



Э.Э. Котова, Н.И. Тихоненко, А.Г. Котов

Стандартизация травы душицы по количественному содержанию флавоноидов

Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств, г. Харьков

Ключеві слова: лікарська рослинна сировина, стандартизація, материнки трава, флавоноїди, метод спектрофотометрії, монографія Державної Фармакопеї України.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, стандартизация, душицы трава, флавоноиды, метод спектрофотометрии, монография Государственной Фармакопеи Украины.

Key words: herbal drug, standardization, oregano herb, flavonoids, method of spectrophotometry, monograph of State Pharmacopoeia of Ukraine.

При використанні підходів Європейської Фармакопеї до стандартизації лікарської рослинної сировини, що містить флавоноїди, розроблено спектрофотометричну методику визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів у траві материнки у перерахунок на лютеолін-7-глюкозид. Розроблену методику запропоновано для включення в національну монографію Державної Фармакопеї України на даний вид лікарської рослинної сировини.

При использовании подходов Европейской Фармакопеи к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, разработана спектрофотометрическая методика определения количественного содержания суммы флавоноидов в траве душицы в пересчете на лютеолин-7-глюкозид. Разработанная методика предложена для включения в национальную монографию Государственной Фармакопеи Украины на данный вид лекарственного растительного сырья.

Using EP approaches to the standardization of herbal drug containing flavonoids, the spectrophotometric method for the assay of the sum of flavonoids in the oregano herb, calculated as luteolin-7-glucoside, was developed. This method has been proposed for the inclusion to the SPU as monograph for this herbal drug.

Ранее в работе [1] показаны проблемы, обнаруженные при разработке монографии Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) на такой широко используемый вид лекарственного растительного сырья (ЛРС), как трава душицы. Поскольку в двух базовых документах, используемых при разработке монографии ГФУ на ЛРС, а именно монографии Европейской Фармакопеи (ЕФ) (в данном случае это монография «*Oregano*» [2]) и статьи ГФ XI («Трава душицы» [3]), описываются разные виды сырья (ЕФ описывает ЛРС *Origanum onites* L. и *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link.) J. et Sw., в то время как официальным видом флоры Украины является *Origanum vulgare* L. В работе [1] показана необходимость разработки национальной монографии на использующийся в Украине вид душицы – *Origanum vulgare* L. На основании исследований, проведенных группой отдела ГФУ, занимающейся созданием монографий на ЛРС, разработана национальная монография «Материнки трава», которая включена в Дополнение 3 к ГФУ [4]. Данная монография содержит как требования статьи ГФ XI (разделы «Макроскопия», «Микроскопия», «Посторонние примеси» и др.), так и новые, разработанные с учетом подходов ЕФ, требования к идентификации сырья методом ТСХ.

В то же время, вопрос относительно объективной оценки количественного содержания биологически активных веществ (БАВ) сырья остался не до конца решенным, поскольку в монографии ГФУ оценивается только содержание эфирного масла с регламентацией ГФ XI: не менее 0,1% для цельного сырья и не менее 0,08% для измельченного сырья. Очевидно, что данный подход к стандартизации сырья не позволяет объективно оценить количественный состав БАВ сырья и не объясняет

всего спектра фармакологического действия препаратов на основе данного вида ЛРС.

В работе [1] сообщалось о разнообразии химического состава БАВ травы душицы: это компоненты эфирного масла (его качественный и количественный состав в значительной мере зависит от хеморасы душицы [5]), тритерпеноиды, сапонины, алкалоиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества и флавоноиды. Среди компонентов полифенольного комплекса душицы обыкновенной выделяют лютеолин и его гликозиды, космосин (апигенин-7-глюкозид), хризин и его гликозиды [6,7], т.е. флавоноидная фракция ЛРС представлена, в основном, флавоновыми производными.

Препараты душицы используют при бронхитах как отхаркивающее, при гастритах – для усиления секреции желудка, при холециститах и дискинезии желчевыводящих путей, при бессоннице, нервных расстройствах [8]. Учитывая, что флавоны обладают бактерицидным, спазмолитическим, гипотензивным действием, представляется перспективным вопрос об изучении возможности стандартизации душицы по данному классу БАВ.

Цель работы

Разработка методики количественного определения флавоноидных соединений душицы обыкновенной для включения в национальную монографию ДФУ на данный вид ЛРС.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследований использовали 10 образцов сырья травы душицы (*Origanum vulgare* L.), собранные в разных регионах Украины в 2007–2009 гг. (табл. 1).

Таблиця 1

Результати аналізу досліджуваних зразків трави душици по розробленій методикі

Образец	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин
1 (трава душицы 2007 года сбора, НВФК «ЭЙМ»)	2,7 %	1,65 %
2 (трава душицы 2007 года сбора, Харьковская область)	2,4 %	1,47 %
3 (трава душицы 2007 года сбора, Харьковская область)	2,4 %	1,47 %
4 (трава душицы 2007 года сбора, Сумская область)	2,0 %	1,2 %
5 (трава душицы 2007 года сбора, ЗАО «Лектравы»)	2,16 %	1,32 %
6 (трава душицы 2009 года сбора, Харьковская область)	1,7 %	1,05 %
7 (трава душицы 2009 года сбора, Харьковская область)	2,0 %	1,2 %
8 (трава душицы 2009 года сбора, Сумская область)	1,75 %	1,07 %
9 (трава душицы 2009 года сбора, Харьковская область)	1,85 %	1,1 %
10 (трава душицы 2009 года сбора, Полтавская область)	1,95 %	1,2 %

Исследования проводили методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях; качественный состав флавоноидной фракции серий травы душицы изучали методом тонкослойной хроматографии [2,4].

Результаты и их обсуждение

Спектрофотометрическая методика количественного определения флавоноидов в траве душицы включена в действующий до настоящего времени на территории России стандарт «Трава душицы» (ГОСТ 2103-93). Методика основана на широко используемой ранее стандартизаторами ЛРС цветной реакции с раствором алюминия хлорида, которая характерна практически для всех веществ флавоноидной природы. В качестве стандарта, на который производится пересчет флавоноидов сырья, в методике используют стандарт лютеолина.

Ранее [9] мы сообщали, что ЕФ для близких классов БАВ, таких как флавоноиды, использует унифицированные методики количественного контроля в разных видах ЛРС, и данный подход принят как одно из основных требований при разработке фармакопейных монографий.

Учитывая это, изучена возможность определения содержания флавоноидов в траве душицы с использованием ЕФ-методики определения гликозидов флавоноидов методом спектрофотометрии (СФ). Методика заключается в следующем: навеску измельченного сырья обрабатывают при нагревании спиртом (60% об/об); полученный экстракт после охлаждения и фильтрования количественно переносят в мерную колбу; аликвоту полученного раствора выпаривают, после выпаривания остаток обрабатывают смесью кислоты борная – кислота щавелевая в среде кислота муравьиная – кислота уксусная [10–14]. Определяют оптическую плотность образующегося при этом окрашенного раствора при длине волны максимума поглощения (от 401 до 410 нм, в зависимости от того, какие конкретно соединения флавоноидной природы преобладают в исследуемом сырье). В работе [15] отмечено, что данная методика позволяет оценить общее содержание как флавонолов (гиперозид, рутин и др.), так и флавонов (гликозиды апигенина, лютеолина и др.).

Первоначально методом ТСХ изучен качественный состав флавоноидной фракции нескольких серий травы душицы, причем изучали как метанольные экстракты сырья для идентификации гликозидов флавоноидов (рис. 1), так и экстракты, подвергнутые кислотному гидролизу для обнаружения их агликонов (рис. 2). Проведенные исследования подтвердили наличие в анализируемом сырье флавонов, что согласовывалось с данными, приведенными в работе [7]. Это явилось основанием для разработки методики количественного определения гликозидов флавоноидов душицы в пересчете на стандарт флавоновой природы.

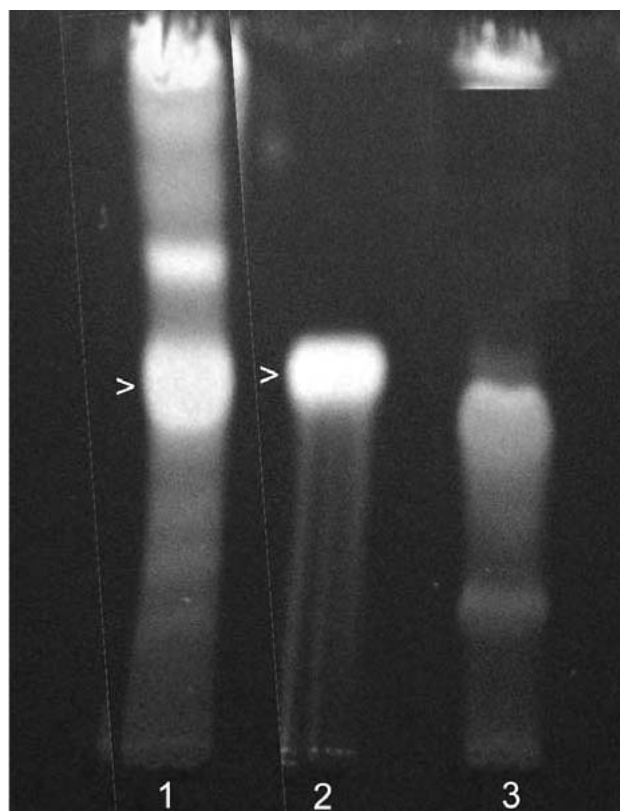


Рис. 1. Хроматограммы метанольного экстракта душицы (1), раствора лютеолин-7-глюкозида (2), раствора рутина, гиперозида, кислоты кофейной (3).

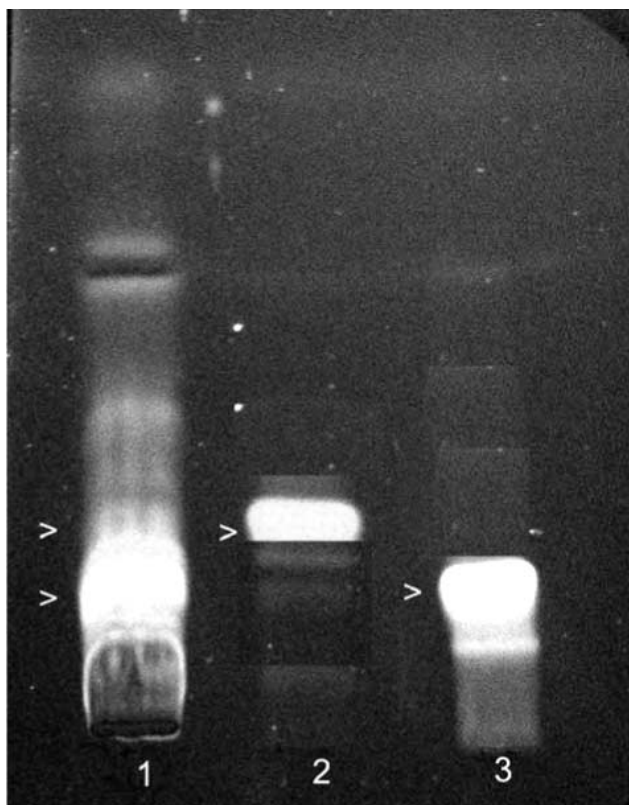


Рис. 2. Хроматограммы метанольного экстракта душицы после гидролиза (1), раствора апигенина (2), раствора лютеолина (3).

При выборе стандарта, на который будет производиться пересчет содержания суммы флавоноидов, измерены спектры поглощения полученных по методике окрашенных комплексов стандартных образцов лютеолин-7-глюкозида и лютеолина и сравнены со спектром поглощения испытуемого раствора душицы, также полученного в условиях методики.

Спектры поглощения приведены на рис. 3, из которого видно, что все 3 спектра имеют четко выраженный максимум при длине волны 409 ± 2 нм.

Таким образом, в качестве стандарта допустимо использование как агликона лютеолина, так и его гликозида. Разница при расчете содержания суммы флавоноидов душицы, в пересчете на лютеолин и лютеолин-7-глюкозид, составляла около 1,6 раза, что объяснялось разницей в значениях удельных показателей поглощения их комплексов (для лютеолина – 1140, для лютеолин-7-глюкозида – 700, что связано с разницей в их молекулярных массах). Выбор остановлен на лютеолин-7-глюкозиде, учитывая, что в сырье, заготовленном надлежащим образом, содержатся, в основном, гликозиды флавоноидов.

При разработке методики использован ФСО ГФУ лютеолин-7-глюкозида. Не исключается использование лютеолина в качестве стандарта, на который производится пересчет содержания суммы флавоноидов, с соответствующим коэффициентом пересчета на лютеолин-7-глюкозид.

По разработанной методике проанализированы 10 образцов сырья травы душицы (*Origanum vulgare* L.), собранные в разных регионах Украины в 2007–2009 гг. Результаты анализа приведены в табл. 1. Полученные результаты показали возможность регламентации содержания суммы флавоноидов в траве душицы в пределах не менее 1,5%.

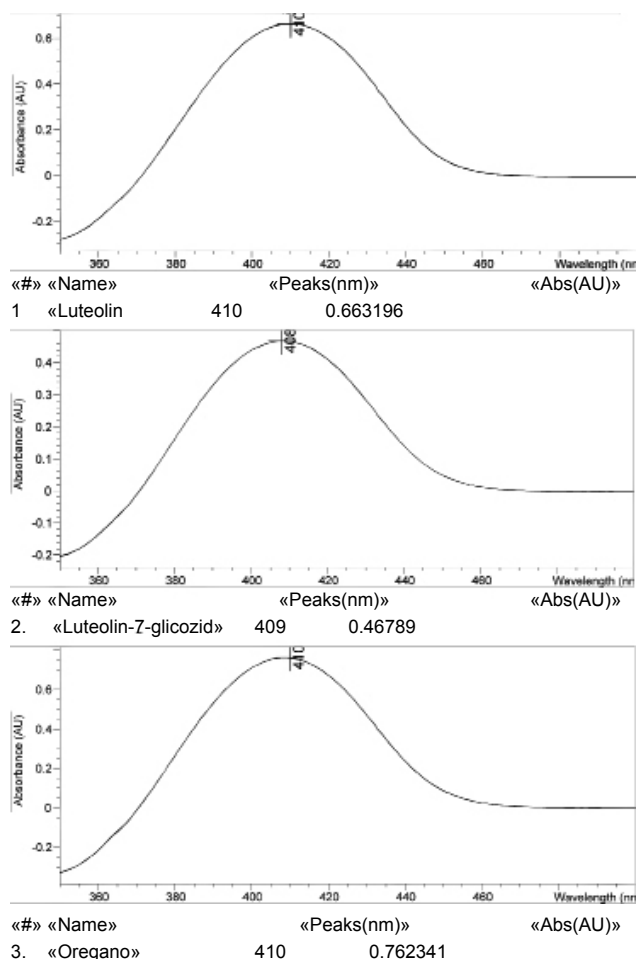


Рис. 3. УФ-спектры комплексов лютеолина (1), лютеолин-7-глюкозида (2), испытуемого раствора сырья (3), полученные в условиях разработанной методики.

Введение методики количественного определения в национальную монографию ГФУ предусматривает целый комплекс валидационных исследований. При разработке методики в первую очередь проверяли полноту экстракции флавоноидов из сырья, для чего шрот после двукратной экстракции спиртом (60% об/об) дополнительно обрабатывали тем же растворителем в аналогичных условиях и проводили определение суммы флавоноидов по описанной методике. Полученная при этом оптическая плотность испытуемых растворов (фоновое поглощение) имела значение не более $-0,001$. Таким образом, фоновое поглощение в условиях методики имело статистически незначимое значение, что, в свою очередь, свидетельствовало о достаточной полноте экстракции определяемых БАВ.

Изучены следующие валидационные характеристики методики: линейность, диапазон использования, стабильность, прецизионность и правильность.

Для проверки линейности методики приготовлены 5 окрашенных растворов комплекса лютеолин-7-глюкозида с реактивом с концентрацией от 0,1 мг до 0,6 мг лютеолин-7-глюкозида в растворе (25 мл), измерена их оптическая плотность при длине волны 409 нм и построен график зависимости оптической плотности от концентрации флавоноида в растворе (рис. 4).

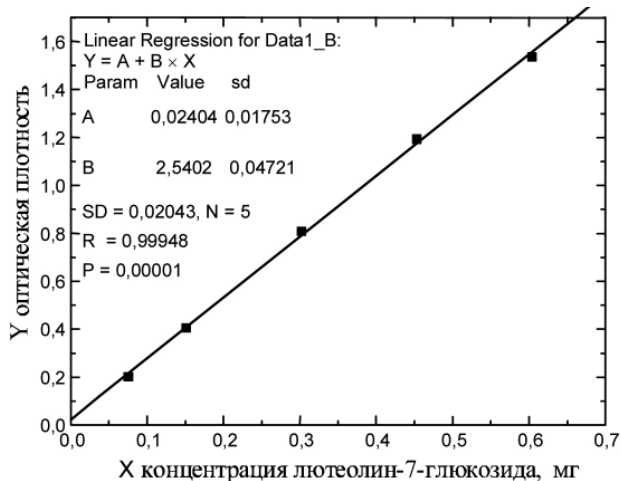


Рис. 4. График зависимости оптической плотности растворов лютеолин-7-глюкозида от его концентрации.

Как видно из рис. 4, зависимость оптической плотности (Y) от концентрации лютеолин-7-глюкозида (X) выражается уравнением: $Y = A + B \times X$, где $A = 0,02404 \pm 0,01753$, $B = 2,5402 \pm 0,04721$, коэффициент корреляции $R = 0,99948$, т.е. методика имеет линейный характер в диапазоне концентраций от 4 до 24 мкг/мл лютеолин-7-глюкозида.

Проверена стабильность испытуемых растворов травы душицы и растворов лютеолин-7-глюкозида во времени: установлено, что растворы стабильны в течение 20–30 мин с момента приготовления, поэтому в методике четко оговорено время измерения оптической плотности – не позже 30 мин после приготовления раствора.

«#» «Name»	«#» «Name»
Abs<409 nm>	Abs<409 nm>
1 «Oregon 10 min» 0.2419	1 «Lut.-7 gl. 10 min» 0.2408
2 «20 min» 0.2473	2 «20 min» 0.2416
3 «30 min» 0.2475	3 «30 min» 0.2421
4 «40 min» 0.2545	4 «40 min» 0.2558
5 «50 min» 0.2590	5 «50 min» 0.2611
6 «60 min» 0.2667	6 «60 min» 0.2668

Для проверки диапазона использования методики проведен следующий эксперимент: получены спиртовые экстракты сырья разной концентрации, а именно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5% (при используемой по методике 0,2% концентрации сырья в спиртовом растворе), т.е. в

пределах от -50% до +250% от номинальной концентрации, и в полученных экстрактах по методике проведено определение суммы флавоноидов (спектры полученных растворов приведены на рис. 5).

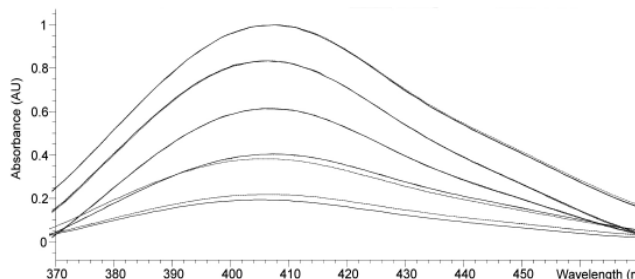


Рис. 5. УФ-спектры испытуемых растворов душицы, полученные при определении диапазона использования методики.

Зависимость оптической плотности растворов (Y) от концентрации сырья (X) приведена на рис. 6 и выражается уравнением: $Y = A + B \times X$, где $A = -0,00481$, $B = 0,99921$, коэффициент корреляции $R = 0,99837$.

На основании полученных данных установлено, что в пределах измеряемых концентраций зависимость оптической плотности от концентрации носит линейный характер, т.е. данная методика линейна в диапазоне от -50% до + 250% от номинального содержания суммы флавоноидов в сырье.

Кроме того, найденное значение коэффициента A (-0,00481) свидетельствует о статистически не значимом вкладе остальных компонентов сырья в количественное определение суммы флавоноидов, что позволяет сделать вывод о достаточной специфичности методики

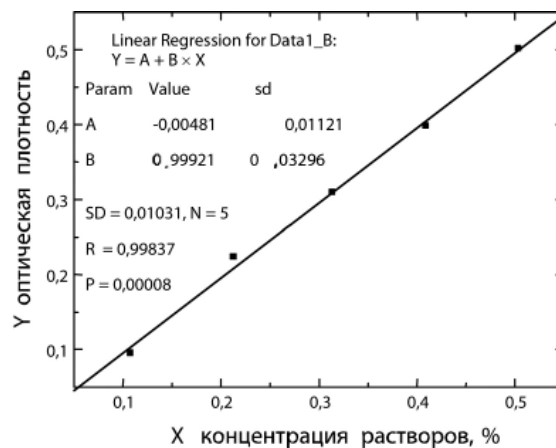


Рис. 6. График зависимости оптической плотности испытуемых растворов душицы от концентрации растворов.

Правильность методики проверяли методом известных добавок лютеолин-7-глюкозида к аликвоте испытуемого раствора душицы, затем получали по методике окрашенные растворы и измеряли оптическую плотность при длине волны 409 нм (УФ-спектры полученных растворов приведены на рис. 7).

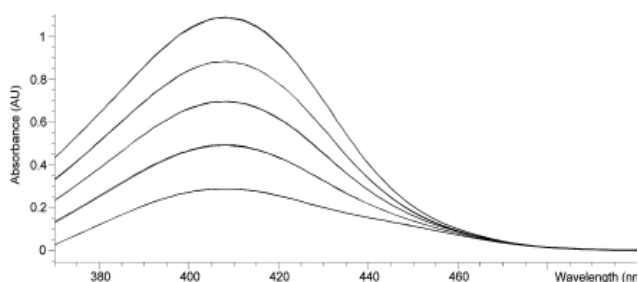


Рис. 7. УФ-спектры испытуемых растворов душицы с добавками лютеолин-7-глюкозида, полученные при проверке правильности методики.

Результаты обработки полученных данных приведены в таблице 2.

Таблица 2

Метрологические характеристики методики, полученные методом введено-найденно

Введено лютеолин-7-глюкозида	Найден лютеолин-7-глюкозида	Найденно относительно введенного %	Статистические характеристики
0,0755 мг	0,0758 мг	100,4	$\bar{X}_{\text{среднее}}=100,2$ $S^2=1,9533$ $S_r\%=1,3948$ $\Delta_x=4,447$ $\epsilon=4,438$
0,0755 мг	0,0770 мг	101,90	
0,0755 мг	0,0744 мг	98,5	
0,0755 мг	0,0755 мг	100,0	

Таблица 3

Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид

$X_i, \%$	f	$\bar{X}_{\text{ср.}}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	Δ_x	$\Delta X, \%$	$\epsilon, \%$
2,15									
1,99	4	2,066	$4,33 \times 10^{-3}$	$6,58 \times 10^{-2}$	95	2,776	$1,823 \times 10^{-3}$	$8,17 \times 10^{-2}$	3,954
2,01									
2,08									
2,10									

Как видно из приведенных данных, в методике отсутствует систематическая ошибка, относительная неопределенность при доверительной вероятности 0,95 не превышает 4,44%.

Проверена прецизионность результатов определения содержания суммы флавоноидов в сырье одной серии параллельно из 5 навесок сырья. Метрологические характеристики приведены в таблице 3.

Выводы

1. При использовании подходов ЕФ к стандартизации ЛРС, содержащего флавоноиды, разработана и валидирована спектрофотометрическая методика определения количественного содержания суммы флавоноидов в траве душицы, в пересчете на лютеолин-7-глюкозид.
2. Разработанная методика предложена для включения в национальную монографию ГФУ на данный вид ЛРС.

Литература

1. К вопросу о введении в Государственную Фармакопею Украины монографии «Душица» / Котов А.Г., Тихоненко Н.И., Котова Э.Э., Вовк А.Г., Тихоненко Т.М. // Фармаком. – 2007. – №4. – С. 15–21.
2. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. – P. 2155–2156.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – С. 328–330.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – С. 196–197.
5. Исследование качественного состава эфирного масла душицы обыкновенной, произрастающей в Восточной Сибири / Минович В.М., Коненкина Т.А., Федосеева Г.М., Головных Н.Н. // Химия растительного сырья. – 2008. – №2. – С. 61–64.
6. Пешкова В.А. Флавоноиды *Origanum vulgare* / В.А. Пешкова, В.М. Минович // Химия природных соединений. – 1984. – №4. – С. 522.
7. Минович В.М. Фармакогностическое исследование представителей родов *Origanum L.* и *Rhododendron L.* флоры Восточной Сибири: автореф. дис. ... д-ра фарм. н. / Минович В.М. – Улан-Удэ, 2010.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – Вильнюс, 1994. – Т. 1. – С. 320.
9. Котов А.Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослину сировину до Державної Фармакопеї України / А.Г. Котов // Фармаком. – 2009. – №1. – С. 5–19.
10. A study of the boric acid reaction color of flavone derivatives / G.W. Wilson // J. Am. Chem. Soc. – 1939. – Vol. 61. – P. 2303.
11. Tauböck K. Über Reaktionsprodukte von Flavonolen mit Borsäure und Organischen Säuren und ihre Bedeutung für die Festlegung der Bore in Pflanzenorganen / K. Tauböck // Naturwissenschaft. – 1942. – Bd. 30. – S. 439.
12. Hörhammer L. Zur analytische der flavone. VIII. Weitere Eigenschaften halochromer Borkomplexes / L. Hörhammer, R. Hänsel // Arch. Pharm. – 1955. – Bd. 288. – S. 315.
13. Гусева А.П. К методике определения флавоновых веществ в растениях // А.П. Гусева, М.Н. Нестюк // Биохимия. – 1953. – Вып. 18. – С. 480.
14. Литвиненко В.И. Химическое исследование флавоноидов солодки: дисс. ... к. хим. наук / Литвиненко Василий Иванович. – Харьков, 1964. – 223 с.
15. Котова Э.Э. Стандартизация цветков ромашки по количественному содержанию суммы флавоноидов / Э.Э. Котова // Фармаком. – 2007. – №3. – С. 17–22.

Сведения об авторах:

Котова Э.Э., ст. научный сотрудник, зам. нач. отдела «Валидация и стандартные образцы» ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Тихоненко Н.И., мл. научный сотрудник отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Котов А.Г., ст. научный сотрудник, руководитель научного направления «Лекарственное растительное сырье» отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Адрес для переписки:

Тихоненко Наталия Игоревна. 61085, г. Харьков, ул. Астрономическая, 33, ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». Тел.: (050) 608 16 80, (057) 719 06 04.