

УДК 615.322'454,122:543.422.3

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ФИТОГЕЛЕ РЕПАРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ

¹Володина Т.А., ¹Пеньевская Н.А., ²Ушакова Л.С., ²Ляшенко С.С.

¹ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», Омск;

²Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, e-mail: volodina22@icloud.com

Разработан фитогель репаративного действия, содержащий в качестве действующих компонентов густые экстракты чабреца, солодки, каштана, крапивы, масляный экстракт зверобоя, сок алоэ и дигидрокверцетин. Установлено содержание суммы флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин – биологически активных веществ, обеспечивающих ранозаживляющее действие в образце разработанного фитогеля, которое составило $0,72 \pm 0,04\%$. Количественное определение флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на дигидрокверцетин. Проведена валидация разработанной методики по параметрам линейности (уравнение линейной регрессии имеет вид: $y = (3,08 \pm 0,13)x$), повторяемости (относительное стандартное отклонение равно 5%) и правильности (средний процент открываемости составил 100,06%) методики. Полученные результаты показали, что методика позволяет объективно оценивать качество фитогеля с экстрактами чабреца, солодки, каштана, крапивы, зверобоя, соком алоэ и дигидрокверцетином.

Ключевые слова: фитогель, экстракт, чабрец, солодка, крапива, каштан, зверобой, алоэ, дигидрокверцетин

WORKING OUT AND VALIDATION CHARACTERISTICS OF THE METHOD OF QUANTITATIVE MAINTENANCE FLAVONOIDS IN PHYTOGEL OF THE REPARATIVE ACTION

¹Volodina T.A., ¹Penyevskaya N.A., ²Ushakova L.S., ²Lyashenko S.S.

¹Omsk State Medical Academy, Omsk;

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of «Volgograd State Medical University», Pyatigorsk, e-mail: volodina22@icloud.com

The phytogel of the reparative action was developed. This gel containing quality of operating components thick extracts of thyme, glycyrrhiza, chestnut, nettle, oil extract of hypericum, aloe juice and dihydroquercetin. Set the contents of flavonoids in terms of dihydroquercetin – biologically active substances that provide a healing effect in the sample of developed fitogeli, which amounted to $0,72 \pm 0,04\%$. Quantitativ definitions of flavonoids were spent with to help of method of differential spectrophotometry in recalculation on dihydroquercetin. The validation of the developed technique was carried out to the parameters of linearity (linear regression equation is: $y = (3,08 \pm 0,13)x$), repeatability (relative standard deviation was 5%) and accuracy (average percentage of detectability was of 100,06%). The results showed that the technique allows to objectively assess the quality of the phytogel with extracts of thyme, glycyrrhiza, chestnut, nettle, oil extract of hypericum, aloe juice and dihydroquercetin.

Keywords: phytogel, extract, thyme, glycyrrhiza, nettle, chestnut, hypericum, aloe, dihydroquercetin

Мировой объем продаж лекарственных средств на растительной основе в 2011 г. оценивался на уровне 26 млрд долларов. При этом использование фитопрепаратов на мировом рынке характеризуется тенденцией к росту, и в ближайшие 10 лет доля лекарственных средств растительного происхождения в общих объемах потребления фармацевтических препаратов может достигнуть 60% [1, 4–7]. По данным государственного реестра лекарственных средств из мягких лекарственных форм для наружного применения препараты растительного происхождения с репаративными свойствами составляют всего 0,5%, а производителями этих препаратов являются Грузия, Франция, Германия и Индия, что говорит об отсутствии на фармацевтическом рынке отечественных аналогов таких препаратов. Нами разработан фитогель, сочетающий экстракты чабреца, солодки, крапивы, каш-

тана, зверобоя, сок алоэ и дигидрокверцетин и обеспечивающий репаративное действие.

Цель исследования. Разработать методику количественного определения суммы флавоноидов в фитогеле и определить ее валидационные характеристики.

Результаты исследования и их обсуждение

Основными действующими веществами экстрактов чабреца, солодки, зверобоя, каштана являются флавоноиды. При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов использовали реакцию комплексообразования с раствором алюминия хлорида. В условиях комплексообразования наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов, в частности, флавонов и флавонолов, который обнаруживается в УФ-спектре

в виде максимума поглощения в области 390 ± 5 нм, что находит применение в методе дифференциальной спектрофотометрии [2].

Для количественного определения суммы флавоноидов к 0,3 г фитогеля (точная навеска) прибавляли 20 мл спирта этилового 96% и интенсивно перемешивали в течение 10 минут, полученный раствор отфильтровывали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора спиртом этиловым 96% до метки (раствор А).

1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 1 мл спиртового раствора алюминия хлорида и доводили объем раствора спиртом этиловым 96% до метки. В результате комплексообразования исследуемый раствор окрашивался в ярко-желтый цвет. Через 40 минут снимали оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ 2000 при длине волны 390 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Для приготовления раствора сравнения

в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляли 1 мл раствора А, 1 каплю кислоты уксусной разведенной и доводили спиртом этиловым 96% до метки.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО дигидрокверцетина в тех же условиях.

Содержание суммы флавоноидов в фитогеле (в пересчете на дигидрокверцетин) вычисляли по формуле:

$$X, \% = \frac{A_x \cdot a_{ст} \cdot 100}{A_{ст} \cdot a_x},$$

где A_x , $A_{ст}$ – соответственно оптическая плотность анализируемого раствора и раствора СО дигидрокверцетина; $a_{ст}$ – масса дигидрокверцетина, взятая для приготовления раствора СО, г; a_x – масса фитогеля, взятая на анализ, г.

Дифференциальный спектр поглощения суммы флавоноидов фитогеля представлен на рис. 1.

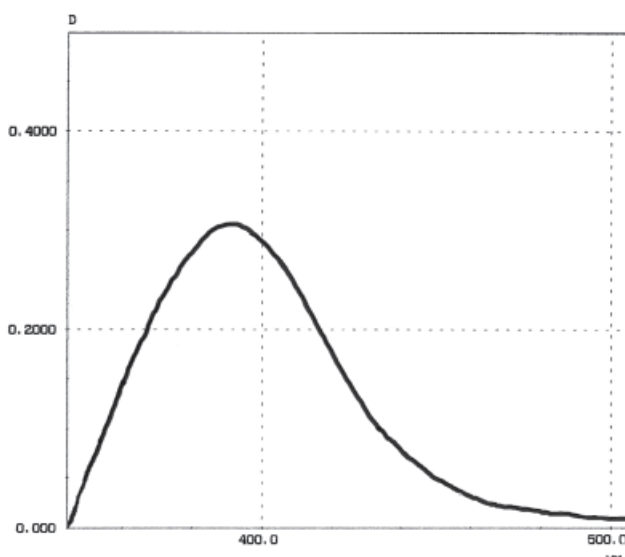


Рис. 1. Дифференциальный УФ-спектр поглощения суммы флавоноидов фитогеля

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин в фитогеле составило $0,72 \pm 0,04$ %.

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в фитогеле проводилась по линейности, сходимости и правильности [3].

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от ожидаемого содержания суммы флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин в фитогеле. Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличивали аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов. Далее строили градуировочный график зависимости оптической плотности

от массы фитогеля (табл. 1, рис. 2). Критерием приемлемости методики является коэффициент корреляции, величина которого должна быть не ниже 0,99 [3].

Как следует из представленного графика, все экспериментальные точки находятся вблизи линии тренда. Уравнение линейной регрессии имеет вид: $y = (3,08 \pm 0,13)x$. Значение коэффициента корреляции, вычисленное при помощи программы Microsoft Excel, составило 0,9939.

Сходимость методики определяли на образце фитогеля в 6 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое составляло 5,0% (табл. 2).

Таблица 1

Определение линейности методики количественного определения суммы флавоноидов в фитогеле

Масса фитогеля, г	0,0312	0,0461	0,0624	0,0714	0,0857	0,0999
Оптическая плотность А	0,086	0,136	0,192	0,213	0,277	0,306

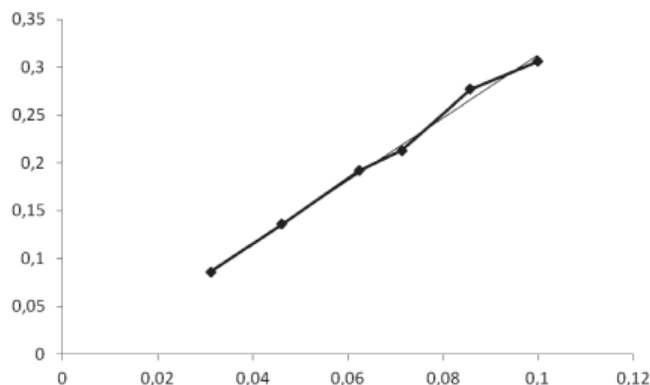


Рис. 2. Градуировочный график зависимости оптической плотности (А) от массы фитогеля

Таблица 2

Определение сходимости методики количественного определения суммы флавоноидов в фитогеле

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в фитогеле, %
1	0,68
2	0,70
3	0,74
4	0,72
5	0,77
6	0,69
Среднее значение	0,72
Относительное стандартное отклонение (RSD, %)	5,0

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин в растворах, полученных путем добавления определенного количества стандарта к исследуемому раствору. Критерием приемлемости является средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100 %, средняя величина которого должна находиться в пределах 100 ± 5 %. Результаты установления правильности спектрофотометрической методики определения суммы флавоноидов в фитогеле представлены в табл. 3.

В разработанной нами методике процент восстановления находился в пределах от 98,76 до 101,11 %, его средняя величина составила 100,06 % (табл. 3).

Таблица 3

Результаты установления правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в фитогеле методом добавок

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин, мг	Добавлено СО дигидрокверцетина, мг	Рассчитанное содержание, мг	Найденное содержание, мг	Выход, %
1,014	0,0525	1,0665	1,0691	100,24
1,014	0,0525	1,0665	1,0533	98,76
1,014	0,0525	1,0665	1,0709	100,41
1,014	0,1050	1,1190	1,1189	99,99
1,014	0,1050	1,1190	1,1192	100,02
1,014	0,1050	1,1190	1,1187	99,97
1,014	0,2100	1,2240	1,2244	100,03
1,014	0,2100	1,2240	1,2376	101,11
1,014	0,2100	1,2240	1,2237	99,98
Среднее значение выхода – 100,06 %				

Таким образом, правильность методики количественного определения суммы флавоноидов в фитогеле соответствует предъявляемым требованиям [3].

В ходе анализа установлено: методика легко воспроизводима, доступна, не требует дорогостоящих реактивов и позволяет объективно оценивать качество исследуемого фитогеля.

Выводы

1. Методом дифференциальной спектрофотометрии было установлено количественное содержание суммы флавоноидов в фитогеле.

2. Установлены параметры линейности, сходимости и правильности применяемой методики.

Список литературы

1. Актуальные проблемы стандартизации фитопрепаратов и растительного сырья для их производства / А.П. Богоявленский, П.Г. Алексюк, А.С. Турмагамбетова, В.Э. Березин // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 6 (часть 5). – С. 1184–1187.
2. Васякина, К.А. Репешок аптечный – перспективный сырьевой растительный источник гепатопротекторов / К.А. Васякина, А.В. Куркина // *Известия Самарского научного центра РАН*. – 2012. – Т.14, № 1(7). – С. 2184–2186.
3. Мешковский А.П. Валидация аналитических методов // *Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий: сборник*. – М., 2002. – С. 26–30.
4. Организационно-методические аспекты клинико-экспериментальных исследований новой БАД / А.А. Маркаржан, Т.Д. Даргаева, С.М. Николаев, А.Г. Мондодоев // *МЗ РФ Проблемы управления здравоохранения*. – М.: Изд. Профтек, 2003. – № 4 (11). – С. 83–88.
5. Mukeshwar Pandey, Mousumi Debnath, Shobit Gupta, Surender K. Chikara Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics // *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 27–37.

6. Simaan J.A. Herbal medicine, what physicians need to know // *Lebanese Med. J.* – 2009. – Vol. 57. – P. 215–217.

7. Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges // *Pure Appl. Chem.* – 2005. – Vol. 77, No 1. – P. 1–6.

References

1. Bogoyavlenskiy A.P., Alekseyuk P.G., Turmagambetova A.S., Berezin V. E. Aktualnye problemy standartizatsii fitopreparatov i rastitelnogo syrya dlya ikh proizvodstva // *Fundamentalnye issledovaniya*. 2013, no 6 (chast 5), pp. 1184–1187.
2. Vasyakina, K.A., Kurkina A.V. Repeshok aptechnyi – perspektivnyi syrevoi istochnik gepatoprotectorov. *Izvestia Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2012. Vol. 14, no. 1(7), pp. 2184–2186.
3. Meshkovskiy A.P. Validaciya analiticheskikh metodov. *Sovremennye trebovaniya k organizacii i deyatelnosti kontrolno-analicheskikh laboratoriy otdelov kontrolya kachestva farmatsevticheskikh predpriyatii: sbornik*. Moscow, 2002, pp. 26–30.
4. Markarjan A.A., Dargaeva T.D., Nikolaev S.M., Mondodoev A.G. Organizacionno-metodicheskie aspekty kliniko-eksperimental'nyh issledovaniy novoj BAD. *MZ RF Problemy upravleniya zdoravoohraneniya*. Moscow, Izd. Proftek, 2003, no. 4 (11), pp. 83–88.
5. Mukeshwar Pandey, Mousumi Debnath, Shobit Gupta, Surender K. Chikara Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2011. Vol. 3, no. 3, pp. 27–37.
6. Simaan J.A. Herbal medicine, what physicians need to know. *Lebanese Med. J.* 2009. Vol. 57, pp. 215–217.
7. Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges. *Pure Appl. Chem.* 2005. Vol. 77, no. 1, pp. 1–6.

Рецензенты:

Власова И.В., д.х.н., доцент, профессор кафедры аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского», г. Омск;

Андреева И.Н., д.фарм.н., профессор кафедры «Туризм», Институт сервиса и технологий, филиал, ФГОУ ВПО «ДГТУ», г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 17.10.2013.