

ИЗУЧЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ЧЕРТОПОЛОХА КУРЧАВОГО

Юдина Ю.В.¹, Бевз Н.Ю.¹, Глудох Е.В.¹, Омирбаева А.Е.², Датхаев У.М.²

¹Национальный фармацевтический университет, Харьков Украина

²Казахский национальный университет им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы, Республика Казахстан

Введение. Введение методики количественного определения в монографию национальной фармакопеи предусматривает изучение комплекса валидационных характеристик.

Нами согласно требованиям ГФ РК [1] была проведена валидация методики определения суммы флавоноидов в траве чертополоха методом абсорбционной спектрофотометрии для включения в аналитическую документацию.

Методы исследования. Валидацию методики проводили методом математической статистики по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность [1].

Валидации была подвергнута следующая методика:

Основной раствор. 1,00 г измельченного в порошок сырья (355) (2.9.12), 1 мл раствора 5 г/л гексаметилентетрамина Р, 20 мл ацетона Р, 2 мл кислоты хлористоводородной Р₁ помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин и фильтруют через ватный тампон в колбу. Ватный тампон помещают в круглодонную колбу с остатком и экстрагируют ацетоном Р двумя порциями по 10 мл, проводя кипячение каждый раз с обратным холодильником в течение 10 мин, охлаждают. Каждое извлечение фильтруют через ватный тампон в колбу. Охлажденные объединенные ацетоновые извлечения фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу. Ополаскивая колбу и промывая фильтр ацетоном Р, доводят объем раствора до 50,0 мл. 20,0 мл полученного раствора помещают в делительную воронку, прибавляют 20 мл воды Р и встряхивают смесь с 15 мл этилацетата Р, добавляя 2,0 г мелко измельченного порошка натрия хлорида, а затем – с тремя порциями этилацетата Р по 10 мл. Этилацетатные извлечения объединяют в делительной воронке, промывают 2 порциями воды Р по 50 мл, фильтруют через слой 10 г натрия сульфата безводного Р в колбу и доводят объем раствора этилацетатом Р до 50,0 мл.

Испытуемый раствор. К 10,0 мл основного раствора прибавляют 1 мл реактива алюминия хлорида Р и доводят объем раствора 5% (об/об) раствором кислоты уксусной ледяной Р в 96% спирте этиловом до 25,0 мл.

Компенсационный раствор. 10,0 мл основного раствора доводят 5% (об/об) раствором кислоты уксусной ледяной Р в 96% спирте этиловом до объема 25,0 мл.

Измеряют оптическую плотность (2.2.25) испытуемого раствора при длине волны 420 нм через 30 мин после его приготовления, используя

компенсационный раствор. В работе использовали стандартный образец гиперозида (Sigma-Aldrich), измерение оптических плотностей проводили на спектрофотометре Evolution 60S.

Селективность. Абсорбционный спектр поглощения продукта реакции анализируемого извлечения травы чертополоха с реактивом алюминия хлорида в уксуснокислой среде (рис. 1) характеризуется наличием максимума поглощения при 418 нм, что позволяет стандартизировать траву чертополоха по наличию флавоноидов в пересчете на гиперозид.

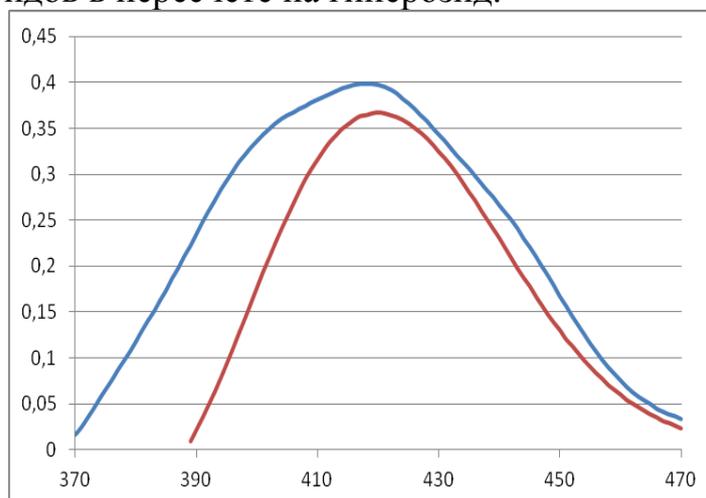


Рис. 1. Абсорбционный спектр продукта реакции с реактивом алюминия хлорида: 1 – травы чертополоха; 2 – СО гиперозида

При разработке методики, в первую очередь, проверяли полноту экстракции флавоноидов из сырья, для чего шрот, оставшийся после двукратной экстракции 90 % этанолом, дополнительно обрабатывали в аналогичных условиях и проводили определение суммы флавоноидов по приведенной методике. Полученная при этом оптическая плотность исследуемых растворов (фоновое поглощение) составляла не более -0,001. Таким образом, фоновое поглощение в условиях методики является статистически незначимым, что может свидетельствовать о достаточно полной экстракции.

Содержание флавоноидов в сырье вычисляли как методом стандарта, так и методом удельного показателя поглощения. При этом было установлено, что содержание флавоноидов в анализируемом сырье независимо от метода, приблизительно одинаковое.

Содержание флавоноидов в процентах (X) в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times V_1 \times V_3 \times V_3}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times m_{\text{н}} \times V_2 \times V_4}$$

где, D – оптическая плотность испытуемого раствора; - удельный показатель поглощения, равный 500; m – масса навески сырья.

Содержание гликозидов в пересчете на гиперозид составляет около 0,25%.

Линейность. Были определены такие параметры как диапазон линейных

концентраций и коэффициент корреляции.

В ходе определения линейности методики было приготовлено 9 окрашенных растворов комплекса гиперозида с реактивом алюминия хлорида и измерена их оптическая плотность при длине волны 420 нм. Установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации от 0,002 мг/мл до 0,01 мг/мл, а коэффициент корреляции близок к единице (больше 0,9990). Это свидетельствует о линейной зависимости значения оптической плотности от концентрации действующего вещества в сырье в данном диапазоне концентраций (табл. 1).

Как видно из данных табл. 1, в данном случае выполняются требования к линейности, т.е. линейность методики подтверждается на всем диапазоне концентраций 80-120 %.

В ходе работы была проверена стабильность комплексов раствора травы чертополоха с раствором алюминия хлорида. Измерение оптической плотности проводили через 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60 минут после прибавления реактива алюминия хлорида, поскольку известно, что в течение первых 30 минут комплексы флавоноидов с раствором алюминия хлорида неустойчивы. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 2.

Таблица 1

Результаты изучения линейности модельных растворов

№ модельного раствора	Введено, % (x_i , %)	Оптическая плотность A_i ($D_{st}=0,367$)	$y_i\%=(D_i/D_{st})\cdot 100$	Значение
1	80	0,315	80,56	
2	85	0,334	85,42	
3	90	0,356	91,05	
4	95	0,372	95,14	
5	100	0,395	101,02	
6	105	0,414	105,88	
7	110	0,433	110,74	
8	115	0,452	115,60	
9	120	0,465	118,93	
Угловой коэффициент линейной зависимости b				0,9804
S_b				0,0164
Свободный член линейной зависимости a				2,4439
S_a				1,6545
Остаточное стандартное отклонение $S_o=$				0,6355
Коэффициент корреляции методики r				0,9990
Критическое значение остаточного стандартного отклонения, $RSD^{1\%}$				13,6931
Критерий линейного коэффициента корреляции R_c				0,9989
S_b^2				0,0003
S_a^2				2,2374

Для проверки диапазона использования методики (правильность (сходимость) и прецизионность) было проведено определение суммы флавоноидов в сырье по приведенной методике в том же диапазоне концентраций (80-120 % от номинальной концентрации) (табл. 3, 4).

Таблица 2

Результаты определения стабильности приготовленных растворов

	Время исследования стабильности, мин							Среднее	RSDt,%	t,%	max δ ,%
	30	35	40	45	50	55	60				
								0,398	0,2369	0,5050	1,54
A	0,398	0,399	0,399	0,398	0,398	0,397	0,395				
A ₀	0,367	0,367	0,368	0,369	0,368	0,367	0,366	0,367	0,2542	0,5419	1,54

Таблица 3

Правильность (сходимость) и прецизионность аналитической методики

Объем аликвоты, мл	Введено в % к концентрации 100% (X _i факт%)	Оптические плотности D _i	Найдено в % к концентрации 100% раствора (Y _i %)	Найдено в % к введенному Z _i =100 (Y _i /X _i)
8,0	80	0,312	80,21	100,26
8,5	85	0,332	85,35	100,41
9,0	90	0,354	91,00	101,11
9,5	95	0,371	95,37	100,39
10,0	100	0,391	100,51	100,51
10,5	105	0,409	105,12	95,56
11,0	110	0,430	110,54	96,12
11,5	115	0,448	115,17	95,97
12,0	120	0,464	119,28	99,40
Среднее Z%				98,86
Относительное стандартное отклонение, Sz%				2,28
Относительный доверительный интервал as%=t(95%)*Sz				4,24
Критическое значение для сходимости результатов as%				2,24
Систематическая погрешность δ				-1,14
Критерий неопределенности систематической погрешности				0,24
Общий вывод о методике				корректная

Экспериментальные результаты определения прецизионности методики характеризуются допустимым разбросом значений относительно среднего и, относительно, низким стандартным отклонением на всем диапазоне изучаемых концентраций.

Как альтернатива математической оценке линейности, на рис. 2 приведено графическое изображение регрессионной прямой для анализируемого образца. Согласно полученным результатам установлено, что в выбранном диапазоне применения методики имеется прямо пропорциональное соотношение между концентрацией флавоноидов в определяемой пробе и оптической плотностью. Все линейные зависимости характеризуются высокими коэффициентами корреляции ($R > 0.9990$), что считается приемлемым для установления строгой линейности. Полученные данные подтверждаются и графическим представлением регрессионных прямых.

Воспроизводимость методики устанавливали на шести образцах травы чертополоха. Полученные метрологические характеристики методики приведены в табл. 4.

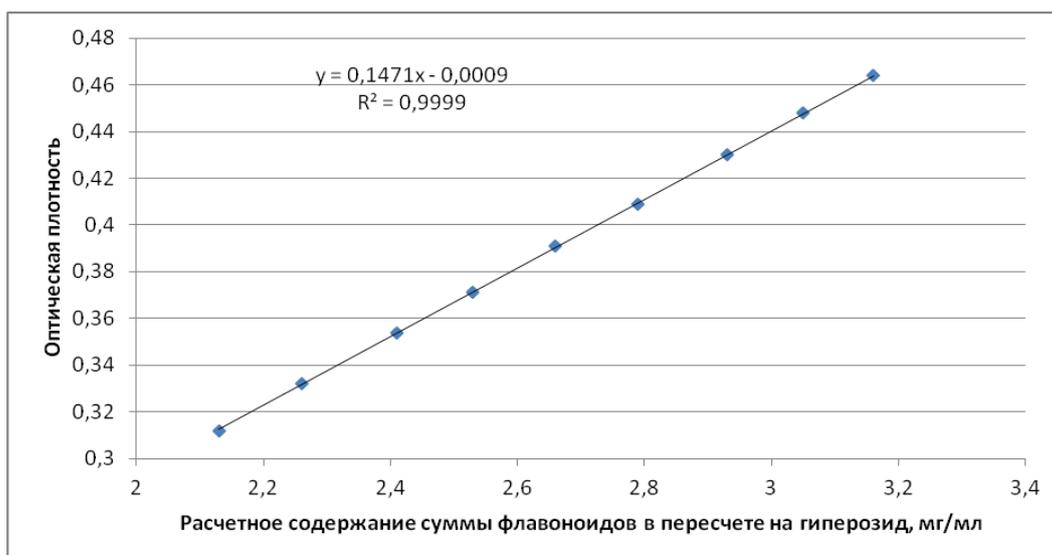


Рис. 2 Графическое представление линейной зависимости между оптической плотностью и расчетным содержанием суммы флавоноидов в пробе

Таблица 4

Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов в траве чертополоха в пересчете на гиперозид $P(t, \nu) = 2,5706$

n	x	x_{cp}	S^2	S			$\varepsilon, \%$
6	0,2463	0,2482	0,0122	0,0023	0,0009	0,0024	0,96
	0,2451						
	0,2477						
	0,2503						
	0,2492						
	0,2508						

Выводы. В ходе проведенного исследования изучены валидационные характеристики разработанной методики количественного определения флавоноидов: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, что позволяет сделать вывод об ее валидности и включить в фармакопейную статью на траву чертополоха.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Астана: Министерство здравоохранения Республики Казахстан, 2008. Т. 1, 2.