



УДК 615.32:54

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В НЕКОТОРЫХ ВИДАХ РОДА CITRUS

О.С. ЕВСЕЕВА
О.А. АНДРЕЕВА
Э.Т. ОГАНЕСЯН

*Пятигорский
медико-фармацевтический
институт – филиал
Государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего профессионального
образования Волгоградского
медицинского университета
Минздрава России*

e-mail: edwardov@mail.ru

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в некоторых видах цитрусовых в пересчете на гесперидин спектрофотометрическим методом, а также проведена валидационная оценка данной методики по таким параметрам, как правильность, повторяемость, воспроизводимость и линейность. Определено количественное содержание флавоноидов в экстрактах из кожуры *C. reticulata* (мандарин), *C. sinensis* (апельсин), *C. paradisi* (грейпфрут), *C. maxima* (помело) и *C. limonia* (лимон), максимальное содержание флавоноидов наблюдается в экстрактах из мандарина и грейпфрута – 7,68% и 7,46% с.

Ключевые слова: гесперидин, флавоноиды, количественное определение, валидация.

Широкий спектр биологической активности флавоноидных соединений обусловлен, прежде всего, их высокой антирадикальной активностью, благодаря чему в различных органах и тканях происходит нормализация патохимических процессов. Растущая потребность в препаратах этой группы свидетельствует о необходимости поиска доступных и экономически выгодных сырьевых источников. С этой точки зрения экономически целесообразно использование промышленных отходов пищевого производства, в частности, цитрусовых. В нашей стране кожура плодов цитрусовых практически не применяется, хотя она богата пектинами, витаминами и флавоноидами. Ранее нами из кожуры апельсинов была получена субстанция, характеризующаяся противоязвенной активностью [4]. На основе флавоноидов кожуры цитрусовых (диосмина и гесперидина) за рубежом выпускают препараты «Детралекс», «Диовенор» и др. Максимальное содержание флавоноидов наблюдается в кожуре, причем большинство из них представлено гликозидами флаванонов [11, 12]. В табл. 1 приведен состав флавоноидов плодов различных видов цитрусовых [7, 8, 9, 10].

Таблица 1

Флавоноиды плодов цитрусовых

Флавоноиды	Вид цитрусовых	Структура С-кольца	
Нарингин	<i>C. paradisi</i> , <i>C. aurantium</i> <i>C. maxima</i>	FLA	5,4'-OH, 7-0-Neo
Неогесперидин	<i>C. reticulata</i>	FLA	5,3',4'-OH, 7-0-Neo
Гесперидин	<i>C. sinensis</i> , <i>C. paradisi</i> <i>C. limonia</i> , <i>C. reticulata</i> <i>C. maxima</i>	FLA	5,3'-OH, 4'-OMe, 7-0-Rut
Диосмин	<i>C. sinensis</i> , <i>C. limonia</i>	FLO	5,3'-OH, 4'-OMe, 7-0-Rut
Рутин	<i>C. limonia</i>	FOL	5,7,3',4'-OH, 3-0-Rut
Нарингенин	<i>C. paradisi</i> , <i>C. aurantium</i> <i>C. sinensis</i>	FLA	5,7,4'-OH
Эриодиктиол	<i>C. aurantium</i>	FLA	5,7,3',4'-OH
Эриодиктиол	<i>C. aurantium</i>	FLA	5,7,3',4'-OH
Гесперетин	<i>C. Reticulate</i> , <i>C. sinensis</i>	FLA	5,7,3'-OH, 4'-OMe
Апигенин	<i>C. paradisi</i>	FOL	5,7,4'-OH
Лютеолин	<i>C. limonia</i> , <i>C. sinensis</i> <i>C. aurantium</i>	FOL	5,7,3',4'-OH
Диосметин	<i>C. sinensis</i>	FOL	5,7,3'-OH, 4'-OMe
Кемпферол	<i>C. paradisi</i>	FOL	5,7,3,4'-OH
Кверцетин	<i>C. limonia</i>	FOL	5,7,3,3',4'-OH
Тангеритин	<i>C. aurantium</i> , <i>C. paradisi</i> <i>C. limonia</i>	FLO	5,6,7,8,4'-OMe

Примечание: FLA – флаваноны; FLO – флавоны; FOL – флавонолы Neo – неогесперидозид; Rut – рутинозид.



Из представленных данных следует, что определение содержания суммы флавоноидов целесообразно проводить в пересчете на гесперидин, поскольку данный флаванон-биозид содержится практически во всех представителях рода *Citrus*, а по молекулярной массе и спектральным характеристикам близок к диосмину и рутину.

Цель нашего исследования – разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в разных видах рода *Citrus*.

В основу количественного исследования положен спектрофотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности флаванонов. В качестве стандартного образца использовали гесперидин.

Материалы и методы.

На первом этапе исследования осуществлялся подбор растворителя. При этом мы исходили из того, что общепринятым растворителем для выделения большинства типов флавоноидов является этанол. УФ-спектры поглощения спиртовых извлечений из различных видов рода *Citrus* характеризуются широкой полосой поглощения с максимумом при 330 нм, что не характерно для флаванонов. Причиной такого несоответствия является тот факт, что гесперидин (5,3'-диокси-4'-метокси-7-О-глюкорамнозид флаванона) – ведущий флаванон цитрусовых – практически нерастворим в этаноле. Нами ранее было установлено [1, 6], что добавление незначительных количеств диметилсульфоксида (ДМСО) к основному экстрагенту – этанолу существенно улучшает растворимость данного флаванона. Нами экспериментально установлено, что оптимальным экстрагентом в данном случае является смесь этанол–ДМСО 10:2.

Ниже представлены УФ-спектральные кривые поглощения раствора чистого образца гесперидина, а также экстрактов из кожуры *C. reticulata* (мандарин), *C. sinensis* (апельсин), *C. paradisi* (грейпфрут) и *C. maxima* (помело), где в качестве растворителя использовалась смесь этанол–ДМСО 10:2 (рис. 1).

Следует отметить, что в коротковолновой области спектра УФ-спектральные кривые по интенсивности поглощения разнятся, но имеют единый максимум поглощения при 286 нм, который совпадает с таковым гесперидина в смеси этанол–ДМСО 10:2. Из этого можно сделать вывод о том, что характер кривой поглощения экстрактов из кожуры различных видов цитрусовых определяется преимущественно веществами флаваноидной природы и для количественного определения в данной смеси растворителей можно исключить стадию комплексообразования с $AlCl_3$ и использовать прямое спектрофотометрическое определение.

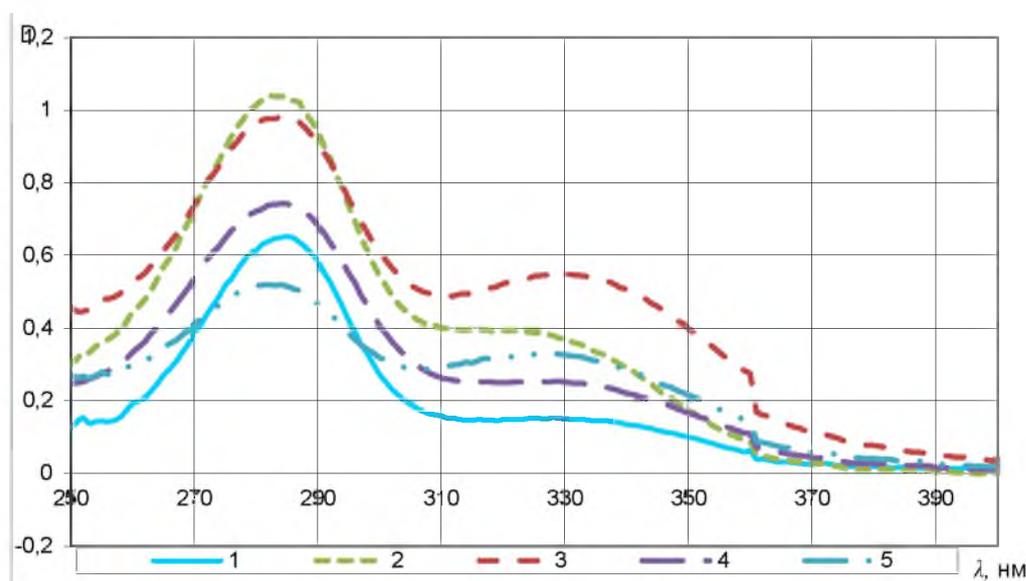


Рис. 1. 1 – гесперидин, 2 – экстракт из кожуры грейпфрута, 3 – экстракт из кожуры мандарина, 4 – экстракт из кожуры помело, 5 – экстракт из кожуры апельсина

Методика.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1,0 (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл смеси этанол – ДМСО 10:2, к колбе подсоединяют обратный



холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Далее смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл. Извлечение вышеуказанным способом повторяют 3 раза и доводят объем фильтрата до метки смесью этанол–ДМСО 10:2. 1 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят объем до метки смесью этанол – ДМСО 10:2. Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 286 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для построения калибровочного графика зависимости оптической плотности от количества гесперидина в растворе точную навеску 0,01 г этого вещества количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют отмеренные 40 мл смеси этанол–ДМСО 10:2, растворяют гесперидин, затем объем раствора доводят до метки.

Для приготовления разведений в мерные колбы на 25 мл переносят аликвоты раствора стандарта и доводят до метки смесью этанол–ДМСО 10:2. Используют аликвоты раствора стандарта, мл: 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6; 3,0; 3,4; 3,8. При этом количество гесперидина в 25 мл спектрофотометрируемого раствора равно соответственно $\text{г} \cdot 10^{-5}$: 0,48; 0,80; 1,12; 1,296; 1,76; 2,08; 2,40; 2,72; 3,04.

Оптическую плотность измеряют при длине волны 286 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см; в рабочую кювету помещают анализируемые растворы, в кювету сравнения – смесь этанол–ДМСО 10:2. Калибровочный график зависимости оптической плотности (D) от количества гесперидина в спектрофотометрируемом растворе (с) имеет вид прямой линии (рис. 2).

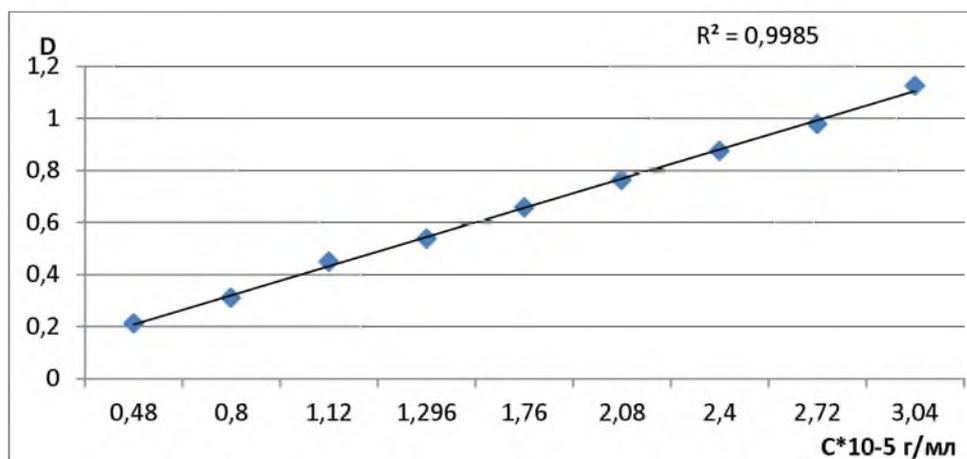


Рис. 2. Градуировочный график

Массовую долю суммы флавоноидов в исследуемых в экстрактах пересчете на гесперидин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{c \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - \omega)} \cdot 100\%$$

где с – количество гесперидина в анализируемой аликвоте экстракта, соответствующее измеренной оптической плотности по калибровочному графику, $\text{с} \cdot 10^{-5}$ г/мл; а – масса сырья, г; ω – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Квалификация методики (валидация) проводилась по таким параметрам как: правильность, повторяемость, воспроизводимость и линейность методики [2, 3, 5].

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин в растворах, полученных добавлением необходимого количества стандарта к исследуемому раствору. Критерием приемлемости являлся средний процент восстановления при использовании растворов концентраций, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. Показано, что процент восстановления находится в интервале от 97,7 до 100,98%, а его средняя величина составляет 99,49% (табл. 2).



Таблица 2

Результаты определения правильности методики

Найдено, опт.плотность	Добавлено, опт.плотность	Должно быть, опт.плотность	Найдено, опт.плотность	Ошибка, %
0,7504	-	-	-	-
	0,1899	0,9403	0,9191	97,75
			0,9286	98,76
			0,9292	98,82
	0,2949	1,0453	1,0474	100,20
			1,0555	100,98
			1,0472	100,18
	0,3767	1,1271	1,1181	99,20
			1,1246	99,78
			1,1241	99,73
Средний % восстановления	99,49			

Повторяемость методики определяли на одном образце сырья в 6 повторениях. Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации. Коэффициент вариации не должен превышать 4,0%. Он составил 1,85%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 3).

Таблица 3

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин в кожуре *C. maxima*

№ измерения	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин, %
1	6,5012
2	6,6332
3	6,7745
4	6,5167
5	6,6385
6	6,4645
Коэффициента вариации %	1,85

Определение воспроизводимости методики проводили на 3 образцах в трех повторностях (выполняли 2 химика-аналитика). Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации. Коэффициент вариации не должен превышать 10%. В нашем случае он составил 5,69%, что указывает на прецизионности методики в условиях воспроизводимости (табл. 4).

Таблица 4

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин в кожуре *C. maxima*

Первая серия измерений			
Номер образца	1	2	3
Химик №1	5,15	5,13	5,50
Химик №2	5,75	5,47	5,31
Вторая серия измерений			
Химик №1	5,17	5,11	5,63
Химик №2	5,68	5,45	5,51
Третья серия измерений			
Химик №1	5,20	5,12	5,68
Химик №2	5,70	5,49	5,46
Среднее значение	5,44	5,30	5,50
Коэффициента вариации %	5,69	3,81	2,49

Определение линейности проводили на 6 уровнях концентраций от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин. Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин (рис. 3).

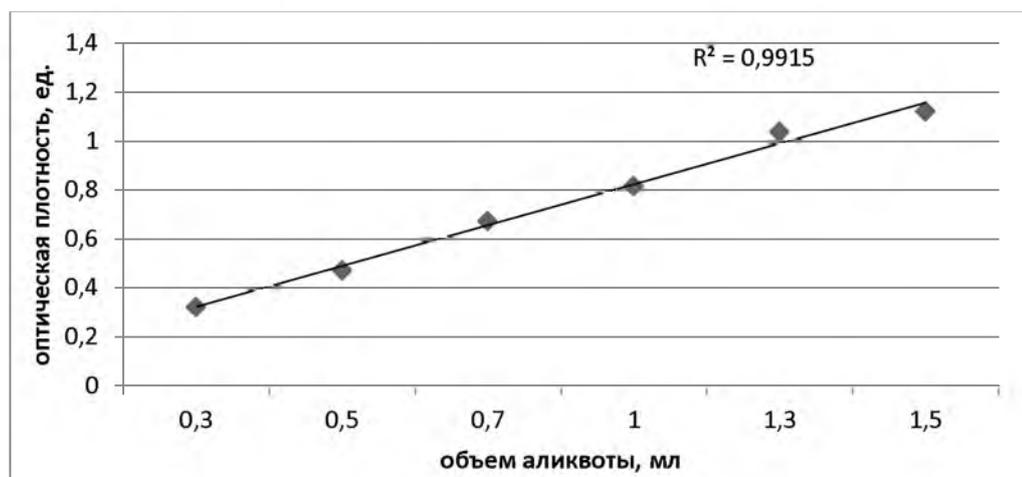


Рис. 3. Линейность методики

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 в нашем эксперименте составил 0,9915.

В ходе исследований установлено, что разработанная нами методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени и не требует дорогостоящих реактивов.

С использованием этой методики проведено определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин в некоторых видах рода *Citrus*: экстрактах из кожуры *C. reticulata* (мандарин), *C. sinensis* (апельсин), *C. paradisi* (грейпфрут), *C. maxima* (помело) и *C. limonia* (лимон) (табл. 5). Наибольшее содержание флавоноидов отмечено в экстрактах из мандарина и грейпфрута – 7,68% и 7,46% соответственно.

Таблица 5

Количественное содержание суммы флавоноидов в некоторых видах рода *Citrus*

Вид цитрусового	Количественное содержание суммы флавоноидов, %
Мандарин	7,68±0,24 ε=3,18
Грейпфрут	7,46±0,19 ε=2,61
Помело	6,38±0,29 ε=4,42
Лимон	5,13±0,19 ε=3,86
Апельсин	4,07±0,17 ε=4,17

Выводы.

1. Разработана методика количественного определения содержания флавоноидов в некоторых видах рода *Citrus*.
2. Установлены параметры правильности, повторяемости, воспроизводимости и линейности разработанной методики.
3. Определено количественное содержание флавоноидов в экстрактах из кожуры *C. reticulata* (мандарин), *C. sinensis* (апельсин), *C. paradisi* (грейпфрут) и *C. maxima* (помело) и *C. limonia* (лимон), максимальное содержание флавоноидов наблюдается в экстрактах из мандарина и грейпфрута – 7,68% и 7,46% соответственно.

Литература

1. Выделение диосмина из растений рода вика и иссопа лекарственного и его влияние на свертывание крови / М.Н. Ивашев, О.А. Андреева, В.А. Бандюкова, Т.Д. Драгалева // Хим.-фармац. журн. – 1995. – №9. – С. 39-41.
2. 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.
3. Гаврилин, М.В. Валидация аналитических методик : методические указания для студентов и аспирантов / М.В. Гаврилин, С.П. Сенченко. – Пятигорск: ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздздрава, 2008. – 35 с.



4. Патент RU 2262944 С2 А 61 К 35/78, А 61 Р 1/04. Средство из отходов цитрусовых, обладающее противоязвенной активностью / Оганесян Э.Т., Хочава М.Р., Доркина Е.Г., Репс В.Ф., Андреева О.А. (РФ). – № 2001103422/15; заявл. 05.02.2001; опубл. 27.10.2005, Бюл.№ 30.
5. Валидация аналитических методик. Содержание и методология : Руководство ИСН / Фармация. – 2008. – №4. – С.3-10.
6. Сумма гликозидов диосметина из Вики обрубленной: выделение и изучение биологического действия / О.А. Андреева, Н.И.Ивашев, И.И. Озимина, Г.В. Масликова // Хим.-фармац. журн. – 1998. – Т.32, №11. – С.28-30.
7. Characteristic of antioxydative flavonoid glycosides in lemon fruit /Miyake Y., Yamamoto K., Morimitsu Y., Osawa T. //Food and Feed Chemistry. – 1998. –Vol.4, №1. – P.48-53.
8. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature / Peterson, J.J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A. et al.//Journal of Food Composition and Analysis. – 2006. –19. – P.74-80.
9. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature/ Julia J. Peterson, Johanna T. Dwyer et al. // Journal of Food Composition and Analysis. – 2006. –№19. – P.66-73.
10. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium L.*) /He H., Lian L., Lin L., Btrnart M., Matthew W. // J.Chromatogr. – 1997. – Vol. 791, №1-2. – P.127-134.
11. Middleton E. Biological properties of plant flavonoids: an overview // International Journal of Pharmacognosy. – 1996. – Vol.34, № 34. – P.344-348.
12. User and properties of Citrus flavonoids/ Benavente-Garcia O., Castillo Julian, Marin F.R. et.al // J. Agr. And Food Chem. – 1997. – Vol. 45, №12. – P.4506-4514.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ASSAY METHOD OF FLAVONOIDS IN SOME SPECIES OF THE GENUS CITRUS

O.S. EVSEVA

O.A. ANDREEVA

E. T. OGANESYAN

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of the state budget general educational Institution of Higher Professional Education of the Volgograd State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation

e-mail: edwardov@mail.ru

The method of spectrophotometric assay of flavonoids sum in some species of the genus *Citrus* (equivalent to hesperidin) was developed and validation study was carried out to estimate such characteristics as accuracy, repeatability, reproducibility and linearity. Flavanoids content was determined in extracts of *C. reticulata* (mandarin), *C. sinensis* (orange), *C. paradisi* (grapefruit), *C. maxima* (pomelo) and *C. limonia* (lemon). The maximum flavanoids content is determined in mandarins and grapefruits – 7.68 % and 7.46 % in accordance.

Key words: hesperidin, flavanoids, assay, validation.