



УДК 615.32

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ПИРЕТРУМА ДЕВИЧЬЕГО И ЕЁ ВАЛИДАЦИЯ

Д.А. КОНОВАЛОВ
Д.С. КОНОВАЛОВА

*Пятигорская государственная
фармацевтическая академия*

e-mail: konovalov_da@pochta.ru

Разработана методика количественного определения флавоноидов в траве пиетрума девичьего и дана ее валидация.

Ключевые слова: пиетрум девичий, флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия, валидация.

Пиетрум девичий (*Pyrethrum parthenium* (L.) Smith, сем. Asteraceae) – это популярное в последнее время за рубежом растение. Оно используется для профилактики и лечения мигрени. Основными биологически активными веществами травы пиетрума девичьего являются сесквитерпеновые лактоны и флавоноиды. Именно с данными классами природных соединений и связывают противовоспалительную, антимигренозную, противораковую, анальгетическую, фунгицидную и другие виды биологической активности, которые проявляет трава пиетрума девичьего [1, 2].

Отечественное сырье с научной точки зрения изучено мало, хотя в народной медицине растение применяется для лечения головных болей, артрита, ревматизма и других заболеваний, связанных с воспалительным процессом [2].

Целью работы является разработка методики дифференциальной спектрофотометрии позволяющей проводить оценку качества сырья пиетрума девичьего по содержанию флавоноидов.

Материалы и методы. Сырье пиетрума девичьего заготавливалось нами с 2009 по 2011 год с дикорастущих популяций, произрастающих на территории Кавказских Минеральных Вод.

Разработанная нами методика определения флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии основана на способности флавоноидов образовывать комплексы с алюминия (III) хлоридом. При этом наблюдается bathochromный сдвиг полосы поглощения флавоноидов от 330-350 к 390-410 нм в видимую область спектра.

В качестве стандарта использовали раствор стандартного образца (СО) рутина в 95% спирте этиловом.

Методика количественного определения: аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм. Около 1,0 (точная навеска) измельченной травы помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа с момента закипания спиртоводной смеси в колбе.

После охлаждения полученное извлечение фильтруют через беззольный бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят 70% спиртом этиловым до метки. Далее 3 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте этиловом, через 5 минут добавляют 0,2 мл раствора кислоты уксусной разведенной (33%). Объем раствора доводят до метки спиртом этиловым 95% и оставляют на 40 минут. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм, используя кювету с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3 мл извлечения и 0,2 мл раствора кислоты уксусной разведенной (33%), доведенный спиртом этиловым до метки в колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора комплекса СО рутина с алюминия хлоридом. Для этого в мерную колбу на 25 мл помещают 3 мл раствора СО рутина, прибавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте этиловом, через 5 минут добавляют 0,2 мл раствора кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводят до метки спиртом этиловым 95%, оставляют на 40 минут и измеряют оптическую плотность при длине волны 410 нм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор СО рутина, приготовленный в тех же условиях, только без добавления алюминия хлорида.

Расчет содержания суммы флавоноидов в траве пиетрума девичьего проводят в точках максимума оптического поглощения испытуемого извлечения и раствора СО рутина, обработанных алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в процентах в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:



$$x = \frac{A_x \times m_{cm} \times 100}{A_{cm} \times m_x \times (100 - W)} \times 100\%, \text{ где}$$

x – содержание суммы флавоноидов, в процентах;
 A_x – оптическая плотность извлечения, обработанного алюминия хлоридом;
 A_{cm} – оптическая плотность раствора комплекса СО рутина с алюминия хлоридом;
 m_x – масса сырья, г;
 m_{cm} – масса СО рутина, г;
 W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах (9,1%).

Результаты и их обсуждение. Статистическая обработка полученных результатов ($n=6, P=0,95$) представлена в табл. 1.

Содержание суммы флавоноидов в траве пиретрума девичьего в фазу конца бутонизации-начала цветения составляет $2,29 \pm 0,07\%$. Кроме того нами проводилось определение содержания флавоноидов в образцах травы пиретрума девичьего, заготовленных в разные годы (табл. 2).

Как видно из табл. 2, относительная погрешность определения (ϵ) не превышает 5%.

Таблица 1

Результаты определения суммы флавоноидов в траве пиретрума девичьего в фазу конца бутонизации-начала цветения

№ п/п	Навеска	Оптическая плотность	x_i^{**}	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	Метрологические характеристики $S_x = 0,069$ $S_{\bar{x}} = 0,028$ $\Delta x = 0,07$ $\epsilon = 3,06\%$
0*	0,0500	0,559	-	-	-	
1	1,0179	0,244	2,36	0,07	0,0049	
2	1,0912	0,248	2,24	0,05	0,0025	
3	0,9546	0,216	2,23	0,06	0,0036	
4	0,9986	0,238	2,35	0,06	0,0036	
5	1,1035	0,263	2,34	0,05	0,0025	
6	1,0065	0,226	2,21	0,08	0,0064	
Среднее значение, \bar{x}			2,29			
Сумма значений, $\sum (x_i - \bar{x})^2$					0,0235	

Примечание: * – СО рутина; ** – содержание (%) в пересчете на абсолютно-сухое сырье.

Таблица 2

Количественное определение флавоноидов в траве пиретрума девичьего, заготовленной в разные годы

Год заготовки	Навеска сырья, г	Оптическая плотность, A	Содержание флавоноидов, (%) x_i	Метрологические характеристики
2009	0,9735; 0,9463; 0,8519; 1,0486; 1,0368; 1,0094	0,248; 0,247; 0,207; 0,275; 0,268; 0,243	2,42; 2,47; 2,30; 2,49; 2,48; 2,29	$\bar{x} = 2,41$; $S_x = 0,091$; $S_{\bar{x}} = 0,037$ $\Delta x = 0,09$; $\epsilon = 3,73\%$
2010	1,0572; 0,9964; 1,0187; 1,0253; 1,1045; 0,9628	0,268; 0,247 0,236; 0,251; 0,265; 0,234	2,45; 2,40; 2,23; 2,37; 2,32; 2,35	$\bar{x} = 2,35$; $S_x = 0,075$; $S_{\bar{x}} = 0,031$ $\Delta x = 0,08$; $\epsilon = 3,40\%$
2011	1,0179; 1,0912; 0,9546; 0,9986; 1,1035; 1,0065	0,244; 0,248; 0,216; 0,238; 0,263; 0,226	2,36; 2,24; 2,23; 2,35; 2,34; 2,21	$\bar{x} = 2,29$; $S_x = 0,069$; $S_{\bar{x}} = 0,028$ $\Delta x = 0,07$; $\epsilon = 3,06\%$

Примечание: * – содержание (%) в пересчете на абсолютно-сухое сырье.

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов пиретрума девичьего.

Для подтверждения пригодности методики по контролю качества сырья пиретрума девичьего проводили ее валидационную оценку по параметрам линейность и точность (прецизионность на уровне повторяемости методики и правильность методом добавок).



Для разработки оптимальной методики была установлена область линейной зависимости оптической плотности от концентрации анализируемого вещества (суммы флавоноидов). Определение линейности проводили на 6 уровнях концентраций анализируемого извлечения (табл. 3, рис. 1). Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов травы пиретрума девичьего.

Таблица 3

Определение линейности зависимости оптической плотности от концентрации анализируемых веществ

С	0,0078	0,0113	0,017	0,0227	0,0283	0,0341
А	0,08	0,142	0,22	0,291	0,367	0,436

где С – концентрация суммы флавоноидов, г/мл; А – оптическая плотность.

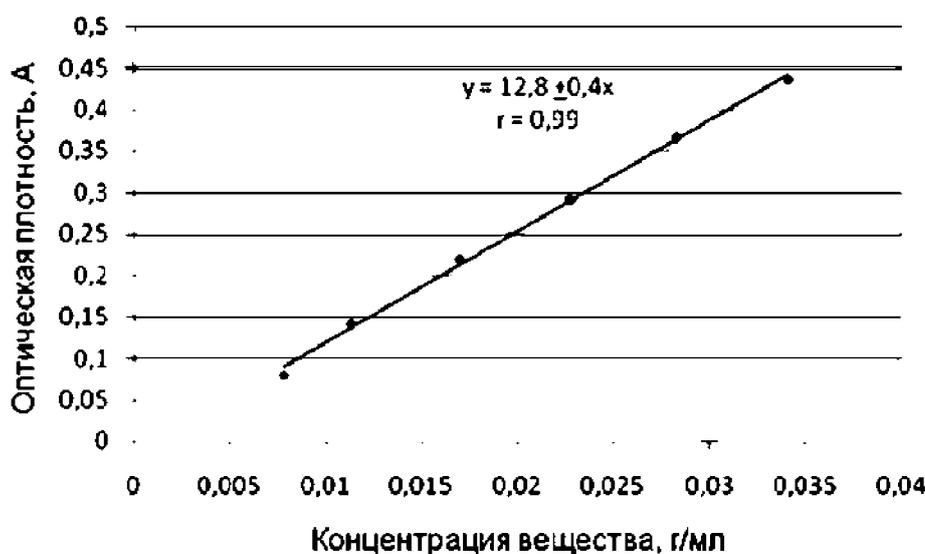


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов в извлечении из травы пиретрума девичьего

На рис. 1 видно, что почти все экспериментальные точки (за исключением первой), лежат на линии тренда. Следовательно, область линейной зависимости наблюдается при концентрациях 0,0113-0,0341 г/мл. Вычисление коэффициента корреляции проводили с помощью программы Microsoft Excel 2002. Величина коэффициента корреляции составила 0,99, что считается удовлетворительной корреляцией.

Определение прецизионности методики (на уровне повторяемости) проводили на одном образце сырья на шести параллельных измерениях. Результаты определений представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты установления прецизионности на уровне повторяемости (сходимости) валидируемой методики

№ опыта	Навеска сырья, г	Оптическая плотность, А	x_i^*	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	Метрологические характеристики $S_x = 0,058$ $S_{\bar{x}} = 0,024$ $\Delta x = 0,066$ $\varepsilon = 3,13\%$ $RSD = 2,75\%$
0.	0,0500	0,603	-	-	-	
1.	0,9863	0,226	2,09	0,02	0,0004	
2.	1,0911	0,258	2,15	0,04	0,0016	
3.	0,9658	0,214	2,02	0,09	0,0081	
4.	1,1042	0,265	2,19	0,08	0,0064	
5.	0,9947	0,230	2,11	0	0	
6.	1,0234	0,234	2,09	0,02	0,0004	
Среднее значение \bar{x}			2,11			
Сумма значений $\sum (x_i - \bar{x})^2$					0,0169	

Примечание: * – содержание (%) в пересчете на абсолютно-сухое сырье.

Относительное стандартное отклонение равно 2,75%, это говорит о том, что методика позволяет получить удовлетворительные по сходимости результаты.



Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления стандартного образца (СО рутин) к навеске сырья. Результаты определений представлены в табл. 5.

Таблица 5

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

№ п/п	Навеска сырья, г	Добавка рутин, г	A*	Содержание** (%)		R, %	Метрологические характеристики
				Расчетное	Полученное		
1.	1,0062	0	0,246	2,36	-	-	R _{ср} = 101,40 S _x = 2,70 S _{x̄} = 1,02 Δx = 2,50 ε = 2,47% RSD = 2,66%
2.	1,0143	0,0051	0,292	2,87	2,78	96,86	
3.	0,9851	0,0112	0,350	3,49	3,43	98,28	
4.	0,9864	0,0171	0,433	4,08	4,24	103,92	
5.	0,9877	0,0275	0,538	5,12	5,27	102,93	
6.	1,1095	0,0294	0,626	5,30	5,46	103,01	
7.	1,0238	0,0365	0,655	6,02	6,18	102,66	
8.	0,9891	0,0379	0,642	6,12	6,29	102,11	

Примечание: * – оптическая плотность 0,05% раствора СО рутин 0,569;

** – содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье; A – значение оптической плотности образцов сырья; R – открываемость.

Критерий приемлемости – средний процент открываемости, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 97-103% (согласно рекомендациям американской ассоциацией аналитической химии (АОАС) при содержании анализируемого вещества больше 1%). В разработанной методике средний процент открываемости составил 101,40%, а относительное стандартное отклонение не превышает 3%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа.

Выводы. Разработанная методика позволяет определить содержание суммы флавоноидов в траве пиетрума девичьего в присутствии других соединений, проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. А проведенная валидационная оценка методики свидетельствует о её пригодности для контроля качества сырья пиетрума девичьего.

Литература

1. Knight, D.W. Feverfew: chemistry and biological activity / Knight D.W. // Nat. Prod. Rep. – 1995. – Vol. 12, N 3. – P. 271-276.
2. Anti-inflammatory activity of parthenolide-depleted Feverfew (Tanacetum parthenium) / Sur R. [et al.] // Inflammopharmacology. – 2009. – Vol. 17, N 1. – P. 42-49.
3. Коновалова, Д.С. Сесквитерпеновые лактоны пиетрума девичьего как биологически активные вещества (обзор) / Д.С. Коновалова, Д.А. Коновалов // Экология человека. – 2008. – № 3. – С. 3-7.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF QUANTITATIVE METHOD OF DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN PYRETHRUM PARTHENIUM HERB

**D.A. KONOVALOV
D.S. KONOVALOVA**

*Pyatigorsk State
Pharmaceutical Academy*

e-mail: konovalov_da@pochta.ru

The technique of quantitative definition of flavonoids in Pyrethrum parthenium herb is developed and given it's validation.

Key words: Pyrethrum parthenium, flavonoids, spectrophotometry, validation.