

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ БОДЯКА ПОЛЕВОГО

### С.Р. Шамсутдинова

аспирант, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии,  
Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа, Россия)  
E-mail: svetashamsutdinova@yandex.ru

### К.А. Пупыкина

д. фарм.н., профессор, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии,  
Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа, Россия)  
E-mail: pupykinaka@gmail.com

### Е.В. Красюк

ассистент, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии,  
Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа, Россия)  
E-mail: medickev91@yandex.ru

### Л.В. Старцева

доцент, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии,  
Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа, Россия)  
E-mail: ludmila-web@list.ru

**Актуальность.** Одной из основных групп действующих веществ бодяка полевого (*Cirsium arvense* L.) являются флавоноиды, среди которых преобладает апигенин. Изучение новых видов лекарственного растительного сырья и внедрение их в медицинскую практику остается актуальной проблемой, для решения которой требуется проведение исследований по разработке методики количественного определения основной группы биологически активных веществ и валидация методики.

**Цель работы.** Валидационная оценка методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого.

**Материал и методы.** Объект исследования – образцы травы бодяка полевого. Количественное определение флавоноидов выполняли методом дифференциальной спектрофотометрии с подбором оптимальных условий экстракции, проведена валидация методики.

**Результаты.** Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на апигенин ( $\lambda_{\max} = 388 \pm 2$  нм). Определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов: экстрагент – спирт этиловый 40%-ный, соотношение сырья и экстрагента 1:30, степень измельченности – 2 мм, время экстракции – 30 мин, трехкратная экстракция, комплексообразователь – 1 мл 2%-ного раствора алюминия хлорида, реакция развивается в течение 45 мин и комплекс остается стабильным 1 ч. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин составляет  $2,78 \pm 0,09\%$ . Валидацию методики проводили по следующим параметрам: линейность, правильность и прецизионность. Установлено, что в пределах измерений концентраций (оптическая плотность 0,241–0,389) зависимость содержания апигенина от теоретического содержания флавоноидов в траве бодяка полевого носит линейный характер. Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в растворах, с известной концентрацией апигенина; показано, что значения лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов. Прецизионность исследовали по показателям: повторяемость (сходимость); внутрилабораторная и межлабораторная воспроизводимость; при этом установлено, что относительная погрешность среднего результата не превышает 10%.

**Выводы.** Обоснование линейного характера, правильности и прецизионности разработанной методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого в пересчете на апигенин дает возможность ее дальнейшего использования для стандартизации исследуемого сырья.

**Ключевые слова:** валидация, бодяк полевой, трава, флавоноиды, апигенин.

**Для цитирования:** Шамсутдинова С.Р., Пупыкина К.А., Красюк Е.В., Старцева Л.В. Валидация методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(6):36–41. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-06-05>

Изучение новых видов лекарственного растительного сырья и внедрение их в медицинскую практику требует проведения исследований, направленных на разработку показателей подлинности и доброкачественности, подробное изучение

химического состава и разработку метода стандартизации исследуемого сырья. При этом важным моментом является разработка нормативной документации на новый вид лекарственного растительного сырья и валидационная оценка методики

количественного определения основных групп биологически активных веществ с целью подтверждения обоснованности выбора метода [7, 9].

Растения рода бодяк (*Cirsium* L.) семейства астровых (Asteraceae) широко распространены по всей территории Российской Федерации. Химический состав растений изучен недостаточно, но известно, что они содержат различные витамины, среди которых аскорбиновая кислота, каротиноиды, горькие вещества, смолы, органические кислоты, дубильные вещества, в корнях – инулин, эфирные масла, флавоноиды (производные кверцетина, кемпферола, апигенина, нарингенина, линарин), гликозид, отщепляющий синильную кислоту, и гликозид талиацин, холин, жирное масло (в плодах). Растения рода бодяк обладают ценными лечебными свойствами, их рекомендуют для лечения подагры, ревматизма, при кожных заболеваниях, болезнях пищеварительной системы, нервных заболеваниях, эпилепсии, как противовоспалительные, антиоксидантные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие, антимикробные средства, но используются они только в народной медицине. Поэтому актуальным является более подробное изучение химического состава и биологической активности растений данного рода [4, 6, 8].

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – валидационная оценка методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы травы бодяка полевого, заготовленные на территории Республики Башкортостан. Количественное определение флавоноидов выполняли методом дифференциальной спектрофотометрии (прибор Shimadzu UV-1800) с подбором оптимальных условий экстракции. В качестве стандартного образца использовали апигенин марки Sigma (чистота 95%). Валидацию методики количественного определения флавоноидов проводили в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 ГФ 14 издания по характеристикам линейность, правильность и прецизионность. Статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественное определение флавоноидов в траве бодяка полевого проводили спектрофото-

метрическим методом с добавлением комплексообразующей добавки – спиртового раствора алюминия хлорида, позволяющего отделить комплекс флавоноидов от сопутствующих веществ, при этом флавоноиды образовывали устойчивый комплекс в кислой среде, и можно было наблюдать батохромный сдвиг с выраженными максимумами поглощения (рис. 1).

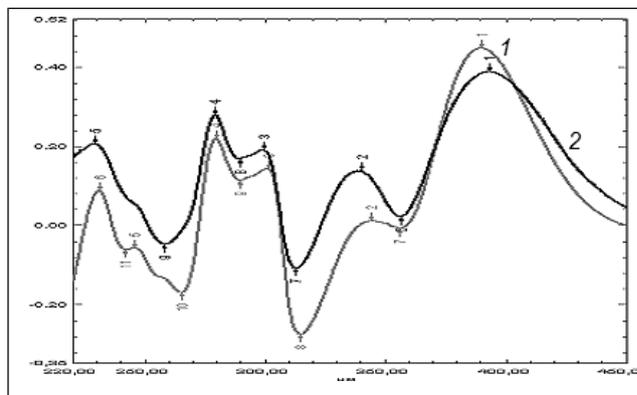


Рис. 1. УФ-спектры: 1 – вещества стандарта – апигенина; 2 – извлечения из травы бодяка полевого с добавлением раствора алюминия хлорида ( $\lambda_{\max}=388\pm 2$  нм)

В процессе разработки методики были изучены условия количественного определения флавоноидов (экстрагент, соотношение сырья и экстрагента, степень измельченности, время и кратность экстракции, условия проведения реакции комплексообразования) и подобраны оптимальные параметры, при которых наиболее полно извлекаются флавоноиды из исследуемого растительного сырья [5, 7]. При выполнении эксперимента установили, что спектр поглощения травы бодяка полевого имеет близкий максимум к спектру апигенина ( $\lambda_{\max}=388\pm 2$  нм), который был выбран как основной и на него в дальнейшем вели пересчет.

В результате эксперимента показано, что оптимальным экстрагентом является спирт этиловый 40%-ный, степень измельченности сырья – 2 мм, соотношение сырья и экстрагента – 1:30, время экстракции – 30 мин при трехкратной экстракции (табл. 1).

При изучении влияния концентрации спиртового раствора алюминия хлорида и его количества, добавляемого к извлечению, было установлено, что лучшим для проведения реакции комплексообразования является 2%-ный раствор алюминия хлорида в количестве 1 мл, при этом реакция комплексообразования развивается в течение 45 мин и комплекс остается стабильным в течение часа.

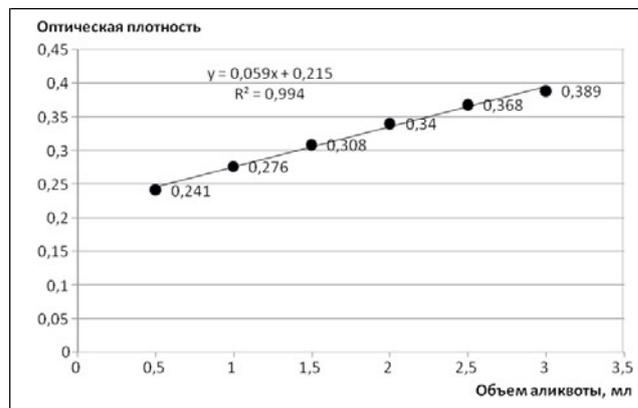
**Таблица 1. Условия экстракции флавоноидов из травы бодяка полевого**

Параметр		Содержание флавоноидов, %
Экстрагент – спирт этиловый концентрации, %:	40	2,89±0,14
	50	2,73±0,12
	70	2,68±0,11
	80	2,51±0,09
	90	2,46±0,07
Степень измельченности сырья, мм	1	2,77±0,13
	2	2,84±0,18
	3	2,69±0,10
Соотношение сырья и экстрагента	1:30	2,92±0,12
	1:50	2,77±0,09
	1:100	2,68±0,08

Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого представлена в табл. 2, ошибка опыта не превышала предельно допустимых значений.

Валидацию методики проводили по следующим параметрам: линейность, правильность и прецизионность [1, 2].

Определение линейности выполняли на 6 уровнях концентраций от теоретического содержания флавоноидов в траве бодяка полевого с добавлением аликвоты от 0,5 до 3,0 мл (табл. 3).



**Рис. 2.** График корреляции

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции (рис. 2).

Величина коэффициента корреляции составила 0,994, что является близким значением к единице, следовательно, совокупность данных можно описать прямой линией.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в растворах, полученных путем добавления известной концентрации вещества стандарта – апигенина. Валидируемая методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних фактических результатов (табл. 4).

**Таблица 2. Метрологическая характеристика методики определения флавоноидов**

Исследуемый объект	$f$	$\bar{x}$	$s^2$	$S_x$	$p, \%$	$t(p, f)$	$E_a$	$\varepsilon, \%$
Трава бодяка	5	2,78	0,000038	0,0019	95	2,57	0,09	3,23

**Таблица 3. Линейность методики определения флавоноидов**

№	Содержание флавоноидов, %	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов в пересчете на апигенин, %
1	80	0,5	0,241	2,46
2	90	1,0	0,276	2,57
3	100	1,5	0,308	2,64
4	110	2,0	0,340	2,75
5	120	2,5	0,368	2,88
6	130	3,0	0,389	2,95

**Таблица 4. Правильность методики определения флавоноидов**

№	Содержание флавоноидов в пересчете на апигенин в исследуемом растворе, мг	Количество добавленного апигенина, мг	Ожидаемый результат (истинное значение), мг	Фактический результат, мг	$x$ , мг	$\varepsilon$ , %
1	26,91	0,25	27,16	27,74	0,58	2,09
2	27,75	0,50	28,25	28,99	0,74	2,55
3	28,93	0,75	29,68	29,27	-0,41	1,40

**Таблица 5. Повторяемость методики определения флавоноидов**

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в траве бодяка полевого, %
1	2,82
2	2,84
3	2,82
4	2,79
5	2,80
6	2,82
7	2,78
8	2,84
9	2,82
Среднее значение	2,81
Относительное стандартное отклонение (RSD)	0,97%

Прецизионность исследовалась по следующим показателям: повторяемость (сходимость); внутрилабораторная и межлабораторная прецизионность (воспроизводимость). Критерием приемлемости считается относительная погрешность среднего результата, которая не должна быть больше 10%.

Показатель повторяемости оценивался по результатам, проводимым в одинаковых условиях одной лаборатории и одним исполнителем, с применением одинакового оборудования, реактивов в пределах короткого промежутка времени (табл. 5).

Следующий этап исследования – определение внутрилабораторной прецизионности, которое выполнялось двумя аналитиками в повторностях (табл. 6), и межлабораторной прецизионности (воспроизводимости), проводимой в двух разных лабораториях (табл. 7).

**Таблица 6. Внутрилабораторная прецизионность методики**

Повторность	Аналитик	$X$ , %	$X_{\text{ср}}$	$S$	$\Delta X_{\text{ср}}$	$\varepsilon_{\text{ср}}$ , %
1	1	2,78	2,79	0,0916	0,10	3,58
2	1	2,80				
3	1	2,82				
1	2	2,74				
2	2	2,76				
3	2	2,83				

**Таблица 7. Межлабораторная прецизионность методики**

Повторность	Лаборатория	$X$ , %	$X_{\text{ср}}$	$S$	$\Delta X_{\text{ср}}$	$\varepsilon_{\text{ср}}$ , %
1	1	2,82	2,81	0,1038	0,11	3,91
2	1	2,79				
3	1	2,80				
1	2	2,83				
2	2	2,84				
3	2	2,80				

Таким образом, установлено, что относительная погрешность среднего результата ни в одном случае не превышала 10%, что свидетельствует о повторяемости, внутрилабораторной и межлабораторной прецизионности разработанной методики.

## ВЫВОДЫ

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на апигенин ( $\lambda_{\max} = 388 \pm 2$  нм).

Определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов в сырье бодяка полевого: экстрагент – 40%-ный спирт этиловый, соотношение сырья и экстрагента 1:30, степень измельченности – 2 мм, время экстракции – 30 мин при трехкратной экстракции, концентрация и количество комплексобразователя – 2% и 1 мл соответственно.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин составляет  $2,78 \pm 0,09\%$ .

Обоснован линейный характер, правильность и прецизионность разработанной методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого в пересчете на апигенин и возможность ее дальнейшего использования для стандартизации исследуемого сырья.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация фармакопейных методов (проект общей фармакопейной статьи). Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. МЗ РФ. 2001; 1: 28–29.
2. Багирова, В.Л., Ковалева Е.Л., Садчикова Н.П. О стандартизации лекарственных средств на современном этапе. Химико-фармацевтический журнал. 2000; 11: 46–47.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации МЗ РФ, 14-е изд. М. 2018; 1: 1814.
4. Кароматов, И.Д., Абдувохидов А.Т. Использование сорного растения Осот огородный в лечебных целях. Биология и интегративная медицина. 2017; 5: 57–62.
5. Красюк, Е.В., Пупыкина К.А., Анищенко И.Е. Характеристика фенольных соединений видов монарды, инродуцированных в Республике Башкортостан. Башкирский химический журнал. 2015; 22(3): 79–83.
6. Красноборов, И.М. Род Бодяк *Cirsium* Mill – Бодяк, татарник. Определитель растений Республики Тывы. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2007: 507–509.
7. Пупыкина К.А. Исследования по разработке и стандартизации лекарственных растительных средств для профилактики и комплексного лечения заболеваний органов пищеварения: Автореф. дисс. ... д.фарм.н. Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН. Москва. 2008. 49 с.
8. Тулицына, А.Н., Звева О.А. О двух видах рода бодяк – *Cirsium* Mill. (*Asteraceae*) в Средней Сибири. Вестник КрасГАУ. 2010; 11: С.49–52.
9. Хукс Ч. Основные принципы планирования эксперимента. Пер. с англ. М.: Мир. 1967. 399 с.

Поступила 2 апреля 2021 г.

## VALIDATION OF THE METHODOLOGY OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN THE HERBAE OF *Cirsium arvense* (L.)

© Authors, 2021

### S.R. Shamsutdinova

Post-graduate Student, Department of Pharmacognosy with the Course of Botany and Basics of Phytotherapy, Bashkir State Medical University (Ufa, Russia)  
E-mail: svetashamsutdinova@yandex.ru

### K.A. Pupykina

Dr.Sc. (Pharm), Professor, Department of Pharmacognosy with the Course of Botany and Basics of Phytotherapy, Bashkir State Medical University (Ufa, Russia)  
E-mail: pupykinaka@gmail.com

### E.V. Krasnyuk

Assistant, Department of Pharmacognosy with the Course of Botany and Basics of Phytotherapy, Bashkir State Medical University (Ufa, Russia)  
E-mail: medicekv91@yandex.ru

### L.V. Startseva

Associate Professor, Department of Pharmacology with a course in Clinical Pharmacology, Bashkir State Medical University (Ufa, Russia)  
E-mail: ludmila-web@list.ru

**Relevance.** One of the main groups of active substances of the *Cirsium arvense* L. are flavonoids, among which apigenin predominates. An urgent problem is the study of new types of medicinal plant raw materials and their introduction into medical practice, which requires research on the development of methods for the quantitative determination of the main group of BAS and validation of the method.

**The purpose of the work.** Validation evaluation of the method of quantitative determination of flavonoids in the herba of the *Cirsium arvense* L.

**Material and methods.** The object of the study is samples of the herba of the *Cirsium arvense* L. The quantitative determination of flavonoids was carried out by differential spectrophotometry with the selection of optimal extraction conditions, and the method was validated.

**Results.** A method for the quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of apigenin ( $\lambda_{\max} = 388 \pm 2 \text{ nm}$ ) was developed. The optimal parameters of extraction of flavonoids were determined: the extractant-ethyl alcohol 40%, the ratio of raw materials and extractant 1 : 30, the degree of grinding – 2 mm, the extraction time-30 minutes, three-time extraction, the complexing agent-1 ml of 2% aluminum chloride solution, the reaction develops within 45 minutes and the complex remains stable for 1 hour. The content of the sum of flavonoids in terms of apigenin is  $2.78 \pm 0.09\%$ . Validation of the method was carried out according to the following parameters: linearity, correctness and precision. It was found that within the limits of the measured concentrations (optical density 0.241–0.389), the dependence of the apigenin content on the theoretical content of flavonoids in the herba of the *Cirsium arvense* L. is linear. The correctness of the method was established by measuring the quantitative content of the sum of flavonoids in solutions with a known concentration of apigenin and it was found that the values lie within the confidence intervals of the corresponding average results. Precision was studied by the indicators-repeatability (convergence); intra-laboratory and inter-laboratory reproducibility, while it was found that the relative error of the average result did not exceed 10%.

**Conclusions.** The linear nature, correctness and precision of the developed methodology for the quantitative determination of flavonoids in the herba of the *Cirsium arvense* L. in terms of apigenin and the possibility of its further use for the standardization of the studied raw materials are justified.

**Key words:** validation, *Cirsium arvense*, herba, flavonoids, apigenin.

**For citation:** Shamsutdinova S.R., Pupykina K.A., Krasnyuk E.V., Startseva L.V. Validation of the methodology of quantitative determination of flavonoids in the herbae of *Cirsium arvense* (L.). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(6):36–41. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-06-05>

## REFERENCES

1. Arzamashev A.P., Sadchikova N.P., Kharitonov Yu.Ya. Validation of pharmacopoeial methods (draft general pharmacopoeial article). Vedomosti of the Scientific Center for Expertise and State Control of Medicines. MZ RF. 2001; 1: 28–29.
2. Bagirova V.L., Kovaleva E.L., Sadchikova N.P. On standardization of medicinal products at the present stage. Chem.-pharm. journal. 2000; 11: 46–47.
3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Ministry of Health of the Russian Federation, 14<sup>th</sup> ed. M., 2018; 1: 1814.
4. Karomatov I.D., Abdovokhidov A.T. The use of the weed plant *Osetogorodny* for medicinal purposes. Biology and integrative medicine. 2017; 5: 57–62.
5. Krasnyuk E.V., Pupykina K.A., Anishchenko I.E. Characterization of phenolic compounds of the types of monarda, introdutsirovannykh in the Republic of Bashkortostan. Bashkir chemical journal. 2015; 22(3): 79–83.
6. Krasnoborov I.M. Rod Thistle *Cirsium* Mill – Thistle, Thistle. Determinant of plants of the Republic of Tyva. Novosibirsk: SB RAS Publishing House, 2007: 507–509.
7. Pupykina K.A. Research on the development and standardization of medicinal plant products for the prevention and complex treatment of diseases of the digestive system: Autoref. diss.... Doctor of Pharm.n. All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants RASKHN. Moscow, 2008. 49 p.
8. Tupitsyna A.N., Zvereva O.A. On two species of the genus *bodyak-Citrisum* Mill. (Asteraceae) in Central Siberia. Vestnik KrasGAU. 2010; 11: 49–52.
9. Hicks Ch. Basic principles of experiment planning. Per. s engl. M.: Mir. 1967. 399 p.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
лекарственных и ароматических растений»

приглашает к сотрудничеству  
фармпроизводителей и сельхозпредприятия  
для совместного продвижения наших научных разработок.  
Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству  
и агротехнологии лекарственных и ароматических культур  
для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru

[www.vilarnii.ru](http://www.vilarnii.ru)