

СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA* × *ANANASSA*)

О.В. Яборова

к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии курсом ботаники,
Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)
E-mail: olyaaborova@mail.ru

С.А. Соснина

к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники,
Пермская государственная фармацевтическая академия (ПГФА) (г. Пермь, Россия)
E-mail: s-sa.sosnina@yandex.ru

А.Ю. Турышев

к.фарм.н., ректор, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники,
Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)
E-mail: perm@pfa.ru

В.Д. Белоногова

д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники,
Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)
E-mail: belonogova@pfa.ru

Е.Н. Люст

к.фарм.н., доцент кафедры токсикологической химии,
Пермская государственная фармацевтическая академия (г. Пермь, Россия)
E-mail: elenalyust@mail.ru

С целью стандартизации сырья земляники садовой разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Представлены результаты валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой для доказательства гарантии точности и достоверности результатов анализа сырья и последующего ее применения в системе обеспечения качества проводимых исследований.

Цель исследования. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии.

Материал и методы. Валидацию методики проводили на объединенном образце листьев земляники садовой. Параметры валидации определяли на спектрофотометрах СФ-2000 (Россия) и UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Результаты. Линейность устанавливали на пяти уровнях концентрации. Коэффициент корреляции составил 0,9997, что говорит о линейной зависимости между величинами оптической плотности и содержанием суммы флавоноидов в извлечениях. Повторяемость методики исследовали в десятикратной повторности в идентичных условиях в пределах короткого промежутка времени. Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли на трех образцах трехкратной повторности. Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трехкратной повторности в двух лабораториях. Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%. Правильность методики доказывали путем добавления в извлечение необходимого количества стандарта – рутина. Показано, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 2,24%. В результате проведенных исследований установлены валидационные характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность.

Выводы. Разработанная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой является валидной, не требует дорогостоящих реактивов, является точной, воспроизводимой и доступной, что дает возможность ее применения для достоверной оценки качества сырья.

Ключевые слова: валидация, методика количественного определения, листья земляники садовой, *Fragaria* × *anapassa*, флавоноиды, спектрофотометрия.

Для цитирования: Яборова О.В., Соснина С.А., Турышев А.Ю., Белоногова В.Д., Люст Е.Н. Стандартизация сырья земляники садовой (*Fragaria* × *anapassa*). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(9):17–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-09-03>

Одной из задач современной фармации является исследование новых видов сырья для улучшения качества лекарственного обеспечения населения и расширения номенклатуры лекарственных средств.

Земляника садовая (*Fragaria × ananassa*) широко культивируется на территории России на промышленных плантациях и личных садовых хозяйствах для получения ягод этого растения и их использования в качестве ценного пищевого продукта. При заготовке плодов другие части этого растения не используются, однако его вегетативные части являются источником получения биологически активных веществ (БАВ) и представляют интерес для фармацевтической, а также косметической промышленности [1–4]. Согласно данным литературы, экстракты листьев земляники садовой обладают значительной антиоксидантной активностью [2, 3]. Так, в исследовании на экспериментальной модели диабетической нефропатии показано положительное влияние извлечения данного растения на биохимические показатели крови экспериментальных животных [4]. В опытах *in vitro* подтверждены антимикробные свойства метанольного экстракта листьев [5].

Биологическая активность экстрактов листьев земляники садовой обусловлена наличием вторичных метаболитов фенольного характера, их содержание в сырье достигает в некоторых образцах более 3% [6–8]. При изучении качественного состава фенольного комплекса исследуемого вида сырья, в его составе были идентифицированы эллаготанины, флаванолы и их гликозиды, фенольные кислоты [9, 10]. В связи с этим листья земляники садовой являются перспективным для исследования видом сырья и разработки в дальнейшем на его основе эффективных лекарственных средств.

Учитывая, что основной группой БАВ данного сырья являются флавоноиды, авторы провели исследования по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Наиболее оптимальным методом оценки содержания в лекарственном растительном сырье данной группы веществ представляется спектрофотометрия, позволяющая проводить определение суммы флавоноидов в пересчете на доминирующее соединение и получать достоверные и воспроизводимые результаты количественного анализа. Применение дифференциального варианта метода дает возможность оценивать флавоноиды непосредственно в извлечении из сырья,

исключая влияние других веществ, поглощающих в данной области спектра.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Валидацию разработанной методики проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [11] на объединенном образце листьев земляники садовой, полученном путем смешивания в равных количествах образцов, заготовленных летом (в два периода – цветения и после плодоношения) в 2018–2019 гг. в Пермском крае, Башкортостане, Московской области. Для количественного определения использовали стандартный образец (СО) рутина (CAS № 153-18-4, производства Sigma-Aldrich).

Параметры валидации устанавливали на спектрофотометрах СФ-2000 (Россия) и UV-1800 (Shimadzu, Япония). Линейность определяли на пяти уровнях концентрации рутина. Повторяемость методики исследовали в десятикратной повторности в идентичных условиях в пределах короткого промежутка времени. Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли на трех образцах трехкратной повторности. Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трехкратной повторности в двух лабораториях. Правильность методики устанавливали путем добавления в извлечение необходимого количества стандарта – рутина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидируемая методика. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл 70%-ного этилового спирта и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному водному холодильнику. Нагревают на кипящей водяной бане 1,5 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы 70%-ным этиловым спиртом. Извлечение пропускают через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом,

отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Далее 2,0 мл раствора А (испытуемого раствора) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5%-ного в 70%-ном спирте этиловом и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3%-ного. Объем раствора доводят до метки тем же спиртом (раствор Б испытуемого раствора) и оставляют на 30 мин. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл раствора А и 1,0 мл уксусной кислоты раствора 3%-ного, доведенный до метки спиртом 70%-ным в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 1,0 мл уксусной кислоты раствора 3%-ного, доведенный спиртом 70%-ным до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A и A_0 – оптическая плотность исследуемого раствора Б испытуемого раствора и раствора Б СО рутина соответственно; a и a_0 – навеска сырья и навеска СО рутина соответственно, г; W – влажность в сырье, %; P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Приготовление растворов. Раствор СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70%-ного и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А СО рутина). Далее 1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5%-ного в спирте 70%-ном и через 10 мин 1 мл ук-

сусной кислоты раствора 3%-ного, объем раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Срок годности растворов 30 суток при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемых образцах листьев земляники садовой составило 2,81±0,088%.

Методику количественного определения суммы флавоноидов в листьях земляники садовой валидировали согласно требованиям ОФС. 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по характеристикам: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность.

Линейность определяли на пяти уровнях концентрации рутина, соответствующих 50, 75, 100, 125, 150% от среднего содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье земляники.

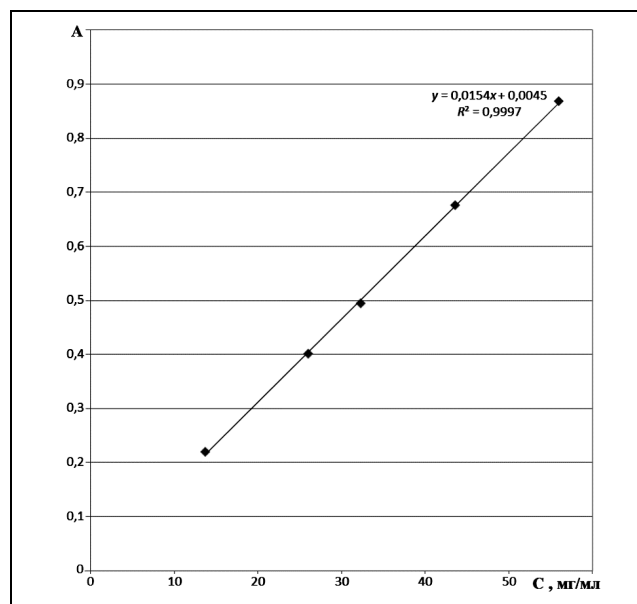


Рис. 1. График зависимости оптической плотности от концентрации СО рутина

Критерий приемлемости – коэффициент корреляции составил 0,9997; уравнение регрессии $y = bx + a$, при $b = 0,0154$; $a = 0,0045$.

Повторяемость методики определяли в десятикратной повторности, в одной лаборатории в идентичных условиях, с использованием одного и того же оборудования, одним и тем же исследователем, в пределах короткого промежутка времени. Критерий приемлемости выражали величиной относительного стандартного отклонения RSD, которое не должно превышать 10% (табл. 1).

Таблица 1. Параметры повторяемости методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники садовой

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой, %
1	2,69
2	2,92
3	2,76
4	2,87
5	2,66
6	2,77
7	2,91
8	2,83
9	2,79
10	2,86
Среднее значение	2,81
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,088

Величина RSD составила 0,088%, что не превышает допустимые 10% и свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли два провизора-аналитика кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА. Исследования проводили на трех образцах в трехкратной повторности на спектрофотометре СФ-2000 (табл. 2).

Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трехкратной повторности в двух лабораториях (на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА на спектрофотометре СФ-2000 и в лаборатории РИЦ «Фарматест» на спектрофотометре UV-1800). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15% (табл. 3).

Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных добавлением необходимого количества стандарта рутина к исследуемому раствору непосредственно в извлечение из листьев земляники садовой (табл. 4).

Таблица 2. Параметры внутрилабораторной воспроизводимости методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники садовой

Повторность	Аналитик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %		
		Московская область, г. Одинцово	Башкортостан, г. Учалы	Пермский край, г. Кунгур
1	1	2,71	2,54	2,63
2	1	2,54	2,65	2,71
3	1	2,47	2,47	2,64
4	2	2,77	2,69	2,80
5	2	2,69	2,91	2,77
6	2	2,63	2,63	2,85
Среднее значение	–	2,64	2,65	2,73
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	–	0,046	0,062	0,036

Таблица 3. Параметры межлабораторной воспроизводимости методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники садовой

№ п/п	Место заготовки	Повторность	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %	
			СФ-2000 кафедра фармакогнозии с курсом ботаники	UV-1800 РИЦ «Фарматест»
1	Пермский край, г. Кунгур	1	2,63	2,80
		2	2,71	2,77
		3	2,64	2,85
		Среднее значение	2,66	2,81
		Относительное стандартное отклонение (RSD) при $f=2$, %	0,025	0,023
2	Башкортостан, г. Учалы	1	2,54	2,69
		2	2,65	2,91
		3	2,47	2,63
		Среднее значение	2,55	2,74
		Относительное стандартное отклонение (RSD) при $f=2$, %	0,052	0,085
3	Московская область, г. Одинцово	1	2,71	2,77
		2	2,54	2,69
		3	2,47	2,63
		Среднее значение	2,57	2,70
		Относительное стандартное отклонение (RSD) при $f=2$, %	0,071	0,041

Таблица 4. Параметры правильности методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники садовой

№ п/п	Место заготовки	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье, мг	Добавлено СО рутина, мг	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, мг		Ошибка, %
				Ожидаемое	Полученное	
1	Пермский край, г. Кунгур	27,3	0,05	27,35	27,8	1,61
		27,3	0,1	27,4	27,9	1,79
		27,3	0,15	27,45	27,95	1,78
2	Башкортостан, г. Учалы	26,5	0,05	26,55	26,85	1,12
		26,5	0,1	26,60	26,75	0,56
		26,5	0,15	26,65	27,10	1,66
3	Московская область, г. Одинцово	26,4	0,05	26,45	26,90	1,67
		26,4	0,1	26,50	26,60	0,38
		26,4	0,15	26,55	26,75	0,93

Таблица 5. Метрологические характеристики методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники садовой

<i>n</i>	<i>f</i>	<i>X</i>	<i>S</i> ²	<i>S</i>	<i>P</i> , %	<i>t(P, f)</i>	ΔX	ε	δ , %
10	9	2,81	0,0078	0,088	95	2,26	0,063	0,56	2,24

Полученные результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 2,24% (табл. 5).

ВЫВОДЫ

Разработанная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях земляники садовой является валидной. Методика не требует дорогостоящих реактивов, является доступной, точной, воспроизводимой, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья – земляники садовой листьев (*Fragariae ananassae folia*).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lee D.S., Kim K.H., Yook H.S. Cosmetic effects of the fractional extracts from strawberry (*Fragaria ananassa* var. 'Seolhyang') leaf. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2018.
2. Aaby K., Skrede G., Wrolstad R.E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). Journal of Agricultural and Food chemistry. 2005; 53(10): 4032–4040.
3. Simirgiotis M.J., Schmeda-Hirschmann G. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD–ESI-MS and free radical quenching techniques. Journal of Food Composition and Analysis. 2010; 23(6): 545–553.
4. Ibrahim D.S., Abd El-Maksoud M.A.E. Effect of strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. International Journal of Experimental Pathology. 2015; 96(2): 87–93.
5. El-Mesallamy A.M.D., et al. Phenolic composition and biological activities of methanolic extract of strawberry leaves (*Fragaria ananassa*). Natural Products: An Indian Journal. 2013; 9: 251–265.
6. Ежов Л.А., Толстова Т.В. Земляника: (рекомендации по изучению биологии и агротехники возделывания земляники в личных садах). Пермь: Звезда, 2000; 56 с. [Ezhov L.A., Tolstova T.V. Zemljaniika: (rekomentacii po izucheniju biologii i agrotehniki vzdelyvaniia zemljani-ki v lichnyh sadah). Perm': Zvezda, 2000; 56 s. (In Russian)].
7. Петухова О.В. Фармакогностическое изучение листьев земляники лесной и садовой региона Урала: Автореф. дисс. ... канд. наук. Пермь, 2003; 24 с. [Petuhova O.V. Farmakognosticheskoe izuchenie list'ev zemljaniiki lesnoj i sadovoj regiona Urala: Avtoref. diss. ... kand. nauk. Perm', 2003; 24 s. (In Russian)].
8. Петухова О.В., Иванова Г.А., Олешко Г.И. Флавоноиды листьев земляники лесной и садовых сортов региона Урала. Фармация. 2003; 5: 19 [Petuhova O.V., Ivanova G.A., Oleshko G.I. Flavonoidy list'ev zemljaniiki lesnoj i sadovyh sortov regiona Ura-la. Farmacija. 2003; 5: 19 (In Russian)].
9. Kårlund A., Salminen J., Koskinen P., Ahern J., et al. Polyphenols in strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaves induced by plant activators. Journal of agricultural and food chemistry. 2014; 62(20): 4592–4600.
10. Karlińska E., Masny A., Cieslak M., et al. Ellagitannins in roots, leaves, and fruits of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) vary with developmental stage and cultivar. Scientia Horticulturae. 2021; 275: 109665.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. В 4-х томах. Федеральная электронная медицинская библиотека. М., 2018. Режим доступа: <http://femb.ru>.

Поступила после доработки 26 мая 2021 г.

TO THE QUESTION OF STANDARDIZATION OF RAW MATERIALS OF STRAWBERRY (*FRAGARIA × ANANASSA*)

© Authors, 2021

O.V. Yaborova

Ph.D. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

E-mail: olyayaborova@mail.ru

S.A. Sosnina

Ph.D. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

E-mail: s-sa.sosnina@yandex.ru

A.Yu. Turyshev

Ph.D. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

E-mail: perm@pfa.ru

V.D. Belonogova

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

E-mail: belonogova@pfa.ru

E.N. Lyust

Ph.D. (Pharm.), Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

E-mail: elenalyust@mail.ru

In order to standardize the raw materials of garden strawberries, we have developed a method for quantifying the amount of flavonoids in terms of rutin. The article presents the results of validation of the method of quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of rutin in strawberry leaves to prove the guarantee of accuracy and reliability of the results of the analysis of raw materials and its subsequent application in the quality assurance system of research.

Purpose. Validation of the method of quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of rutin in strawberry leaves using the method of differential spectrophotometry.

Material and methods. Validation of the method was performed on a combined sample of strawberry leaves. Validation parameters were determined using SF-2000 and SHIMADZU UV-1800 spectrophotometers.

Results. Linearity was determined at five levels of concentration. The correlation coefficient was 0.9997, which indicates a linear relationship between the values of the optical density and the content of the sum of flavonoids in the extracts. The repeatability of the technique was determined in tenfold repetition under identical conditions within a short period of time. The intra-laboratory reproducibility of the technique was determined on three samples of three-fold repetition. Interlaboratory reproducibility of the technique was performed on three samples in three-fold repetition in two laboratories. The results of the determination confirm the precision of the method in the conditions of intra-laboratory and inter-laboratory reproducibility, since the relative standard deviation did not exceed 15%. The correctness of the method was established by adding the required amount of standard routine to the extraction. The results of the analysis showed that the analysis error is within the error of a single definition and does not exceed 2.24%.

As a result of the conducted studies, the validation characteristics of the method for quantifying the amount of flavonoids in terms of rutin in the leaves of strawberry garden were established: linearity, precision (repeatability, reproducibility) and correctness.

Conclusions. The developed method of spectrophotometric determination of the amount of flavonoids in terms of rutin in strawberry leaves is valid, does not require expensive reagents, is accurate, reproducible and accessible, which makes it possible to use it for a reliable assessment of the quality of raw materials.

Key words: validation, methods of quantitative determination, strawberry leaves, *Fragaria ananassa*, flavonoids, spectrophotometry.

For citation: Yaborova O.V., Sosnina S.A., Turyshev A.Yu., Belonogova V.D., Lyust E.N. To the question of standardization of raw materials of strawberry (*Fragaria × ananassa*). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(9):17–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-09-03>



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