

## Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края

Г. Р. Кутателадзе<sup>1\*</sup>, Л. М. Федосеева<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 656038, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40

\*Контактное лицо: Кутателадзе Георгий Родионович. E-mail: goha-kut@mail.ru

Статья получена: 12.12.2018. Статья принята к печати: 21.01.2019

### Резюме

**Введение.** Щавель кислый (*Rumex acetosa* L.) – двулетнее травянистое растение из семейства Гречишные (*Polygonaceae* L.). Ранее изучен состав фенольных соединений спиртового извлечения и эфирной, этилацетатной, бутанольной фракций щавеля кислого травы и обнаружены флавоноиды группы флавонола. Из литературы известно, что одной из групп биологически активных соединений, обладающих противовоспалительным действием, являются флавоноиды. Следовательно, актуальной задачей является оценка количественного содержания флавоноидов в щавеля кислого траве.

**Цель.** Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве.

**Материалы и методы.** Комплекс флавоноидов травы щавеля кислого включает рутин, поэтому в качестве стандарта для расчетов суммы флавоноидов использовали стандартный образец (СО) рутина. Готовили спиртовое извлечение щавеля кислого травы и раствор СО рутина. Проводили реакцию комплексообразования с алюминия хлоридом. Полученные растворы исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Сравнивали спектральные характеристики исследуемого и стандартного образцов. Изучали влияние условий экстракции на выход флавоноидов из сырья: экстрагент, размер частиц сырья, соотношение «сырье – экстрагент», температура, кратность и продолжительность экстракции. В качестве экстрагента использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации (20%, 40%, 70%, 90%). Подбирали оптимальные условия для проведения реакции комплексообразования (время реакции комплексообразования, соотношение «аликвота – алюминия хлорида раствор спиртовой»). Проводили валидацию методики согласно ОФС.1.1.0012.15 ГФ XIII издания и общепринятым методикам по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность.

**Результаты и обсуждение.** Определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из сырья (трехкратная экстракция спиртом этиловым 70% на водяной бане, соотношение «сырье – экстрагент» – 1:30 в течении 30 минут, размер частиц сырья – 2,0 мм). Подобраны условия проведения реакции комплексообразования (соотношение «аликвота : алюминия хлорида раствор спиртовой» – 1:2,5, комплексообразователь – раствор алюминия хлорида 5% спиртовой, появление устойчивой окраски раствора через 40 минут). При проведении валидации разработанной методики установлено, что валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости. При анализе сырья, заготовленного на территории Алтайского края в разные годы, установлено, что содержание флавоноидов в щавеля кислого траве колеблется от 0,596 до 0,632%.

**Заключение.** Определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из сырья, подобраны условия проведения реакции комплексообразования, проведена валидация методики. Установлено количественное содержание флавоноидов в пересчете на рутин в щавеля кислого траве, заготовленном на территории Алтайского края в разные годы.

**Ключевые слова:** щавель кислый, трава, количественное определение, флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия, рутин, валидация.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Кутателадзе Г. Р., Федосеева Л. М. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории алтайского края. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 80–86.

## Research in the Development and Validation of the Method of Quantitative Determination of Flavonoids in the Common Sorrel Herba, Gathered in the Altai Territory

G. R. Kutateladze<sup>1\*</sup>, L. M. Fedoseeva<sup>1</sup>

1 – Altai State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 40, Lenina str., Barnaul, 656038, Russia

\*Corresponding author: Georgij R. Kutateladze. E-mail: goha-kut@mail.ru

Received: 12.12.2018. Accepted: 21.01.2019

### Abstract

**Introduction.** Common sorrel (*Rumex acetosa* L.) is a biennial herb from the Buckwheat family (*Polygonaceae* L.). In our previously studies of phenolic compounds composition of alcohol extraction and ethereal, ethyl acetate, butanol fractions of common sorrel herba and flavonoids of the flavonol group was found. From the literature sources it is known that flavonoids are one of the groups of biologically active compounds with anti-inflammatory action. In this regard, the actual task is to assess the quantitative content of flavonoids in common sorrel herba.

**Aim.** Is the development and validation of a method for the quantitative determination of flavonoids in common sorrel herba.

**Materials and methods.** It has been established that the flavonoid complex of common sorrel herba includes rutin, therefore, the reference sample (RS) rutin was used as a standard for calculating the amount of flavonoids. Alcohol extract of common sorrel herba and a solution of rutin RS were prepared. The complexation reaction with aluminum chloride was carried out. The resulting solutions were investigated by the method of differential spectrophotometry. The spectral characteristics of the test and standard samples were compared. Then we studied the effect of extraction conditions on the yield of flavonoids from the raw material: the extractant, the particle size of the raw material, the ratio of «raw material – extractant», temperature, frequency and duration of extraction. Purified water and ethyl alcohol of various concentrations (20%, 40%, 70%, 90%) were used as the extractant. Next, carried out the selection of the optimal conditions for the complexation reaction (the complexation reaction time, the ratio of «aliquot – aluminum chloride alcohol solution»). The method was validated according to GPM.1.1.0012.15 of the State Pharmacopoeia (SF) XIII edition and generally accepted methods for the following indicators: specificity, analytical field, linearity, accuracy, precision.

**Results and discussion.** The optimal parameters for extracting flavonoids from raw materials were determined (threefold extraction with ethyl alcohol 70% in a water bath, the ratio of «raw material – extractant» – 1:30 for 30 minutes, the particle size of the raw material – 2.0 mm). The conditions for the complexation reaction were selected (the ratio «aliquot: aluminum chloride alcohol solution» – 1: 2.5, the complexing agent – aluminum chloride solution 5% alcohol, the appearance of a stable solution color after 40 minutes). When carrying out the validation of the developed method, it was established that the validation characteristics under study are within the acceptance criteria. When analyzing the raw materials harvested in the Altai Territory in different years, it was found that the content of flavonoids in common sorrel herba ranges from 0,596 to 0,632%.

**Conclusion.** The optimal parameters of extraction of flavonoids from raw materials were determined, the conditions for the complexation reaction were selected, and the developed method was validated. The quantitative content of flavonoids in terms of rutin in sorrel sour grass harvested in the Altai Territory in different years has been established.

**Keywords:** common sorrel, herba, quantitative determination, flavonoids, differential spectrophotometry, rutin, validation.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Kutateladze G. R., Fedoseeva L. M. Research in the development and validation of the method of quantitative determination of flavonoids in the common sorrel herba, gathered in the altai territory. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 80–86.

## ВВЕДЕНИЕ

Щавель кислый (*Rumex acetosa* L.) – двулетнее травянистое растение из семейства Гречишные (*Polygonaceae* L.). Трава являлась фармакопейным растением на территории Англии и использовалась как противовоспалительное средство [10, 11, 13, 14]. Комплекс биологически активных соединений (БАС) щавеля кислого травы разнообразен и включает флавоноиды, фенолокислоты, конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества, органические кислоты, что свидетельствует о целесообразности изучения и внедрения данного вида сырья в научную медицину РФ [9, 12, 15].

Ранее нами изучен состав фенольных соединений спиртового извлечения и эфирной, этилацетатной, бутанольной фракций щавеля кислого травы и обнаружены фенолокислоты, флавоноиды группы флавонола, антраценпроизводные группы хризацина [7]. Из литературных данных известно, что одной из групп биологически активных соединений, обладающих противовоспалительным действием, являются флавоноиды [1, 4].

В связи с вышесказанным, является актуальным провести определение количественного содержания флавоноидов в траве щавеля кислого.

Цель – определение условий экстракции флавоноидов, разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – щавеля кислого трава, заготовленная на территории Алтайского края в 2016–2018 гг. в фазу цветения.

Установлено, что комплекс флавоноидов травы щавеля кислого включает рутин, поэтому в качестве стандарта для расчетов суммы флавоноидов использовали стандартный образец (СО) рутин («Sigma-Aldrich», каталожный номер R5143, содержание рутина  $\geq 94\%$  (HPLC), годен до 03.2019) [7]. Готовили спиртовое извлечение щавеля кислого травы и раствор стандартного образца рутина. Проводили реакцию комплексо-

образования с раствором алюминия хлорида 5% спиртовым (ч.д.а., ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Полученные растворы исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Сравнивали спектральные характеристики исследуемого и стандартного образцов.

Целесообразность использования данного метода объясняется характером дифференциального спектра комплексов флавоноидов с селективными максимумами поглощения при 390–410 нм. Другие группы фенольных соединений не дают характерных максимумов в данной области. При использовании в качестве раствора сравнения раствора извлечения без добавления реактивов исключается влияние сопутствующих фенольных соединений на результаты анализа [5, 6]. Для предотвращения возможности ионизации флавоноидов к исследуемым пробам добавляли кислоты уксусной раствор 3% (х.ч., ЗАО «ВЕКТРОН», Россия) [6].

Оптическую плотность исследуемых растворов, растворов стандартного образца рутина измеряли на спектрофотометре «Schimadzu UV-mini 1240» (Япония) при длине волны 410 нм, что соответствует максимуму поглощения комплексного соединения рутина с алюминия хлоридом.

Далее изучали влияние условий экстракции на выход флавоноидов из травы щавеля кислого: экстрагент, размер частиц сырья, соотношение «сырье – экстрагент», температура, кратность и продолжительность экстракции. В качестве экстрагента использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации (20, 40, 70, 90%). В предыдущих исследованиях нами установлено, что в щавеля кислого траве преобладают гликозиды флавоноидов [7]. Известно, что с увеличением концентрации спирт этиловый в меньшей степени извлекает гликозиды флавоноидов, в большей степени – агликоны. По этой причине этиловый 95% для исследований не использовался.

Затем подбирали оптимальные условия для проведения реакции комплексообразования (время реакции комплексообразования, соотношение «аликвота – алюминия хлорида раствор спиртовой»).

Проводили валидацию методики согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи XIII издания и общепри-

нятым методикам по следующим показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность [2, 3, 8].

Специфичность (селективность) методики определяли путем анализа дифференциальных спектров поглощения раствора стандартного образца, извлечения из травы щавеля кислого и раствора «плацебо». Критерием приемлемости специфичности методики считается совпадение максимумов поглощения раствора СО и извлечения из травы щавеля кислого и отсутствием максимумов в спектре поглощения раствора «плацебо».

Линейность методики устанавливали путем анализа растворов 11 уровней концентрации (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300%) от теоретического содержания суммы флавоноидов (в пересчете на рутин, %) в щавеля кислого траве.

Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов, составляли уравнение регрессии. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции ( $r$ ), который должен быть не менее 0,99. При условии, что его значение близко к единице, то совокупность анализируемых данных можно описать прямой линией.

Аналитическую область методики определяли по интервалу экспериментальных данных полученных и удовлетворяющих линейную модель. Критерием приемлемости является диапазон применения аналитической методики, который должен составлять 80–120% от номинального содержания флавоноидов в сырье.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в извлечениях, полученных путем добавления необходимого количества раствор СО рутин 0,05%.

Критерием приемлемости правильности методики является открываемость ( $R$ , %), скорректированная на 100%, средняя величина которой должна быть в пределах  $100 \pm 5\%$ , относительное стандартное отклонение ( $RSD$ , %).

Повторяемость (сходимость) методики проверяли путем приготовления спиртового извлечения травы щавеля кислого из 6 навесок сырья в пределах короткого промежутка времени, с применением одинакового набора реактивов и с участием одного и того же исследователя. Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность определяли, как описано выше в условиях той же лаборатории, но в разные дни и с участием разных исследователей. Критерий приемлемости выражается величиной относительного стандартного отклонения ( $RSD$ , %), которое не должно превышать 2% и 5% соответственно.

Статистическую обработку результатов исследований провели согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ XIII с использованием ПО «Microsoft Excel», статистического пакета «Statistica 7.0» [2].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе дифференциальных спектров поглощения спиртового извлечения щавеля кислого травы и рутина с алюминия хлорида раствором спиртовым установлено, что полученные спектры совпадали с максимумом поглощения при 409 нм (рисунок 1).

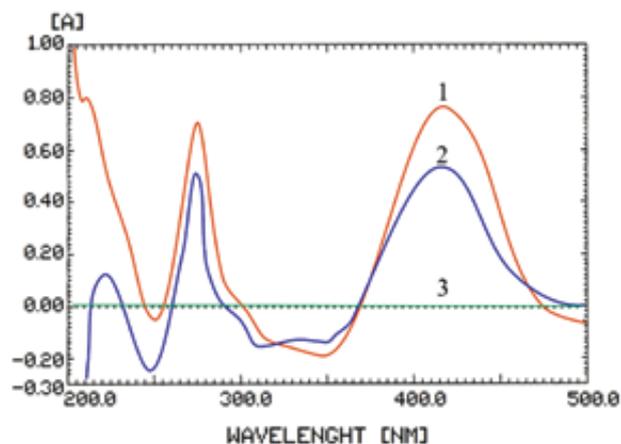


Рисунок 1. Дифференциальный УФ-спектр комплекса спиртового извлечения из травы щавеля кислого (2) и СО рутина (1) с алюминия хлоридом; УФ – спектр раствора «плацебо» (3). Примечание: Wavelength (nm) – длина волны (нм), [A] – оптическая плотность

Figure 1. Alcoholic extraction from the common sorrel herb (2) and rutin RS (1) with aluminum chloride complex's differential UV spectrum; The UV spectrum of the placebo solution (3)

В ходе подбора оптимального экстрагента для извлечения суммы флавоноидов щавеля кислого травы использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации (от 20 до 90%). Экстракцию проводили с обратным холодильником на кипящей водяной бане трижды по 30 мин. Далее полученные извлечения исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Выход флавоноидов в пересчете на рутин при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70% составил 0,63%. Данный растворитель применяли для дальнейших исследований.

Установлено, что наиболее полная экстракция флавоноидов из щавеля кислого травы достигается при трехкратной экстракции спиртом этиловым 70% на водяной бане ( $t^{\circ}\text{C}=100$ ) при соотношении «сырье – экстрагент» – 1:30 в течении 30 минут со степенью измельчения сырья 2,0 мм (таблица 1).

Оптимальные условия комплексообразования: соотношение «аликвота : алюминия хлорида раствор спиртовой» – 1:2,5 при использовании в качестве комплексообразователя раствора алюминия хлорида 5% спиртового, появление устойчивой окраски раствора через 40 минут (таблица 2).

На основании проведенных исследований разработана методика количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве:

Таблица 1. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из щавеля кислого травы

Table 1. The influence of various factors on the completeness of the extraction of flavonoids from common sorrel herb

| Экстрагент                              | Размер частиц сырья, мм | Соотношение «сырье-экстрагент» | Продолжительность экстракции, мин | Кратность экстракции | Температура, °C | Сумма флавоноидов (в пересчете на рутин), % |             |                |
|---|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------|---|-------------|----------------|
|   |                         |                                |                                   |                      |                 | $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$                | S $\bar{x}$ | $\epsilon$ , % |
| <b>Экстрагент</b>                       |                         |                                |                                   |                      |                 |   |             |                |
| Вода очищенная                          | 1-2                     | 1:30                           | 30                                | 3                    | 100             | 0,450±0,012                                 | 0,010       | 2,67           |
| Спирт этиловый 20%                      |                         |                                |                                   |                      |                 | 0,492±0,008                                 | 0,012       | 1,63           |
| Спирт этиловый 40%                      |                         |                                |                                   |                      |                 | 0,591±0,005                                 | 0,042       | 0,85           |
| Спирт этиловый 70%                      |                         |                                |                                   |                      |                 | 0,630±0,004                                 | 0,046       | 0,63           |
| Спирт этиловый 90%                      |                         |                                |                                   |                      |                 | 0,560±0,007                                 | 0,053       | 1,25           |
| <b>Размер частиц сырья</b>              |                         |                                |                                   |                      |                 |   |             |                |
| Спирт этиловый 70%                      | 0,1-0,5                 | 1:30                           | 30                                | 3                    | 100             | 0,451±0,004                                 | 0,051       | 0,89           |
|   | 1-2                     |                                |                                   |                      |                 | 0,630±0,005                                 | 0,053       | 0,79           |
|   | 2,5-3                   |                                |                                   |                      |                 | 0,592±0,004                                 | 0,047       | 0,67           |
|   | 3,5-5                   |                                |                                   |                      |                 | 0,542±0,008                                 | 0,058       | 1,47           |
| <b>Соотношение «сырье – экстрагент»</b> |                         |                                |                                   |                      |                 |   |             |                |
| Спирт этиловый 70%                      | 1 – 2                   | 1:20                           | 30                                | 3                    | 100             | 0,570±0,008                                 | 0,054       | 1,40           |
|   |                         | 1:30                           |                                   |                      |                 | 0,631±0,004                                 | 0,054       | 0,63           |
|   |                         | 1:50                           |                                   |                      |                 | 0,601±0,010                                 | 0,075       | 1,66           |
|   |                         | 1:70                           |                                   |                      |                 | 0,560±0,009                                 | 0,068       | 1,61           |
|   |                         | 1:90                           |                                   |                      |                 | 0,541±0,007                                 | 0,048       | 1,29           |
| <b>Температура</b>                      |                         |                                |                                   |                      |                 |   |             |                |
| Спирт этиловый 70%                      | 1 – 2                   | 1:30                           | 30                                | 3                    | 20              | 0,290±0,003                                 | 0,044       | 1,03           |
|   |                         |                                |                                   |                      | 40              | 0,314±0,007                                 | 0,065       | 2,23           |
|   |                         |                                |                                   |                      | 60              | 0,436±0,007                                 | 0,032       | 1,60           |
|   |                         |                                |                                   |                      | 80              | 0,659±0,005                                 | 0,076       | 0,76           |
|   |                         |                                |                                   |                      | 100             | 0,630±0,006                                 | 0,065       | 0,95           |
| <b>Кратность экстракции</b>             |                         |                                |                                   |                      |                 |   |             |                |
| Спирт этиловый 70%                      | 1 – 2                   | 1:30                           | 30                                | 1                    | 100             | 0,531±0,009                                 | 0,075       | 1,69           |
|   |                         |                                |                                   | 2                    |                 | 0,540±0,008                                 | 0,074       | 1,48           |
|   |                         |                                |                                   | 3                    |                 | 0,631±0,006                                 | 0,043       | 0,95           |
|   |                         |                                |                                   | 4                    |                 | 0,630±0,010                                 | 0,042       | 0,96           |
| <b>Продолжительность экстракции</b>     |                         |                                |                                   |                      |                 |   |             |                |
| Спирт этиловый 70%                      | 1 – 2                   | 1:30                           | 20                                | 3                    | 100             | 0,560±0,006                                 | 0,064       | 1,07           |
|   |                         |                                | 30                                |                      |                 | 0,632±0,010                                 | 0,046       | 1,58           |
|   |                         |                                | 40                                |                      |                 | 0,658±0,009                                 | 0,056       | 1,37           |
|   |                         |                                | 50                                |                      |                 | 0,630±0,007                                 | 0,048       | 1,11           |
|   |                         |                                | 60                                |                      |                 | 0,630±0,006                                 | 0,054       | 0,95           |

Около 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически перемешивая. Охлажденное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляют 30 мл спирта этилового 70%. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруют

извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл раствора А испытуемого раствора, 5 мл алюминия хлорида раствора 5% спиртового, доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, со-

стоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора и 1 мл кислоты уксусной раствора 3%, доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО рутина.

**Таблица 2. Влияние различных факторов на полноту образования комплекса флавоноидов щавеля кислого травы с алюминия хлоридом**

**Table 2. The influence of various factors on the completeness of the formation of a complex of flavonoids in common sorrel herb with aluminum chloride**

| Условие проведения реакции                                  |       | Сумма флавоноидов (в пересчете на рутин), % |             |                |
|---|-------|---|-------------|----------------|
|   |       | $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$                | S $\bar{x}$ | $\epsilon$ , % |
| Концентрация алюминия хлорида раствора спиртового, %        | 2     | 0,543±0,015                                 | 0,056       | 2,76           |
|   | 3     | 0,550±0,007                                 | 0,061       | 1,27           |
|   | 4     | 0,581±0,015                                 | 0,075       | 2,58           |
|   | 5     | 0,630±0,004                                 | 0,054       | 0,63           |
| Соотношение «аликвота : алюминия хлорида раствор спиртовой» | 1:0,5 | 0,411±0,010                                 | 0,051       | 2,43           |
|   | 1:1   | 0,450±0,015                                 | 0,042       | 3,33           |
|   | 1:1,5 | 0,511±0,008                                 | 0,038       | 1,56           |
|   | 1:2   | 0,590±0,007                                 | 0,053       | 1,19           |
|   | 1:2,5 | 0,630±0,005                                 | 0,037       | 0,79           |
| Продолжительность комплексообразования, мин                 | 20    | 0,524±0,010                                 | 0,098       | 1,91           |
|   | 30    | 0,598±0,004                                 | 0,086       | 0,67           |
|   | 40    | 0,630±0,004                                 | 0,075       | 0,63           |
|   | 50    | 0,630±0,010                                 | 0,100       | 1,59           |
|   | 60    | 0,630±0,008                                 | 0,064       | 1,27           |

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где А – оптическая плотность раствор Б испытуемого раствора; А<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора Б СО рутина; а – навеска сырья, г; а<sub>0</sub> – навеска СО рутина, г; Р – содержание основного вещества в СО рутина, %; W – влажность сырья, %.

Разработка методики количественного определения предусматривает проведение валидации. При проведении валидации методики количественного определения суммы флавоноидов щавеля кислого травы оценивали следующие показатели: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность.

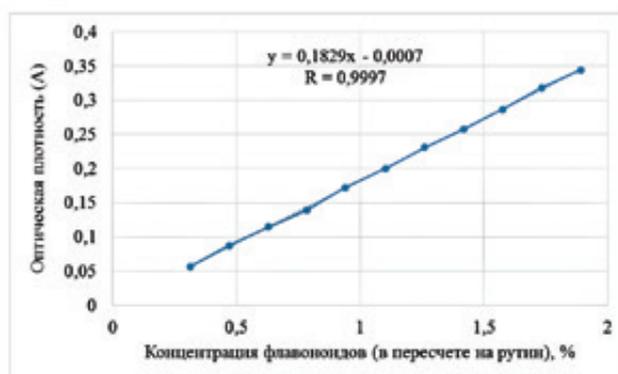
В процессе определения специфичности снимали дифференциальные спектры продуктов реакции флавоноидов исследуемого извлечения, СО рутина с алюминия хлоридом и спектры поглощения раствора «плацебо» (спирт этиловый 70%).

Специфичность методики подтверждалась совпадением максимумов поглощения раствора СО и извлечения из травы щавеля кислого (имеют максимумы

поглощения при длине волны 410 нм), а также отсутствием максимумов в спектре поглощения раствора «плацебо» (рисунок 1).

Для оценки линейности отбирали аликвоты извлечения объемом 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 мл. Определяли количественное содержание суммы флавоноидов в полученных растворах в соответствии с валидируемой методикой.

Строили график зависимости оптической плотности растворов от количественного содержания суммы флавоноидов (рисунок 2). Уравнение регрессии графика имеет следующий вид:  $y = 0,1829x - 0,0007$ . Значение коэффициента корреляции стремится к единице ( $r = 0,9997$ ), что свидетельствует о наличии линейной зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов в исследуемых растворах в пределах аналитической области методики.



**Рисунок 2. График зависимости оптической плотности от содержания суммы флавоноидов (в пересчете на рутин, %) в извлечении из травы щавеля кислого**

**Figure 2. Graph of absorbance in dependence to flavonoid content (in terms of rutin,%) in extracting of common sorrel herb**

Аналитическая область методики находится в пределах линейной зависимости и составляет 50–300% от номинального содержания флавоноидов в сырье, что удовлетворяет рефератным значениям (80–120%)

Для оценки правильности методики определяли количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных с помощью добавления 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл раствора СО рутина к исследуемому извлечению. На каждом уровне концентраций определяли количественное содержание суммы флавоноидов в трёх пробах в соответствии с валидируемой методикой. Границы открываемости методики находятся в пределах 98,83–100,20%, средняя величина открываемости составила 99,39%. Относительное стандартное отклонение составляет 0,35%, что свидетельствует о высокой степени соответствия между значением расчётного и полученного содержания суммы флавоноидов в исследуемых образцах (таблица 3).

Таблица 3. Результат оценки правильности методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве методом дифференциальной спектрофотометрии

Table 3. The result of the accuracy assessment of the method for quantitative determination of flavonoids in common sorrel herb by differential spectrophotometry

| № п/п | Исходное содержание рутина, мг | Добавлено СО рутина, мг | Ожидаемое содержание, мг | Полученное содержание, мг | Открываемость, % | Метрологические характеристики   |
|-------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|--|
| 1     | 0,630                          | 0,120                   | 0,7560                   | 0,7470                    | 98,88            | $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 99,39 \pm 0,35$ ;<br>$S\bar{x} = 0,16\%$ ;<br>$RSD = 0,35\%$ |
| 2     |                                |                         |                          | 0,7550                    | 99,84            |  |
| 3     |                                |                         |                          | 0,7540                    | 99,68            |  |
| 4     | 0,630                          | 0,252                   | 0,8820                   | 0,8720                    | 98,83            |  |
| 5     |                                |                         |                          | 0,8760                    | 99,36            |  |
| 6     |                                |                         |                          | 0,8770                    | 99,47            |  |
| 7     | 0,630                          | 0,378                   | 1,008                    | 1,0100                    | 100,20           |  |
| 8     |                                |                         |                          | 0,9970                    | 98,91            |  |
| 9     |                                |                         |                          | 1,0020                    | 99,40            |  |

Прецизионность валидируемой методики оценивали в двух вариантах. Повторяемость (сходимость) методики проверяли путем приготовления спиртового извлечения травы щавеля кислого из 6 навесок сырья в соответствии с валидируемой методикой, в пределах короткого промежутка времени, с применением одинакового набора реактивов и с участием одного и того же исследователя. Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность определяли, как описано выше в условиях той же лаборатории, но в разные дни и с участием разных исследователей.

Из данных таблицы 4 следует, что величина относительного стандартного отклонения результатов при оценке повторяемости равняется 1,1% (не превышает 2%), при оценке промежуточной прецизионности – 0,71% (не превышает 5%), что свидетельствует о прецизионности методики.

В ходе исследования установлено, что методика количественного определения специфична, зависимость аналитического сигнала (оптической плотности) от концентрации флавоноидов линейна, величины показателей прецизионности и правильности не превышают рекомендуемых значений валидности методики.

При анализе сырья, заготовленного на территории Алтайского края в разные годы, по разработанной методике установлено, что содержание флавоноидов в щавеля кислого траве колеблется от 0,596 до 0,632% (таблица 5).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Подобраны оптимальные условия и предложена методика определения суммы флавоноидов с использованием в качестве стандартного образца рутина. В ходе работы установлено, что наиболее полная экстракция флавоноидов из щавеля кислого травы достигается при трехкратной экстракции спиртом

этиловым 70%, соотношение «сырье – экстрагент» – 1:30 в течении 40 минут с размером частиц сырья 2,0 мм.

Таблица 4. Результат оценки прецизионности методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве методом дифференциальной спектрофотометрии

Table 4. The result of the assessment of the precision of the method for the quantitative determination of flavonoids in common sorrel herb by the method of differential spectrophotometry

| № п/п  | Масса навески | Исследователь | Содержание флавоноидов (в пересчете на рутин), % | Метрологические характеристики  |
|--|---------------|---------------|--|---|
| <b>Повторяемость (сходимость)</b>                        |               |               |  |   |
| 1  | 1,221         | №1            | 0,616  | $P=95\%$ , $n=6$ , $f=5$ ,<br>$t(P,f) = 2,57$ ,<br>$\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 0,624 \pm 0,01\%$ ,<br>$S\bar{x} = 0,007$ , $\epsilon = 1,6\%$ ,<br>$RSD = 1,1\%$    |
| 2  | 1,095         | №1            | 0,621  |   |
| 3  | 1,324         | №1            | 0,627  |   |
| 4  | 1,215         | №1            | 0,635  |   |
| 5  | 1,078         | №1            | 0,618  |   |
| 6  | 1,134         | №1            | 0,624  |   |
| <b>Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность</b> |               |               |  |   |
| 7  | 0,998         | №1            | 0,628  | $P=95\%$ , $n=6$ , $f=5$ ,<br>$t(P,f) = 2,57$ ,<br>$\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 0,628 \pm 0,005\%$ ,<br>$S\bar{x} = 0,004$ , $\epsilon = 0,80\%$ ,<br>$RSD = 0,71\%$ |
| 8  | 1,102         | №1            | 0,634  |   |
| 9  | 1,351         | №1            | 0,631  |   |
| 10   | 1,062         | №2            | 0,627  |   |
| 11   | 1,265         | №2            | 0,629  |   |
| 12   | 0,984         | №2            | 0,621  |   |

Таблица 5. Количественное содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин и на абсолютно сухое сырье, %) в щавеля кислого траве в разные годы заготовленной на территории Алтайского края

Table 5. The quantitative content of the flavonoids amount (in terms of rutin and on basis of absolutely dry raw materials, %) in common sorrel herb, harvested in the Altai Territory in different years

| Год заготовки | Метрологические характеристики (n=5; P=95%; tp=2,78) |       |                |
|---------------|--|-------|----------------|
|               | $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$                         | Sx    | $\epsilon$ , % |
| 2016          | 0,630 $\pm$ 0,012                                    | 0,065 | 1,90           |
| 2017          | 0,632 $\pm$ 0,010                                    | 0,070 | 1,58           |
| 2018          | 0,596 $\pm$ 0,015                                    | 0,084 | 2,51           |

2. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в щавеля кислого траве методом дифференциальной спектрофотометрии. Доказано, что предложенная методика количественного определения флавоноидов валидна по показателям специфичность, линейность, аналитическая область методики, прецизионность, правильность и может быть использована для количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве.
3. Сумма флавоноидов (в пересчете на рутин) в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края имеет сопоставимые значения и составляет 0,596–0,632%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Азарова О. В., Галактионова Л. П. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия. *Химия растительного сырья*. 2012; 4: 61–78.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М., 2015; 1: 1470. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/)
3. Евдокимова О. В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы. *Фармация*. 2008; 7: 14–17.
4. Зверев Я. Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Антиоксидантная и противовоспалительная активность. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017; 15(4): 5–13. DOI: 10.17816/RCF1545-13
5. Куркина А. В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара: ООО «Офорт». 2012; 290 с.
6. Сорокина А. А., Марахова А. И., Станишевский Я. М., Ковалева Т. Ю. Фотометрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: монография. М.: РУДН. 2015: 155.
7. Федосеева Л. М., Кутателадзе, Г. Р. Изучение некоторых фенольных соединений надземной части щавеля кислого, произрастающего на территории Алтайского края. *Химия растительного сырья*. 2017; 4: 91–96. DOI: 10.14258/jcprm.2017041861.
8. Эрмер И., Миллер Д. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучшей практики. М.: *Группа компаний «Виалек»*, 2013: 512.
9. Bicker J., Petereit F., Hensel A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia*. 2009; 80 (8): 483–495. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.08.015.
10. Castle T. *Lexicon Pharmaceuticum or a pharmaceutical dictionary, comprehending the pharmacopoeias of London, Edinburgh, and Dublin, with a variety of other useful information relative to medicine and pharmacy*. Charleston: *Nabu Press*. 2011: 4.
11. Duke J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: *CRC Press*, 2002: 683–684.
12. Kato T., Morita Y. C-glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosa* L. *Chem. Pharm. Bull.* 1990; 38(8): 2277–2280. DOI: 10.1248/cpb.38.2277.
13. Oliff H. S. Scientific and clinical monograph for Sinupret. American botanical council: 14. Available at: [abc.herbalgram.org/site/DocServer/Sinupret\\_fullmono.pdf](http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Sinupret_fullmono.pdf)
14. Thompson A. T. *A conspectus of the Pharmacopoeias of the London, Edinburgh, and Dublin Colleges of Physicians being a practical compendium of Materia medica and pharmacy*. London: *Forgotten Books*. 2017: 2–3.
15. Vasas A., Orban-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 175: 198–228. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.
5. Kurkina A. V. Flavonoids of pharmacopoeial plants. Samara: LLC «Ofort». 2012: 290. (In Russ.).
6. Sorokina A. A., Marakhova A. I., Stanishevskii Ya. M., Kovaleva T. Yu. Photometric methods in the analysis of medicinal plant materials and preparations based on it: monograph. M.: *RUDN*. 2015: 155. (In Russ.).
7. Fedoseeva L. M., Kutateladze G. R. Study of some phenolic compounds of the common sorrel aeral part, growing in the Altai Territory. *Chemistry of plant raw material*. 2017; 4: 91–96. DOI: 10.14258/jcprm.2017041861 (In Russ.).
8. Ermer Y., Miller D. Method validation in pharmaceutical analysis. Examples of best practices. M.: *Group of Companies «Vialek»*. 2013: 512. (In Russ.).
9. Bicker J., Petereit F., Hensel A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia*. 2009; 80(8): 483–495. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.08.015.
10. Castle T. *Lexicon Pharmaceuticum or a pharmaceutical dictionary, comprehending the pharmacopoeias of London, Edinburgh, and Dublin, with a variety of other useful information relative to medicine and pharmacy*. Charleston: *Nabu Press*. 2011: 4.
11. Duke J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: *CRC Press*, 2002: 683–684.
12. Kato T., Morita Y. C-glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosa* L. *Chem. Pharm. Bull.* 1990; 38(8): 2277–2280. DOI: 10.1248/cpb.38.2277.
13. Oliff H. S. Scientific and clinical monograph for Sinupret. American botanical council: 14. Available at: [abc.herbalgram.org/site/DocServer/Sinupret\\_fullmono.pdf](http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Sinupret_fullmono.pdf)
14. Thompson A. T. *A conspectus of the Pharmacopoeias of the London, Edinburgh, and Dublin Colleges of Physicians being a practical compendium of Materia medica and pharmacy*. London: *Forgotten Books*. 2017: 2–3.
15. Vasas A., Orban-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 175: 198–228. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.

## REFERENCES

1. Azarova O. V., Galaktionova L. P. Flavonoids: mechanism of anti-inflammatory activity. *Chemistry of plant raw material*. 2012; 4: 61–78 (In Russ.).
2. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. M., 2015; 1: 1470. (In Russ.) Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/) (In Russ.).
3. Evdokimova O. V. Validation of the method of quantitative determination of the amount of flavonoids in columns with stigmas of corn. *Pharmacy*. 2008; 7: 14–17 (In Russ.).
4. Zverev Ya. F. Flavonoids through the eyes of pharmacologist. Antioxidant and anti-inflammatory activity. *Review on clinical pharmacology and drug therapy*. 2017; 15(4): 5–13 DOI: 10.17816/RCF1545-13 (In Russ.).