

Определение флавоноидов в листьях персика обыкновенного: валидация методики

Л.В. Иванцова, В.Д. Белоногова, А.А. Гилева
Пермская государственная фармацевтическая академия;
Российская Федерация, 614990, Пермь, ул. Полевая, д. 2

СВЕДЕНИЕ ОБ АВТОРАХ

Иванцова Любовь Витальевна – аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии. Тел.: +7 (919) 496-17-30. E-mail: xoxolkova_l@mail.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (919) 715-93-17. E-mail: belonogovavd@yandex.ru

Гилева Ангелина Александровна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (964) 185-60-96

РЕЗЮМЕ

Введение. Персик обыкновенный широко культивируется во многих странах мира как пищевое растение. В медицинской практике используются семена персика для получения жирного персикового масла. Экстракт листьев персика обладает широким диапазоном фармакологических свойств; его используют исключительно в составе биологически активных добавок (БАД). Для новой БАД «Оксифрин» на основе жидкого экстракта из листьев персика обыкновенного разработана методика оценки качества используемого сырья.

Цель исследования – валидационная оценка модифицированной спектрофотометрической методики стандартизации листьев персика обыкновенного

Материал и методы. Объект исследования – образцы высушенных листьев персика обыкновенного, собранных в окрестностях г. Майкоп Краснодарского края. Валидационные исследования проводили в соответствии с требованиями действующей нормативной документации.

Результаты. Валидация методики осуществлялась по таким показателям, как линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность. Установлено, что разработанная методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях персика обыкновенного воспроизводима, доступна, не требует дорогостоящих реактивов и позволяет на должном уровне провести оценку качества сырья.

Заключение. Дана валидационная характеристика спектрофотометрической методики определения суммы флавоноидов в листьях персика обыкновенного. Методика может применяться в процессе производства БАД «Оксифрин» при оценке качества сырья.

Ключевые слова: персик обыкновенный, *Persica vulgaris* Mill., листья, флавоноиды, методика количественного определения, валидация.

Для цитирования: Иванцова Л.В., Белоногова В.Д., Гилева А.А. Определение флавоноидов в листьях персика обыкновенного: валидация методики. Фармация, 2018; 67 (7): 27–31. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-05>

DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN PEACH (*PERSICA VULGARIS*) LEAVES: PROCEDURE VALIDATION

L.V. Ivantsova, V.D. Belonogova, A.A. Gileva

Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya St., Perm 614990, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Ivantsova Lyubov Vitalievna – postgraduate student of the pharmacognosy department with the course of botany, FGBOU VO Perm State Pharmaceutical Academy. Tel.: +7 (919) 496-17-30. E-mail: xoxolkova_l@mail.ru

Belonogova Valentina Dmitrievna – head. Department of Pharmacognosy with a Course in Botany, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, FGBOU VO Perm State Pharmaceutical Academy. Tel. +7 (919) 715-93-17. E-mail: belonogovavd@yandex.ru

Gileva Angelina Aleksandrovna – doctor of agricultural sciences. Associate Professor of the Department of Pharmacognosy with a course in Botany of the Federal State Educational Establishment of Health of the Russian Federation in the PGFA of the Ministry of Health of Russia. Tel.: +7 (964) 185-60-96

SUMMARY

Introduction. Peach (*Persica vulgaris*) is widely cultivated as a food plant in many countries of the world. In medical practice, peach kernels are used to produce fatty peach oil. Peach leaf extract has a broad range of pharmacological properties; it is used exclusively in biologically active additives (BAA). A procedure has been developed to assess the quality of raw materials for the novel BAA Oxyfrin based on liquid peach leaf extract.

Objective: to validate the modified spectrophotometric procedure for the standardization of peach leaves.

Material and methods. The investigation object was samples of dried peach leaves gathered in the vicinity of the city of Maikop, Krasnodar Region. Validation studies were conducted in accordance with the current regulatory requirements.

Results. The procedure was validated using indicators, such as linearity, repeatability, reproducibility, and correctness. The developed procedure to determine the amount of flavonoids calculated with reference to rutin in peach leaves was ascertained to be reproducible and available, to require no expensive reagents, and to allow the quality of raw materials to be properly assessed.

Conclusion. The investigation has provided the validation characteristic of the spectrophotometric procedure to determine the amount of flavonoids in peach leaves. The procedure can be used to produce the BAA Oxyfrin when assessing the quality of raw materials.

Key words: peach; *Persica vulgaris* Mill.; leaves; flavonoids; procedure for quantitative determination; validation.

For citation: Ivantsova L.V., Belonogova V.D., Gileva A.A. Determination of flavonoids in peach (*Persica vulgaris*) leaves: procedure validation. Farmatsiya (Pharmacy), 2018; 67 (7): 27–31. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-05>

Введение

Персик обыкновенный – *Persica vulgaris* Mill., дерево из семейства розоцветных (*Rosaceae*), широко культивируется во многих странах мира как пищевое растение. В медицинской практике используются семена персика для получения жирного персикового масла, богатого триглицеридами ненасыщенных жирных кислот (олеиновой, линолевой, гидроксиполеиновой). Семена персика обыкновенного включены в фармакопеи Японии и Китая как противокашлевое и стимулирующее средство. В гомеопатии используются листья персика, цветки и кора молодых веток [1].

Листья персика обыкновенного содержат: кумарины, дубильные вещества, флавоноиды (наргенин, персикозид, кверцетин), каротиноиды, амигдалин, хлорогеновую кислоту. В листьях персика обнаружены микроэлементы: марганец, медь, цинк, серебро, фосфор [2].

Экстракт листьев персика обладает широким диапазоном фармакологических свойств: способствует восстановлению гуморального и клеточного звеньев иммунной системы; обладает хорошим обезболивающим эффектом (повышает порог болевой чувствительности), в связи с чем значительно снижается доза потребления наркотических анальгетиков или происходит полный отказ от них; благотворно влияет на нервную систему, нормализуя сон и настроение больных; повышает физическую активность; купирует астеновегетативный и диспепсический синдром; увеличивает безрецидивный промежуток жизни больных; подавляет рост атипичных клеток [3].

В настоящий момент экстракты из листьев персика обыкновенного используют исключительно в составе следующих биологически активных добавок: «Олексин», «Акан», «Флавоперсин», «Персифен» [2]. Научно-производственная компания «Апифитогрупп» разработала БАД «Оксифрин» на основе жидких экстрактов из листьев персика обыкновенного и листьев крапивы двудомной.

Для оценки качества листьев персика обыкновенного было проведено фитохимическое исследование сырья и разработана методика определения суммы флавоноидов с использованием прямой спектрофотометрии.

Цель настоящей работы – валидационная оценка модифицированной методики стандартизации листьев персика обыкновенного.

Материал и методы

Объекты исследования – образцы высушенных листьев персика обыкновенного, собранных в окрестностях г. Майкоп Краснодарского края. Валидационные исследования проводили в соответствии с требованиями действующей нормативной документации и рекомендациями научной литературы [4–7].

Методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях персика, подлежащая валидации. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу присоединяют к обрат-

Таблица 1

Определение линейности анализируемой методики

№ опыта	Уровень концентрации, %	Концентрация флавоноидов, мг	Оптическая плотность раствора
1	50	10,61	0,3500
2	75	16,70	0,5524
3	100	24,55	0,8149
4	125	35,20	1,1669
5	150	41,65	1,3816

ному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Вату помещают в колбу для экстрагирования, прибавляют еще 50 мл 70% этилового спирта. Проводят повторную экстракцию. Горячее извлечение фильтруют в ту же мерную колбу через бумажный фильтр. После охлаждения фильтр промывают 70% этиловым спиртом, доводят объем извлечения до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом. Через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служит следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot 2},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; m_0 – масса ГСО рутин, г; D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m – масса сырья, г; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Результаты и обсуждение

Валидация методики осуществлялась по таким показателям, как линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность.

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях персика обыкновенного. Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увели-

чения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в растворах, имеющих концентрацию 50,75,100,125,150% (табл.1).

Коэффициент корреляции линейного регрессионного графика составил $r = 1,0$; уравнение регрессии: $y = bx + a$, при $b = 0,065$, $a = 30,096$. На основании полученных данных можно утверждать, что соблюдается линейная зависимость между величинами оптической плотности и содержанием флавоноидов в извлечениях из листьев персика обыкновенного в интервале 50–150% от номинального значения определяемой величины (рис. 1). Этот интервал определяет аналитическую область методики.

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,99. Расчет коэффициента корреляции проводили с помощью программы STAT, он составил 1,000 (рис. 2).

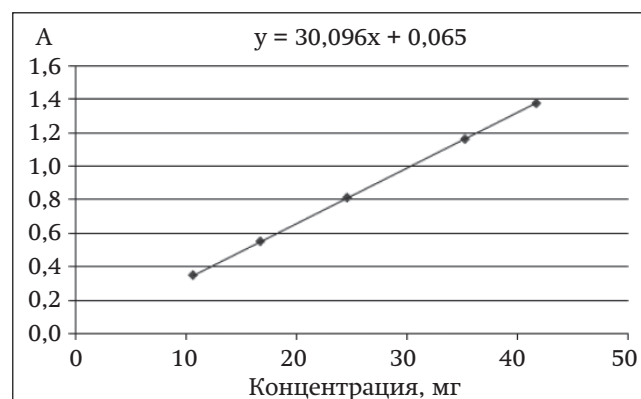
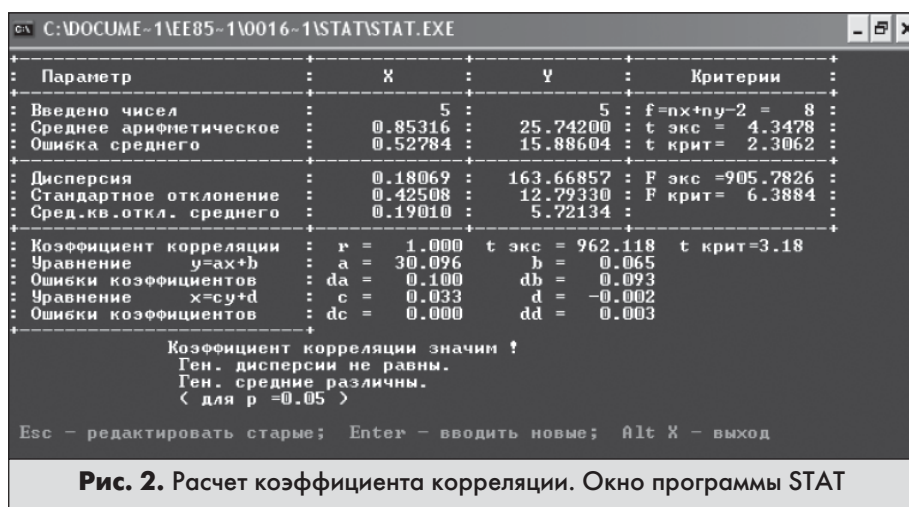


Рис. 1. График линейности методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях персика обыкновенного



Повторяемость методики устанавливали на 1 образце сырья в 6 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения RSD, которое не должно превышать 10% (величина RSD – это мера того, насколько широко разбросаны точки данных относительно их среднего). Величина RSD составила 0,023% (табл. 2), что не превышает допустимые 10%, и свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости. Внутрिलाбораторную прецизионность методики определяли на 3 образцах сырья в трехкратной повторности на спектрофотометрах СФ-2000 и СФ-46 (табл. 3). Таким образом, результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутрिलाбора-

Таблица 2

Определение повторяемости разработанной методики

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях персика обыкновенного, %
1	0,7146
2	0,7513
3	0,7443
4	0,7804
5	0,7254
6	0,7492
Среднее значение	0,7442
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,023

торной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%.

Отсутствие систематической ошибки выявляли методом добавок различных концентраций раствора ГСО рутин непосредственно в извлечение из листьев персика обыкновенного (табл. 4). Результаты показали, что ошибка анализа (3,13%) находится в пределах таковой единичного определения (табл. 5). Следовательно, от-

сутствует систематическая ошибка разработанной методики.

Таблица 3

Определение внутрिलाбораторной прецизионности разработанной методики

№ образца	Повторность	Содержание флавоноидов, %	
		СФ-2000	СФ-46
1	1	2,89	3,90
	2	2,74	2,78
	3	3,64	3,58
	Среднее \bar{X}	3,09	3,42
	Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f=2$	0,482	0,577
2	1	3,26	3,89
	2	3,87	3,26
	3	3,05	2,98
	Среднее \bar{X}	3,39	3,38
	Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f=2$	0,426	0,466
3	1	3,05	2,96
	2	2,86	2,78
	3	3,10	3,06
	Среднее \bar{X}	3,00	2,93
	Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f=2$	0,127	0,142

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в листьях персика обыкновенного с использованием метода добавок

Таблица 4

в извлечении	Содержание флавоноидов, мг			Ошибка, %
	добавлено ГСО рутин	ожидаемое теоретически	определенное фактически	
24,55	0,05	24,60	24,63	0,55
	0,1	24,65	24,71	0,12
	0,15	24,75	24,87	1,1
26,21	0,05	26,26	26,33	0,49
	0,1	26,31	26,37	0,42
	0,15	26,36	26,47	0,76
25,36	0,05	25,41	25,54	0,94
	0,1	25,46	25,58	0,87
	0,15	25,51	25,67	1,15

Литература

1. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений. Под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2015; 419–20.
2. Иванцова Л.В., Блинова О.Л., Гилева А.А., Белоногова В.Д. Фармакогностическое исследование персика обыкновенного листьев. Медицинский вестник Башкортостана, 2017; 12 (6): 108–11.
3. Персик обыкновенный. Фармакологические свойства. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://lektrava.ru/encyclopedia/persik-obyknovenny/>
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд., т.1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2015; 1470. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.femb.ru>
5. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 (в 6 частях). Точность» (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. М.: Госстандарт России.
6. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов. Фармация, 2006; 4: 8–12.
7. Аладышева Ж.И., Беляев В.В., Береговых В.В. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик. Фармация, 2008; 7: 9–14.

Таблица 5

Метрологические характеристики разработанной методики

n	f	X	S ²	S	P, %	t (p, f)	ΔX	ε, %
10	9	3,67	0,0058	0,0240	95	2,26	0,115	3,13

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований, разработанная методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях персика обыкновенного воспроизводима, доступна, не требует дорогостоящих реактивов и позволяет на должном уровне провести оценку качества сырья.

Заключение

При проведении валидационной оценки разработанной спектрофотометрической методики определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях персика обыкновенного установлены параметры линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности. Разработанная методика может применяться в процессе производства БАД при оценке качества сырья.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 27 апреля 2018 г.

References

1. The Big Encyclopedic Dictionary of Medicinal Plants (by ed. G.P. Jakovlev). SP-b.: SpetsLit, 2015; 419–20 (in Russian).
2. Ivantsova L.V., Blinova O.L., Gileva A.A., Belonogova V.D. Pharmacognostic examination of the peach of ordinary leaves. Meditsinskiy vestnik Bashkortostana, 2017; 12 (6): 108–11 (in Russian).
3. Peach ordinary. Pharmacological properties. [Electronic resource]. Access mode: <http://lektrava.ru/encyclopedia/persik-obyknovenny/> (in Russian).
4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII-th ed., tom 1. Moscow: Nauchniy Tsenter ekspertizi sredstv meditsinskogo primeneniya, 2015; 1470. [Electronic resource]. Access mode: <http://www.femb.ru> (in Russian).
5. GOST R ISO 5725-2002 (in 6 parts) «Accuracy» (accuracy and precision) of measurement methods and results». Moscow: Gosstandart of Russia (in Russian).
6. Arzamastsev A.P., Sadchikova N.P., Kharitonov Yu.Ya. Validation of analytical methods. Farmatsiya, 2006; 4: 8–12 (in Russian).
7. Aladyшева Zh.I., Belyaev V.V., Beregovikh V.V. Practical aspects of works on validation of analytical methods. Farmatsiya, 2008; 7: 9–14 (in Russian).