

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ВОЛОДУШКИ МНОГОЖИЛКОВОЙ ТРАВЕ

С.А. Петухова, А.А. Посохина, В.М. Мирovich

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск

Для цитирования: Петухова С.А., Посохина А.А., Мирovich В.М. Разработка методики спектрофотометрического количественного определения суммы флавоноидов в володушки многожилковой траве // Аспирантский вестник Поволжья. – 2020. – № 5–6. – С. 170–174. DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.170-174>

Поступила: 16.07.2020

Одобрена: 21.08.2020

Принята: 14.09.2020

■ Предложена методика количественного определения флавоноидов для анализа травы володушки многожилковой (*Bupleurum multinerve*) на основе метода дифференциальной спектрофотометрии. Определены оптимальные условия анализа: экстрагент 40 % спирт этиловый, соотношение сырья и экстрагента 1 : 100, время экстракции 60 мин на кипящей водяной бане, комплексообразователь 1 мл 2 % алюминия хлорида. Экспериментально обосновано применение рутина в качестве стандарта, аналитическая длина волны 412 нм. Относительная ошибка среднего результата (при $n = 9$) составила $\pm 3,20$ %. Исследования по валидации методики показали ее соответствие критериям: линейность ($r = 0,99988$), правильность, специфичность, прецизионность. Аналитическая область методики 8,67–26,08 мкг/мл. Методика рекомендована для включения в новую редакцию фармакопейной статьи на данный вид сырья.

■ **Ключевые слова:** *Bupleurum multinerve*; трава; дифференциальная спектрофотометрия; количественное определение; флавоноиды.

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL FLAVONOIDS IN *BUPLEURUM MULTINERVE* HERB

S.A. Petukhova, A.A. Posokhina, V.M. Mirovich

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

For citation: Petukhova SA, Posokhina AA, Mirovich VM. Development of the method for spectrophotometric quantitative determination of the total flavonoids in *Bupleurum multinerve* herb. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhiya*. 2020;(5-6):170–174. DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.170-174>

Received: 16.07.2020

Revised: 21.08.2020

Accepted: 14.09.2020

■ The article presents the method for the quantitative determination of flavonoids for the analysis of *Bupleurum multinerve* herb based on the method of differential spectrophotometry. The optimal conditions for analysis have been determined. They include extractant 40% ethyl alcohol, ratio of raw materials and extractant 1 : 100, extraction time of 60 minutes in the boiling water bath, complexing agent of 1 ml of 2% aluminum chloride. The use of rutin as a standard has been experimentally validated, analytical wavelength is 412 nm. The relative error of the mean result (for $n = 9$) was $\pm 3.20\%$. Validation studies of the method have shown that it meets the criteria: linearity ($r = 0.99988$), correctness, specificity, and precision. The analytical range of the method is 8.67–26.08 $\mu\text{g/ml}$. The method is recommended for the inclusion into the new edition of the Pharmacopoeia Monograph for this type of plant material.

■ **Keywords:** *Bupleurum multinerve*; herb; differential spectrophotometry; quantitative determination; flavonoids.

Введение

Володушка многожилковая (в. многожилчатая) — *Bupleurum multinerve* DC. семейства сельдерейных *Ariaceae* — многолетнее травянистое растение высотой 15–90 см. Листья

прикорневые удлинено ланцетные, стеблевые сидячие яйцевидные, у основания расширенные, стеблеобъемлющие. Цветки пятимерные с желтым венчиком мелкие, собраны в сложные зонтики, у зонтичков обертки крупные

лимонно-желтого цвета с заостренной верхушкой, плоды — вислоплодники [1].

B. multinerve имеет дизъюнктивный ареал. Встречается на опушках лесов, в степных и высокогорных лугах в Европейской части России, южных районах Сибири, Монголии [1, 5].

В надземных органах *B. multinerve*, произрастающей в Западной Сибири и Бурятии, установлено содержание флавоноидов изорамнетина, кверцетина, рутина, нарциссина, кемпферола, изокверцитрина, изорамнетин-3-О-глюкозида [3, 5]. В надземных органах *B. multinerve* флоры Бурятии исследовались фенилпропаноиды. Установлено содержание 3-О-кофеилхинной кислоты 0,97 мг/г, 1,3-ди-О-кофеилглицерина 0,08 мг/г 5-О-кофеилхинной кислоты 0,57 мг/г, в стеблях содержалась 4-О-кофеилхинная кислота 0,41 мг/г и 1,3-ди-О-кофеилхинная кислота 0,17 мг/г [6].

Биологически активные вещества, преимущественно флавоноиды, *B. multinerve* обладают Р-витаминной активностью и растение применяется при отеках сосудистого происхождения, капилляротоксикозах, а также как желчегонное, противовоспалительное [4].

Качество сырья *B. multinervis herba* регламентируется нормативным документом ВФС 42-580-76. Документ не соответствует современным требованиям к фармакопейным статьям. Во вводной части статьи указывается, что сырье предназначено для получения препарата Буплерина (в настоящее время препарат не выпускается). В раздел «Количественное определение» включен хроматоспектрофотометрический метод, предусматривающий экстракцию сырья 95 % этиловым спиртом при настаивании в течении 24 ч с последующей исчерпывающей экстракцией этим же растворителем. Далее после концентрирования извлечения проводят количественно разделение флавоноидов методом бумажной хроматографии в системе уксусная кислота 85 % – муравьиная кислота – вода (10 : 2 : 3) (время разделения 24 ч). Хроматограмма после высушивания обрабатывается 10 % спиртовым раствором алюминия хлорида. Пятна флавоноидов вырезают и элюируют 95 % этиловым спиртом, измеряют оптическую плотность при 420 нм. Расчет процентного содержания проводят по калибровочному графику, построенному по рутину. Недостатки методики: длительность исполнения, измерение оптической плотности при 420 нм флавоноидов в комплексе с хлоридом алюминия. Расчет процентного содержания проводят по рутину без добавления хлорида алюминия.

Приведенные данные указывают на необходимость совершенствования методики

количественного определения флавоноидов в сырье *B. multinerve* для включения в фармакопейную статью.

Целью работы является разработка и валидация методики количественного анализа суммы флавоноидов в сырье *Bupleurum multinerve herba*.

Материалы и методы

Исследования проведены на образцах сырья *B. multinerve*, собранных в период массового цветения в южных районах Прибайкалья в 2018–2019 гг. Надземные органы *B. multinerve* срезали и сушили воздушно-теньевым способом. Абсолютная влажность сырья составляла 9,8 %. Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах LEKI SS 1207 и СФ-2000 в кварцевых кюветах (1 см). Стандартный образец рутина соответствовал ФС 42-2508-87. Статистический анализ проводили при доверительной вероятности $p = 95 \%$ по ГФ XIV [2].

Результаты и обсуждение

Спиртовое извлечение из *B. multinerve* травы имеет в электронном спектре основные максимумы поглощения при 350 и 264 нм. В дифференциальном спектре спиртового извлечения в присутствии алюминия хлорида максимум поглощения длинноволновой части спектра смещается до 412 нм. Дифференциальный спектр извлечения *B. multinerve* совпадает с дифференциальным спектром рутина, который выбран нами в качестве стандартного образца (СО).

Экспериментальные данные показали, что оптимальным экстрагентом является 40–60 % этиловый спирт. Для полноты экстракции достаточно использование 40 % этилового спирта (табл. 1).

Степень измельченности сырья влияет на процесс экстракции биологически активных веществ, максимальное количество флавоноидов *B. multinerve* извлекается при размере частиц 1–2 мм. Однократная экстракция в течение 60 мин на кипящей водяной бане при соотношении сырье – экстрагент 1 : 100 соответствует исчерпывающей экстракции.

При аликвоте извлечения в количестве 2 мл оптимальное количество 2 % хлорида алюминия, необходимое для образования комплекса 1 мл. Стабилизация комплекса наблюдается через 45 мин и сохраняется до 1,5 ч.

Методика количественного определения суммы флавоноидов. Точную навеску сырья около 1,0000 г, измельченного до частиц размером

Таблица 1 / Table 1

Содержание суммы флавоноидов в зависимости от условий экстракции сырья *B. multinerve*

The content of the total flavonoids depending on the conditions of extraction of raw material of *B. multinerve*

Условия эксперимента	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент	
Спирт этиловый 20 %	2,25 ± 0,05
» » 30 %	3,23 ± 0,08
» » 40 %	3,37 ± 0,09
» » 50 %	3,36 ± 0,05
» » 60 %	3,37 ± 0,03
» » 70 %	3,10 ± 0,05
» » 80 %	2,84 ± 0,03
» » 90 %	1,53 ± 0,01
» » 96 %	1,24 ± 0,01
Размер частиц сырья, мм	
5	1,34 ± 0,03
3	2,88 ± 0,04
2	3,37 ± 0,05
1	3,38 ± 0,08
0,5	3,25 ± 0,05
Соотношение сырье : экстрагент	
1 : 25	1,77 ± 0,02
1 : 30	1,92 ± 0,02
1 : 50	2,74 ± 0,06
1 : 100	3,38 ± 0,05
1 : 150	3,36 ± 0,09
Время экстракции (однократная экстракция), мин	
45	2,64 ± 0,03
60	3,35 ± 0,06
90	3,36 ± 0,05
Кратность экстракции	
2 раза 1 : 50	3,25 ± 0,08
3 раза 1 : 50	3,35 ± 0,06

Примечание. Жирным шрифтом выделена максимальная экстракция флавоноидов при соответствующих условиях экстракции.

Note. The maximum extraction of flavanoids under the appropriate extraction conditions is highlighted in bold.

1 мм, помещают в колбу объемом 250 мл и прибавляют 100 мл 40 % этилового спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию проводят на кипящей водяной бане в течение 1 ч, извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, при этом отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

В 2 мерные колбы объемом 25 мл помещают по 2 мл фильтрата. В первую колбу добавляют 1 мл 2 % спиртового раствора хлорида алюминия и доводят до метки 96 % этиловым спиртом. Во вторую колбу (раствор сравнения) добавляют 0,1 мл 30 % раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96 % этиловым спиртом. Измерение оптической плотности проводят через 45 мин на спектрофотометре при длине волны 412 нм.

Приготовление раствора СО рутина. Испытуемый раствор: 1 мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 2 % спиртового раствора хлорида алюминия и доводят колбу до метки 96 % этиловым спиртом. Раствор сравнения: 1 мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 0,1 мл 30 % раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96 % этиловым спиртом. Оптическую плотность измеряют через 45 мин при длине волны 412 нм.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по формуле (1):

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot V_4 \cdot V_5 \cdot V_6 \cdot (100 - W)} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где V_1 — объем извлечения, 100 мл; V_2 — объем разведения извлечения, 25 мл; V_3 — аликвота раствора СО рутина, 1 мл; V_4 — аликвота извлечения, 2 мл; V_5 — объем разведения СО рутина, 25 мл; V_6 — объем СО рутина, 50 мл; m — масса сырья, г; m_0 — масса рутина, г; W — абсолютная влажность сырья, %.

Примечание. Приготовление СО рутина. Около 0,0250 г рутина помещают в мерную колбу объемом 50 мл и добавляют 30 мл 96 % этилового спирта, нагревают на водяной бане до растворения и охлаждают. Далее раствор доводят до метки 96 % этиловым спиртом.

Допускается в расчетах использование удельного показателя поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия по формуле (2):

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W)}, \quad (2)$$

где D — оптическая плотность извлечения; $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения

Таблица 2 / Table 2

Метрологические характеристики метода анализа флавоноидов в сырье *B. multinerve*
 Metrological characteristics of the method of analysis of flavonoids in raw material of *B. multinerve*

f	\bar{X} , %	S	$S\bar{X}$	P , %	$t(P, f)$	$\Delta\bar{X}$	\bar{E} , %
8	3,39	0,14111	0,04704	95	2,31	$\pm 0,11$	$\pm 3,20$

Таблица 3 / Table 3

Результаты опытов с добавками рутина к извлечению из *B. multinerve*
 Results of experiments with the addition of rutin to the extraction from *B. multinerve*

Содержание суммы флавоноидов в аликвоте, мкг	Количество стандартных образцов рутина, добавленных к аликвоте, мкг	Рассчитанное количество суммы флавоноидов, мкг	Найдено суммы флавоноидов, мкг	Ошибка	
				абс., мкг	отн., %
339,11	20	359,11	362,70	+3,59	1,00
339,11	20	359,11	348,12	-10,99	3,06
339,11	20	359,11	364,85	+5,74	1,60
339,11	40	379,11	384,10	+4,99	1,32
339,11	40	379,11	386,15	+7,04	1,86
339,11	40	379,11	375,28	-3,83	1,01
339,11	80	419,11	425,80	+6,69	1,60
339,11	80	419,11	402,44	-12,67	3,02
339,11	80	419,11	402,15	+6,96	1,66

рутина с $AlCl_3$ при $\lambda = 412$ нм в 96 % этиловом спирте, равный 258; m — навеска сырья, г; W — абсолютная влажность сырья, %.

Статистический анализ результатов количественного определения показал, что относительная ошибка среднего результата составляет $\pm 3,20$ % (табл. 2).

Опыты с добавками СО рутина в трех концентрациях показали, что относительная ошибка находится в пределах относительной ошибки методики, что указывает на отсутствие систематической ошибки предлагаемой методики (табл. 3).

Разработанной методикой проанализировано 5 партий сырья *B. multinerve*, содержание суммы флавоноидов составляло от $2,65 \pm 0,08$ до $3,38 \pm 0,05$ %. Предложена норма содержания суммы флавоноидов «не менее 2 %».

Исследование линейности методики проводили с использованием СО рутина в концентрациях от нормируемого значения 100 %, а также 50, 75, 125, 150, 175 %.

Аналитическая область методики находится в пределах концентрации рутина (в измеряемом объеме) 8,67–26,08 мкг/мл.

Линейность методики подтверждается графиком зависимости оптической плотности от концентрации рутина (см. рисунок). Коэффициент корреляции составляет 0,99988 (допускается $|r| \geq 0,98$) [2], график описывается уравнением $y = 0,0230 \cdot x + 0,0002$.

Правильность методики подтверждена в опытах с рутином в концентрациях 75, 100,

125 и 150 % нормируемого значения. Средний процент восстановления при 3-кратной повторности для каждой концентрации составил 102,39 %.

Прецизионность методики оценивали по величине RSD (относительное стандартное отклонение) и критерию Стьюдента (t). Величина RSD в опытах в разные дни не превышала 2,32 %, в двух разных лабораториях была не более 2,76 %. При этом экспериментально найденный коэффициент Стьюдента меньше табличного. Изучение электронного

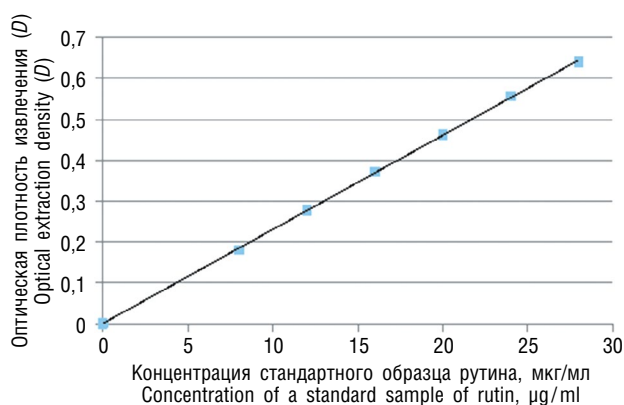


Рисунок. График линейной зависимости оптической плотности рутина от его концентрации в измеряемом растворе

Figure. Graph of the linear dependence of the optical density of rutin on its concentration in the measured solution

спектра измеряемого раствора *B. multinerve* и СО рутина показало их совпадение при длине волны 412 нм, что свидетельствовало о специфичности методики.

Заключение

Разработана методика спектрофотометрического количественного определения суммы флавоноидов в сырье *Bupleuri multinervis herba* для включения в новую редакцию фармакопейной статьи на данный вид сырья. Валидационная оценка показала соответствие предлагаемой методики критериям: правильность, линейность, прецизионность, специфичность. Рекомендуемая норма содержания суммы флавоноидов — не менее 2 %.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Астащенко А.Ю., Черемушкина В.А. Состояние ценопопуляций *Bupleurum multinerve* DC. в различных условиях Хакасии и Алтая // Растительный мир Азиатской России. — 2009. — Т. 1. — № 1. — С. 94–99. [Astashenkov A Ju, Cheremushkina VA. Sostojanie cenopopuljacij Bupleurum multinerve DC. v razlichnyh uslovijah Hakasii i Altaja. *Rastitel'nyj mir Aziatskoj Rossii*. 2009;1(1):94–99. (In Russ.)]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Дата обращения: 10.09.2020. [Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIV izdanie [Internet]. Available from: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 10.09.2020. (In Russ.)]
3. Минаева В.Г., Волхонская Т.А., Валуцкая А.Г. Сравнительное изучение флавоноидного состава некоторых сибирских видов володушки // Растительные ресурсы. — 1985. — Т. 21. — № 2. — С. 233–235. [Minaeva VG, Volhonskaja TA, Valuckaja AG. Sravnitel'noe izuchenie flavonoidnogo sostava nekotoryh sibirskih vidov volodushki. *Rastitel'nye resursy*. 1985;21(2):233–235. (In Russ.)]
4. Саратиков А.С., Минаева В.Г., Лившиц Н.С. и др. Новые фармакологические свойства препарата буплерина из надземной части *Bupleurum multinerve* DC // Растительные ресурсы. — 1990. — Т. 26. — № 1. — С. 88–90. [Saratikov AS, Minaeva VG, Livshic NS, et al. Novye farmakologicheskie svojstva preparata buplerina iz nadzemnoj chasti *Bupleurum multinerve* DC. *Rastitel'nye resursy*. 1990;26(1):88–90. (In Russ.)]
5. Altantsetseg S, Shatar S, Javzmaa N. Comparative study of essential oil constituents of *Bupleurum* species from Mongolia. *Mongolian Journal of Chemistry*. 2012;13(39):28–30. <https://doi.org/10.5564/mjcv13i0.156>.
6. Olennikov DN, Partilkaev VV. Flavonoids and phenylpropanoids from several species of *Bupleurum* growing in Buryatia. *Chem Nat Compd*. 2013;48(6):1078–1082. <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0471-x>.

Информация об авторах

Светлана Андреевна Петухова — кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии. ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск. E-mail: lanapetukhova@gmail.com.

Алина Алексеевна Посохина — соискатель кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии. ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск. E-mail: alinapos@yandex.ru.

Вера Михайловна Минович — доктор фармацевтических наук, заведующая кафедрой фармакогнозии и фармацевтической технологии. ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск. E-mail: mirko02@yandex.ru.

Information about the authors

Svetlana A. Petukhova — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior Lecturer, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Technology, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia. E-mail: lanapetukhova@gmail.com.

Alina A. Posokhina — Applicant of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Technology. Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia. E-mail: alinapos@yandex.ru.

Vera M. Mirovich — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Head of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Technology. Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia. E-mail: mirko02@yandex.ru.