

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ПАСТУШЬЕЙ СУМКИ: РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ

Н.В. Скляревская\*, кандидат фармацевтических наук, Л.А. Пахомова  
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия; Российская  
Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14

**Введение.** Траву пастушьей сумки обыкновенной применяют в виде настоя и жидкого экстракта в качестве гемостатического средства. Качество сырья в настоящее время определяется по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 70% этиловым спиртом, что не отвечает современным требованиям к лекарственному растительному сырью (ЛРС).

**Цель работы** – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки и ее валидация. **Материал и методы.** Объектами исследования служили промышленные образцы травы пастушьей сумки и сырье, заготовленное в природе. Количественное содержание флавоноидов в траве пастушьей сумки определяли спектрофотометрическим методом.

**Результаты.** Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения в траве пастушьей сумки суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Проведена валидация методики по показателям: правильность, прецизионность, воспроизводимость, специфичность и линейность. Суммарное содержание флавоноидов в различных образцах сырья пастушьей сумки составило 0,60–1,51%.

**Заключение.** Предложен новый показатель качества травы пастушьей сумки – содержание флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,5%. Разработанная методика и новый показатель качества включены в проект фармакопейной статьи для следующего издания Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ).

**Ключевые слова:** пастушья сумка, *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., трава, флавоноиды, содержание, спектрофотометрия, валидация.

\*E-mail: nelly.sklyarevskaya@pharminnotech.com

## ВВЕДЕНИЕ

Пастушья сумка – *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. – однолетнее травянистое растение семейства капустных (*Brassicaceae*). Траву пастушьей сумки обыкновенной применяют в виде настоя и жидкого экстракта в качестве гемостатического средства при маточных, почечных и легочных кровотечениях. Трава содержит комплекс фенольных соединений, среди которых преобладают флавоноиды. В сырье также обнаружены рутин, диосмин, гликозиды кверцетина, кемпферола, лютеолина, хризоэриола, изорамнетина, купрессусфлавоон, свертизин [1–4].

В настоящее время качество травы пастушьей сумки определяется, согласно требованиям ст. 46 ГФ СССР XI издания. Стандартизация сырья проводится по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 70% этиловым спиртом [5]. Современные требования к стандартизации ЛРС предусматривают количественную оценку содержания биологически активных веществ (БАВ) [6].

Цель работы – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки и ее валидация.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали 4 промышленных образца травы пастушьей сумки производства фирма «Здоровье», «Беловодье», «Апекс», МК «Народная медицина» и 1 образец, заготовленный в 2013 г. в фазу цветения в окрестностях питомника лекарственных растений Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии СПХФА (Всеволожский район Ленинградской области).

Количественное определение флавоноидов в сырье пастушьей сумки проводили спектрофотометрическим методом на приборе Shimadzu UV 1240–mini (Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе разработки методики количественного определения флавоноидов в траве пастушьей сумки изучали условия экстрагирования данной группы веществ из сырья. Проводили экстракцию 40, 70 и 90% этиловым спиртом в соотношении сырье–экстрагент 1:25, 1:50 и 1:100 в течение 15, 30, 45 и 60 мин. Установлены оптимальные условия экстракции флавоноидов из сырья: экстрагент – 70% этиловый спирт, соотношение сырье–экстрагент – 1:100, время экстракции – 45 мин (табл. 1).

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ПОЛНОТУ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ТРАВЫ ПАСТУШЬЕЙ СУМКИ**

Концентрация этилового спирта	Соотношение сырье—экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
40%	1:50	45	0,38±0,03
70%			0,44±0,01
90%			0,41±0,01
70%	1:25	45	0,36±0,01
	1:100	15	0,58±0,01
		30	0,64±0,03
		45	0,71±0,01
		60	0,70±0,02

В ходе разработки методики количественного определения флавоноидов изучали УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из травы пастушьей сумки. При этом использовали реакцию комплексобразования с 2% раствором алюминия хлорида. Максимум поглощения окрашенного комплекса спиртового извлечения из травы пастушьей сумки с раствором алюминия хлорида наблюдался при длине волны 405±2 нм. Эта длина волны была использована в качестве аналитической при определении количественного содержания флавоноидов в сырье. Изучение УФ-спектров стандартного образца (СО) рутина показало, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет аналогичный максимум поглощения (405 нм). Следовательно, рутин может быть использован в методике анализа в качестве СО. Согласно данным литературы [3, 4], в траве пастушьей сумки присутствует рутин.

На основании полученных результатов была предложена следующая **методика количественного определения**: аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта, взвешивают с точностью ±0,01 г и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивают и доводят до первоначальной массы 70% спиртом. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл 2% раствора спиртового алюминия хлорида и доводят объем раствора 70% спиртом до метки (раствор Б). Для приготовления раствора сравнения в другую мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл раствора А испытуемого раствора и доводят до метки 70% спиртом. Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. Для этого 1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляют 1 мл 2% раствора спиртового алюминия хлорида и доводят до метки 96%

спиртом (раствор Б СО рутина). Раствором сравнения служит 1,0 мл раствора А СО рутина, доведенный 70% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W) \cdot 100}$$

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

**Приготовление раствора СО рутина.** Около 0,005 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в небольшом количестве 96% спирта при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем 96% спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина).

Валидация данной методики осуществлялась на спектрофотометрах «Shimadzu» UV 1800 и «Shimadzu» UV 1240-mini при длине волны 405 нм по показателям: правильность, прецизионность, воспроизводимость, специфичность и линейность [7–10]. Для проверки воспроизводимости разработанной методики проводили 10 независимых определений для каждого вида сырья, относительная ошибка методики не превышала 5%.

Правильность методики устанавливали на модельных смесях с ГСО рутина. Растворы готовили путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору для концентраций 75, 100, 125% в пересчете на рутин. Определение проводилось в 3 повторностях для каждой концентрации (табл. 2).

Критерий приемлемости представляет собой средний процент восстановления при использовании

растворов заданных концентраций, скорректированных на 100%, его средняя величина должна находиться в пределах  $100 \pm 5\%$ . Полученный средний процент восстановления для 3 концентраций в 3 повторностях

Таблица 2

**РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ С ГСО РУТИНА**

№ повторности	Содержание рутина в модельной смеси, мг	Экспериментально найденное содержание рутина	
		абсолютная величина, мг	процент восстановления
1	3,75	3,67	97,87
2	3,75	3,79	101,07
3	3,75	3,60	96,00
4	5,00	4,84	96,80
5	5,00	5,03	100,60
6	5,00	4,95	99,00
7	6,25	6,30	100,80
8	6,25	6,21	99,36
9	6,25	6,10	97,60
Средний процент восстановления для 3 концентраций в 3 повторностях			98,79

находился в пределах 96,0–101,07% и его средняя величина составила  $98,79 \pm 1,83\%$ , что соответствует критериям приемлемости.

Прецизионность (сходимость) устанавливали в разные дни одним и тем же специалистом на одном образце сырья травы пастушьей сумки в 6 повторностях на спектрофотометре «Shimadzu» UV 1800 с использованием одних и тех же реактивов и оборудования (табл. 3). Критерий приемлемости прецизионности методики выражался величиной относительного стандартного отклонения (RSD), которое не должно превышать 10%. Оно составило в среднем 7,93%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Воспроизводимость методики количественного определения выявляли на одном образце травы пастушьей сумки в одной лаборатории на спектрофотометрах «Shimadzu» UV 1800 и «Shimadzu» UV 1240-mini в 6 повторностях (табл. 4). Критерий приемлемости воспроизводимости выражался величиной относительного стандартного отклонения (RSD), которое не должно превышать 15%. Оно составило в среднем 9,03%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Специфичность методики проверяли спектрофотометрическим методом. По методике количе-

Таблица 3

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ**

№ повторности	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %
<i>1-й день</i>			
1	0,805	0,062	8,30
2	0,669		
3	0,822		
4	0,684		
5	0,754		
6	0,766		
Среднее	0,75		
<i>2-й день</i>			
1	0,804	0,057	7,55
2	0,675		
3	0,812		
4	0,698		
5	0,773		
6	0,783		
Среднее	0,76		

Таблица 4

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ МЕТОДИКИ**

№ повторности	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %
<i>Спектрофотометр «Shimadzu» UV 1800</i>			
1	0,619	0,065	9,07
2	0,698		
3	0,675		
4	0,783		
5	0,762		
6	0,773		
Среднее	0,720		
<i>Спектрофотометр «Shimadzu» UV 1240-mini</i>			
1	0,627	0,065	9,00
2	0,730		
3	0,670		
4	0,780		
5	0,783		
6	0,774		
Среднее	0,730		

ственного определения суммы флавоноидов были получены окрашенные комплексы извлечения из травы пастушьей сумки и ГСО рутина с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида и получены дифференциальные спектры поглощения (см. рисунок). Спектры поглощения извлечений из травы пастушьей сумки и ГСО рутина практически совпадают.

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от теоретического содержания в траве пастушьей сумки суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Растворы готовили путем разбавления или увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в растворах, имеющих концентрацию 80, 90, 100, 110, 120%. Установлено, что требования к параметрам линейной зависимости выполняются, т.е. линейность методики определяется в диапазоне концентраций от 80 до 120% от теоретического содержания суммы флавоноидов. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,990. По данным экспериментов, коэффициент корреляции составил 0,995 (табл. 5).

Таким образом, согласно результатам исследования, разработанная методика воспроизводима, доступна, не требует дорогостоящих реактивов.

С применением разработанной методики проанализировано 5 образцов травы пастушьей сумки. Установлено, что содержание флавоноидов в сырье пастушьей сумки колеблется от 0,60 до 1,51% (табл.6).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для стандартизации травы пастушьей сумки разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Суммарное содержание флавоноидов в различных образцах сырья пастушьей сумки составило 0,60–1,51%. Разработанная методика и новый показатель качества (содержание флаво-

ноидов в пересчете на рутин не менее 0,5%) включены в проект фармакопейной статьи для следующего издания ГФ РФ.

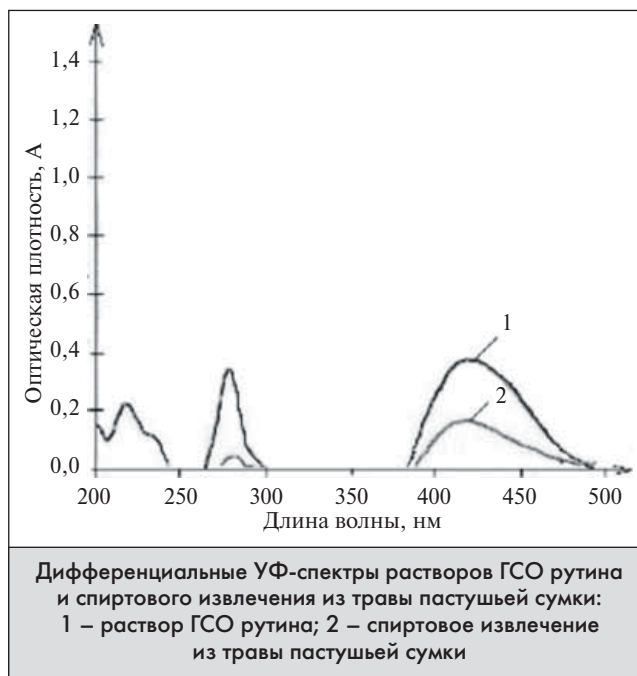


Таблица 5

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИНЕЙНОСТИ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ

Измерение	Содержание, % от нормируемого значения	Оптическая плотность	Концентрация рутина, мг/мл	Коэффициент корреляции	y=b*x + a	
					b	a
1	80	0,534	0,16	0,995	2,5135	0,131
2	90	0,5883	0,18			
3	100	0,624	0,20			
4	110	0,685	0,22			
5	120	0,737	0,24			

Таблица 6

### СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ОБРАЗЦАХ ТРАВЫ ПАСТУШЬЕЙ СУМКИ

№ образца	Производитель/место заготовки	Дата изготовления	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
1	Фирма «Здоровье», Московская обл, пос. Нахабино	Июнь 2013	0,66±0,01
2	«Апекс», Санкт-Петербург	Декабрь 2013	0,60±0,01
3	«Беловодье», г. Дзержинский Московская обл.	Декабрь 2014	0,78±0,01
4	МК «Народная медицина», Санкт-Петербург	Январь 2014	1,51±0,02
5	Всеволожский район, пос. Лемболово, окрестности питомника СПХФА	Июль 2013	0,67±0,01

ЛИТЕРАТУРА

1. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений. Под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2015; 410–1.
2. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 2. Семейства *Actinidiaceae* – *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* – *Haloragaceae*. Под ред. А.Л. Буданцева. СПб. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009; 105.
3. Kubinova R., Spačková V., Lučivjanská K. Antioxodant activity of extracts and HPLC analysis of flavonoids from *Capsella bursa-pastoris* Ceska Slov. Farm., 2013; 62 (4): 174–6.
4. Al-Khalil S., Abu Zarga M., Zeitoun N. et al. Chemical constituents of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. Alexandria J. Pharm. Sci., 2000;14 (2): 91–4.
5. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. М.: Медицина, 1989; 400.
6. Потанина О.Г., Самылина И.А. Разработка общих фармакопейных требований к анализу лекарственного растительного сырья. Фармация, 2016; 65 (3): 48–50.
7. ГОСТ Р ИСО 5725–3–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. М.: Госстандарт, 2002; 28.
8. Клименко А.Ю., Петюнин Г.П., Трут С.Н., Мороз В.П. Критерии приемлемости линейной зависимости при проведении валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики, 2014; 2: 15–22.
9. Аладышева Ж.И., Беляева В.В., Береговых В.В. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик. Фармация, 2008; 7: 9–14.
10. Латыпова Г.М., Романова З.Р., Бубенчикова В.Н. и др. Содержание флавоноидов в сырье первоцвета весеннего. Фармация, 2012; 6: 20–2.

Поступила 8 декабря 2016 г.

DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN CASEWEED (*CAPSELLA BURSA-PASTORIS*) HERB: PROCEDURE DEVELOPMENT AND VALIDATION

N.V. Sklyarevskaya, PhD; L.A. Pakhomova

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy; 14, Professor Popov St., Saint Petersburg 197376

SUMMARY

**Introduction.** Caseweed (*Capsella bursa-pastoris*) herb tincture and liquid extract are used as a hemostatic agent. The quality of raw materials is presently determined from the content of extractive substances derived using 70% ethanol, which does not meet the current requirements for medicinal plant raw materials.

**Objective:** To develop and validate a procedure to quantify the amount of flavonoids in caseweed herb.

**Material and methods.** The investigation objects were industrial caseweed herb samples gathered in nature. The quantitative content of flavonoids in caseweed herb was determined spectrophotometrically.

**Results.** A spectrophotometric procedure was developed to quantify the caseweed herb amount of flavonoids calculated with reference to rutin. The procedure was validated using the indicators: accuracy, precision, reproducibility, specificity, and linearity. The total content of flavonoids in various samples of caseweed raw materials amounted to 0.60–1.51%.

**Conclusion.** The authors have proposed a new indicator for the quality of caseweed herb, such as the level of flavonoids calculated with reference to rutin, which is at least 0.5%. The developed procedure and the new quality indicator have been included in the draft pharmacopoeial article for the next edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

**Key words:** caseweed, *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., herb, flavonoids, content, spectrophotometry, validation.

REFERENCES

1. Great Encyclopedic Dictionary of medicinal plants. (ed. G.P. Yakovlev). St. Petersburg: SpetsLit, 2015; 410–1 (in Russian).
2. Plant Resources of Russia: Wild flowering plants, their composition and biological activity. V. 2. Families *Actinidiaceae* – *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* – *Haloragaceae*. (ed. A.L. Budantsev). St.Petersburg-Moscow: Association of scientific publications of KMK, 2009; 105 (in Russian).
3. Kubinova R., Spačková V., Lučivjanská K. Antioxodant activity of extracts and HPLC analysis of flavonoids from *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. Ceska Slov. Farm., 2013; 62 (4): 174–6.
4. Al-Khalil S., Abu Zarga M., Zeitoun N. et al. Chemical constituents of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. Alexandria J. Pharm. Sci., 2000;14 (2): 91–4.
5. The State Pharmacopoeia of the USSR. XI ed., Vol.2. Moscow: Medicine, 1989; 400 (in Russian).
6. Potanina O.G., Samylyna I.A. Determination of general pharmacopoeia requirements for analysis of medicinal plant materials. Farmatsiya, 2016; 65 (3): 48–50 (in Russian).
7. GOST R ISO 5725-3-2002 Accuracy (trueness and precision) of methods and results of measurements.\* Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Moscow: State Standard, 2002; 28 (in Russian).
8. Klimenko L.Yu., Petyunin G.P., Truth S.N., Moroz V.P. Linear dependence of the eligibility criteria for the validation of UV spectrophotometric quantification techniques in forensic toxicological analysis. Topical issues of pharmaceutical and medical science and practice, 2014; 2: 15–22 (in Ukrainian).
9. Aladyshva J.I., Belyaeva V.V., Beregovih V.V. Practical aspects of the work on validation of analytical methods-ray. Farmatsiya, 2008; 7: 9–14 (in Russian).
10. Latypova G.M., Romanova Z.R., Bubenichikova V.N. et al. The content of flavonoids in raw cowslip primrose (*Primula veris*) material. Farmatsiya, 2012; 6: 20–2 (in Russian).