100,77
8	1,4600	1,1250	2,5850	2,6045	100,75
9	1,4600	1,1250	2,5850	2,5990	100,54
10	1,4600	1,5000	2,9600	2,9650	100,17
11	1,4600	1,5000	2,9600	2,9780	100,61
12	1,4600	1,5000	2,9600	2,9855	100,86
Среднее значение выхода, %: 101,07					
Сбор №2					
1	1,1760	0,2940	1,4700	1,4582	99,20
2	1,1760	0,2940	1,4700	1,4790	100,61
3	1,1760	0,2940	1,4700	1,4864	101,12
4	1,1760	0,5880	1,7640	1,7755	100,65
5	1,1760	0,5880	1,7640	1,7562	99,56
6	1,1760	0,5880	1,7640	1,7588	99,71
7	1,1760	0,8820	2,0580	2,0933	101,72
8	1,1760	0,8820	2,0580	2,0433	99,29
9	1,1760	0,8820	2,0580	2,0656	100,37
10	1,1760	1,1760	2,3520	2,3898	101,61
11	1,1760	1,1760	2,3520	2,4078	102,37
12	1,1760	1,1760	2,3520	2,2936	97,52
Среднее значение выхода, %: 100,31					

Анализ опытно-производственных серий сборов показал, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин колеблется для Сбора №1 от 2,82% до 3,21%, что позволяет предложить норму содержания БАВ не менее 2,5%, а для Сбора № 2 от 2,47% до 2,66%, что позволяет предложить норму содержания флавоноидов не менее 2,2% (табл. 10).

Таблица 10

Результаты определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сборах № 1 и № 2

Опытно- производственные серии сборов	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %	Опытно- производственные серии сборов	Содержание суммы флавоноидов в пересче- те на рутин, %
Сбор № 1		Сбор № 2	
0108	2,82	0108	2,53
0208	2,95	0208	2,58
0308	2,94	0308	2,47
0408	2,92	0408	2,62
0508	3,21	0508	2,66
0608	2,99	0608	2,59



Выводы:

1. Разработаны методики количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в Сборах №1 и №2.
2. Установлены параметры правильности, повторяемости, внутрिलाбораторной воспроизводимости и линейности разработанных методик. Предложены нормы содержания суммы флавоноидов в Сборе №1 – не менее 2,5% и Сборе №2 – не менее 2,2%.

Литература

1. Алиева, А.А. Сравнительное изучение влияния дексаметазона и фитосборов на гематологические показатели крови крыс при острой холодовой травме / А.А. Алиева, М.Ю. Назаренко, Т.Л. Киселева, Н.А. Назаренко // I Российский фитотерапевтический съезд : сб. науч. трудов, г. Москва, 14-16 марта 2008 г. – М. : ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2008. – С. 164-169.
2. Алиева, А.А. Сравнительное изучение влияния дексаметазона и лекарственного сбора на уровень мочевины крови крыс при холодовой травме / А.А. Алиева, Н.А. Назаренко, Т.Л. Киселева, М.Ю. Назаренко // Экология человека. – 2007. – № 5. – С. 43-46.
3. Алиева, А.А. Изучение влияния фитосборов на рост клеточной культуры почек мыши / А.А. Алиева, В.П. Пашенко, Т.Л. Киселева, Н.А. Назаренко // I Российский фитотерапевтический съезд : сб. науч. трудов, г. Москва, 14-16 марта 2008 г. – М. : ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2008. – С. 162-164.
4. Беликов, В.В. Количественное определение основных действующих веществ у видов *Nuregicum L.* / В.В. Беликов, Т.В. Точкова, Л.В. Шатунова, Н.Т. Колесник, И.И. Баяндина // Растительные ресурсы. – 1990. – Т. 26, вып. 4. – С. 571-578.
5. Булатов, М.И. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л. : Химия, Ленингр. отд., 1968. – 384 с.
6. ГОСТ Р ИСО 5725-1-02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1. Основные положения и определения».
7. 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.
8. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки / О.В. Евдокимова // Традиционная медицина. – 2011. – № 1 (24). – С. 50-53.
9. Гостищев, В.К. Инфекции в хирургии. Рук-во для врачей / В.К. Гостищев. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 768с.
10. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.
11. Куркин, В.А. Определение флавоноидов в траве чистотела большого / В.А. Куркин, Е.С. Артамонова // Фармация. – 2007. – № 5. – С. 10-12.
12. Куркин, В.А. Вопросы стандартизации сырья и препаратов зверобоя / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Фармация. – 2007. – № 4. – С. 12-14.
13. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве // под ред. проф. В.В. Береговых. – М. : Русский врач, 2005. – С. 73-97.
14. ОФС 42-0113-09 Валидация аналитических методик.
15. Попов, Д.М. Контроль качества сырья и препаратов пустырника спектрофотометрическим методом / Д.М. Попов, Е.В. Пашинская, Л.И. Коваленко // Фармация. – 1992. – № 4. – С. 27-31.
16. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / сост.: В.Л. Багирова, А.И. Гризодуб, Т.Х. Чибилев и др. ; под ред. Н.В. Юргеля и др. – М., 2007. – 48 с..
17. Средство из растительного сырья для профилактики и лечения отморожений / Н.А. Назаренко, Т.Л. Киселева, А.А. Алиева, М.Ю. Назаренко (РФ). – А. с. 2326684; заявл. 26.10.06.; опубл. 20.06.08.
18. Сбор лекарственных растений «Фитоморозко», обладающий фригопротекторным действием / Н.А. Назаренко, Т.Л. Киселева, А.А. Алиева, М.Ю. Назаренко, А.А. Карпеев (РФ). – А. с. 2336896; заявл. 30.11.06.; опубл. 27.10.08.
19. Day, M.W. Frostbite / M.W. Day // Nursing. – 2008. – Jan. – Vol. 38 (1). – P. 72.
20. Keskin, M. Frostbite injuri due to improper usage of an ice pack / M. Keskin, Z. Tosun, A. Duymaz et al. // Ann Plast Surg. – 2005. – Oct. – № 55 (4). – P. 437-438.



DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE SUM OF FLAVONOIDS IN HERBAL DRUG PREPARATIONS №1 AND №2 FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF FROSTBITE

A.A. SHATSIKH¹
T.L. KISELEVA²

*¹⁾ GNU VILAR Rosselhosacademia,
Moscow*

*²⁾ SRC of NO «Professional Association
of Naturotherapists», Moscow*

e-mail: KiselevaTL@yandex.ru

The article presents the results of a quantitative spectrophotometric method development for quantitative determination of the flavonoid amount in terms of routine in the Herbal Drug Preparations №1 and №2, used for the prevention and treatment of frostbite. Held validation of techniques criteria: linearity, repeatability, intra-laboratory reproducibility and accuracy. According to the results of the analysis of serial samples standards for levels of flavonoids in preparations were proposed - №1- not less than 2,5, №2 - not less than 2,2%.

Key words: Herbal Drug Preparations, frostbite, quantification, flavonoids, validation of methods