

Э. Х. Галияхметова (к.фарм.н., доц.)<sup>1</sup>, А. А. Низамова (к.фарм.н., асс.)<sup>1</sup>,  
Н. В. Кудашкина (д.фарм.н., проф., зав. каф.)<sup>1</sup>,  
С. Р. Хасанова (д.фарм.н., проф.)<sup>1</sup>, Т. В. Булгаков (к.фарм.н., вед. спец.)<sup>2</sup>

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ *GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM*

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России,  
кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии  
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3; e-mail: [alfina.nizamova@bk.ru](mailto:alfina.nizamova@bk.ru)

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
национальная антидопинговая лаборатория (институт)  
105005, г. Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1; e-mail: [tricster@inbox.ru](mailto:tricster@inbox.ru)

E. Kh. Galiakhmetova<sup>1</sup>, A. A. Nizamova<sup>1</sup>, N. V. Kudashkina<sup>1</sup>, S. R. Khasanova<sup>1</sup>, T. V. Bulgakov<sup>2</sup>

## VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN THE HERB OF *GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM*

<sup>1</sup> Bashkir state medical University of the Ministry of health of the Russian Federation  
3, Lenina Str., 450008, Ufa, Russia; e-mail: [alfina.nizamova@bk.ru](mailto:alfina.nizamova@bk.ru)

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University  
10, Elizavetinskiy pereulok Str., build. 1, 105005, Moscow, Russia; e-mail: [tricster@inbox.ru](mailto:tricster@inbox.ru)

Рассмотрены вопросы валидации методики количественного определения флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum* с использованием спектрофотометрического метода. Предложены критерии приемлемости разработанной методики по параметрам специфичности (совпадение спектров поглощения), линейности ( $r = 0.991$ ), прецизионности ( $RSD \leq 5\%$ ) и правильности (процент от ожидаемого значения  $100 \pm 5\%$ ). Полученные в ходе проведения аналитической методики характеристики находятся в пределах критериев приемлемости, что позволяет рекомендовать данную методику для включения в раздел «Количественное определение» проекта фармакопейной статьи (ФС) «Гиностеммы пятилистной трава».

**Ключевые слова:** *Gynostemma pentaphyllum*; валидация; линейность; правильность; прецизионность; рутин; спектрофотометрия; специфичность; трава; флавоноиды.

**Исследование выполнено в рамках реализации федеральной программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».**

The article considers the issues of validation of the method of quantitative determination of flavonoids in the herb of *Gynostemma pentaphyllum* using the spectrophotometric method. The criteria of acceptability of the developed technique are proposed according to the parameters of specificity (coincidence of absorption spectra), linearity ( $r = 0.991$ ), precision ( $RSD \leq 5\%$ ) and correctness (percentage of the expected value of  $100 \pm 5\%$ ). The obtained characteristics during the analytical methodology are within the criteria of acceptability, which allows us to consider this technique for inclusion in the section «Quantitative determination» of the draft pharmacopoeia article (FA) «*Gynostemma pentaphyllum* herb».

**Key words:** correctness; flavonoids; gynostemma pentaphyllum; herb; linearity; precision; rutin; specificity; spectrophotometry; validation.

**The study was carried out as part of the implementation of the federal program of strategic academic leadership «Priority 2030».**

Дата поступления 03.12.22

Поиск и изучение новых лекарственных растений, имеющих богатый химический состав и обладающих эффективными фармакологическими свойствами, является перспективным направлением в фармации. Для внедрения, анализа, стандартизации неизвестного лекарственного растения и его сырья необходимо разработать показатели подлинности и качества. Аналитические методики количественного определения биологически активных веществ в последующем должны быть валидированы с целью доказательства пригодности разработанных методик.

Перспективным растением, вызывающий особый интерес, является произрастающая в Юго-Восточной Азии трава *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, также называемая по-китайски Цзяогулань <sup>1</sup>. Из *Gynostemma pentaphyllum* выделено и идентифицировано множество биологически активных соединений, в том числе сапонины (также называемые гипенозидами), полисахариды, флавоноиды и фитостеролы, которые обуславливают ее лечебные свойства. Тесты как *in vivo*, так и *in vitro*, начиная от клеточных линий и заканчивая животными, показали, что *G. pentaphyllum* обладает различной биологической активностью, включая противораковую <sup>1–4</sup>, антиатерогенную, липидрегулирующую, нейропротекторную, гепатопротекторную и гипогликемическую, а также оказывает положительное действие против деменции и болезни Паркинсона <sup>5–7</sup>.

В настоящее время зарубежными авторами достаточно изучены биологические свойства извлечений и отдельных выделенных соединений *G. pentaphyllum* и проанализирован ее химический состав, однако нормативный документ по стандартизации сырья гиностеммы пятилистной не разработан <sup>1–3, 8, 9</sup>.

Целью настоящего исследования являлась валидация разработанной методики количественного определения флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum*.

## Материалы и методы

В качестве объекта исследования служила трава *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, выращенная на экспериментальных участках Республики Башкортостан и заготовленная от интродуцированных растений в течение 2017–2020 гг. летом в фазу цветения.

На первом этапе авторами разработана методика количественного определения спектрофотометрическим методом в УФ и видимых областях <sup>10</sup>. Наибольший выход флавоноидов из травы наблюдался при следующих условиях: экстрагент – этиловый спирт 70%-ный, кратность экстракции –

однократная в течение 50 мин, соотношение массы сырья и объема экстрагента – 1:100, степень измельчения сырья – 3.0 мм, количество комплексобразователя (спиртовой 5%-ный раствор хлорида алюминия) – 2 мл, время комплексобразования – 30 мин. При разработке методики было установлено, что спектры поглощения испытуемого раствора совпадали со спектром рутин, поэтому пересчет измерений при количественном определении суммы флавоноидов вели на рутин. В качестве стандартного образца (СО) использовали рутин в виде 0.1%-ного спиртового раствора <sup>11</sup>.

Следующий этап заключался в валидации разработанной аналитической методики для получения оценки ее пригодности. Валидация проводилась в соответствии с Государственной Фармакопеей XIV издания (ГФ XIV) по параметрам специфичности, линейности, прецизионности и правильности <sup>12</sup>.

Все измерения проводили и регистрировали на двухлучевом спектрофотометре (производитель Япония, модель SHIMADZU UV-1800). Статистический анализ результатов испытаний осуществляли по методикам ГФ XIV и программам обеспечения Windows 10 <sup>12</sup>.

## Результаты и их обсуждение

Изначально для исследования были получены растворы из травы *Gynostemma pentaphyllum* согласно разработанной методике. Далее определяли специфичность путем анализа спектра поглощения модельной смеси, содержащей 70%-ный этиловый спирт и 5%-ный спиртовой раствор хлорида алюминия (рис. 1).

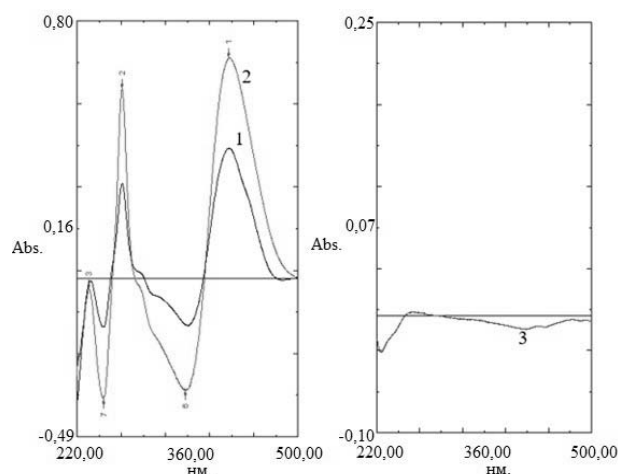


Рис. 1. Спектры водно-спиртового извлечения из травы *G. pentaphyllum* (1), раствора СО рутин (2) и раствора модельной смеси (3) с добавлением хлорида алюминия

Критерием приемлемости по данному параметру было совпадение максимумов поглощения раствора СО и извлечения из травы *G.*

раствора СО и извлечения из травы *G. pentaphyllum* и отсутствием максимумов в спектре поглощения модельной смеси.

Линейность устанавливали путем анализа пяти растворов с объемом от 1.6 до 2.4 мл и концентрацией в интервале 80–120 % от теоретического содержания флавоноидов в траве *G. pentaphyllum* (табл. 1).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов, составляя уравнение регрессии. Критерием для параметра линейности являлся коэффициент корреляции, который должен быть не ниже 0.99 (рис. 2). Если его величина близка к единице, совокупность данных можно описать прямой линией.

Коэффициент корреляции превысил более 0.99, следовательно, методика является линейной.

Прецизионность методики была исследована в однородных условиях на одном образце в 6 повторностях в двух вариантах: повторяемость в

одинаковых условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени (табл. 2) и внутрилабораторная прецизионность в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители) (табл. 3).

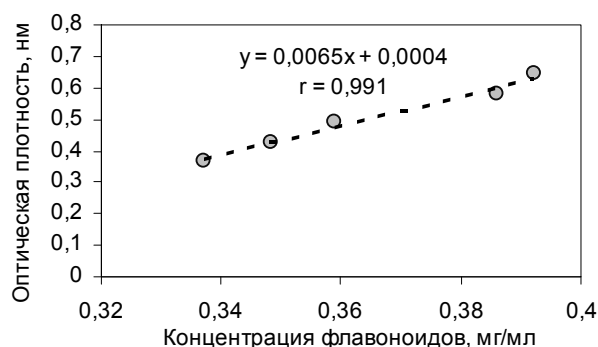


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов

Таблица 1

### Результаты определения линейности разработанной методики

| № п/п | Величина аналитической области, % | Объем аликвоты, мл | Оптическая плотность, нм | Содержание, % | Содержание в аликвоте, мг |
|-------|-----------------------------------|--------------------|--------------------------|---------------|---------------------------|
| 1     | 80                                | 1.6                | 0.369                    | 3.53          | 0.3373                    |
| 2     | 90                                | 1.8                | 0.429                    | 3.65          | 0.3484                    |
| 3     | 100                               | 2                  | 0.491                    | 3.76          | 0.3589                    |
| 4     | 110                               | 2.2                | 0.581                    | 4.04          | 0.3861                    |
| 5     | 120                               | 2.4                | 0.644                    | 4.11          | 0.3923                    |

Таблица 2

### Определение повторяемости разработанной методики

| № п/п                                         | Содержание флавоноидов, % | Метрологические характеристики                                                |
|-----------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                             | 3.74                      | $f = 5$<br>$\bar{y} = 3.76$<br>$S_y^2 = 0.02846$<br>$E_\alpha = 0.07$<br>1.95 |
| 2                                             | 3.79                      |                                                                               |
| 3                                             | 3.85                      |                                                                               |
| 4                                             | 3.68                      |                                                                               |
| 5                                             | 3.70                      |                                                                               |
| 6                                             | 3.83                      |                                                                               |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % |                           | 0.76                                                                          |

Таблица 3

### Определение внутрилабораторной прецизионности разработанной методики

| № п/п                                         | Содержание флавоноидов, % | Метрологические характеристики                                                |
|-----------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 день (1 испытатель, 1 лаборатория)</b>   |                           |                                                                               |
| 1                                             | 3.81                      | $f = 5$<br>$\bar{y} = 3.79$<br>$S_y^2 = 0.02588$<br>$E_\alpha = 0.07$<br>1.75 |
| 2                                             | 3.73                      |                                                                               |
| 3                                             | 3.83                      |                                                                               |
| 4                                             | 3.87                      |                                                                               |
| 5                                             | 3.70                      |                                                                               |
| 6                                             | 3.79                      |                                                                               |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % |                           | 0,68                                                                          |
| <b>2 день (2 испытатель, 1 лаборатория)</b>   |                           |                                                                               |
| 1                                             | 3.79                      | $f = 5$<br>$\bar{y} = 3.76$<br>$S_y^2 = 0.01265$<br>$E_\alpha = 0.03$<br>0.86 |
| 2                                             | 3.75                      |                                                                               |
| 3                                             | 3.79                      |                                                                               |
| 4                                             | 3.78                      |                                                                               |
| 5                                             | 3.72                      |                                                                               |
| 6                                             | 3.73                      |                                                                               |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % |                           | 0.34                                                                          |

## Определение правильности разработанной методики

| Объем экстракта в аликвоте, мл | Содержание флавоноидов в аликвоте, мг | Добавлено РСО рутина, мг | Ожидаемое содержание, мг | Полученное содержание, мг | Ошибка, (отн., %) |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------|
| 0.5                            | 0.2310                                | 1                        | 1.2310                   | 1.2097                    | -0.0213(2.14)     |
| 1.0                            | 0.3085                                | 1                        | 1.3085                   | 1.3041                    | -0.0044(0.34)     |
| 1.5                            | 0.3177                                | 1                        | 1.3177                   | 1.3207                    | +0.0030(0.23)     |
| Среднее значение               |                                       |                          |                          |                           | 100±0.90          |

Из табл. 2 и 3 следует, что величина относительного стандартного отклонения результата при оценке повторяемости равна 0.76% (не превышает 2%), при оценке внутрिलाбораторной прецизионности – 0.68 и 0.34 % (не превышает 5%), что свидетельствует о прецизионности методики.

Достоверность разработанной методики устанавливали методом добавок путем добавления необходимого количества стандарта с известной концентрацией к исследуемым растворам объемом 0.5, 1 и 1.5 мл (табл. 4). Критерием приемлемости является средний процент открываемости, скорректированный на 100%.

В разработанной методике процент восстановления находился в пределах 97.86–100.23 %, его среднее значение составляет 100±0.90, что соответствует допустимым пределам 100±5 %.

Таким образом, в результате исследования выявлено, что методика количественного определения флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, специфична, прецизионна, правильна и имеет линейный характер. Следовательно, разработанная методика может быть использована для стандартизации травы *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, а также может быть включена в раздел «Количественное определение» проекта ФС «Гиностеммы пятилистной трава».

## Литература

1. Su C., Li N., Ren R., Wang Y., Su X., Lu F., Zong R., Yang L., Ma X. Progress in the Medicinal Value, Bioactive Compounds, and Pharmacological Activities of *Gynostemma pentaphyllum* // *Molecules*. – 2021. – V.26, №20. – Pp.6249.
2. Razmovski-Naumovski V., Huang T.H., Tran V.H., Li G.Q., Duke C.C., Roufogalis B.D. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* // *Phytochemistry Reviews*. – 2005. – V.4, №3. – Pp.197-219.
3. Tsui K.C., Chiang T.H., Wang J.S., Lin L.J., Chao W.C., Chen B.H., Lu J.F. Flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* exhibit differential induction of cell cycle arrest in H460 and A549 cancer cells // *Molecules*. – 2014. – V.19, №11. – Pp.17663-17681.
4. Lu K.W., Ma Y.S., Yu F.S., Huang Y.P., Chu Y.L., Wu R.S., Liao C.L., Chueh F.S., Chung J.G. Gypenosides induce cell death and alter gene expression in human oral cancer HSC-3 cells // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2017. – V.14, №3. – Pp.2469-2476.
5. Gou S.H., Huang S.F., Chen X.Y., Liu J., He M., Ma Y.Y., Zhao X.N., Zhang Y., Ni J.M. Lipid-lowering, hepatoprotective, and atheroprotective effects of the mixture Hong-Qu and gypenosides in hyperlipidemia with NAFLD rats // *Chinese Medical Association*. – 2016. – V.79, №3. – Pp.111-121.
6. He Q., Li J.K., Li F., Li R.G., Zhan G.Q., Li G., Du W.X., Tan H.B. Mechanism of action of gypenosides on type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in rats // *World journal of gastroenterology*. – 2015. – V.21, №7. – Pp.2058-2066.
7. Wang T.X., Shi M.M., Jiang J.G. Bioassay-guided isolation and identification of anticancer and

## References

1. Su C., Li N., Ren R., Wang Y., Su X., Lu F., Zong R., Yang L., Ma X. [Progress in the Medicinal Value, Bioactive Compounds, and Pharmacological Activities of *Gynostemma pentaphyllum*]. *Molecules*, 2021, vol.26, no.20, pp.6249.
2. Razmovski-Naumovski V., Huang T.H., Tran V.H., Li G.Q., Duke C.C., Roufogalis B.D. [Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*]. *Phytochemistry Reviews*, 2005, vol.4, no.3, pp.197-219.
3. Tsui K.C., Chiang T.H., Wang J.S., Lin L.J., Chao W.C., Chen B.H., Lu J.F. [Flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* exhibit differential induction of cell cycle arrest in H460 and A549 cancer cells]. *Molecules*, 2014, vol.19, no.11, pp.17663-17681.
4. Lu K.W., Ma Y.S., Yu F.S., Huang Y.P., Chu Y.L., Wu R.S., Liao C.L., Chueh F.S., Chung J.G. [Gypenosides induce cell death and alter gene expression in human oral cancer HSC-3 cells]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2017, vol.14, no.3, pp.2469-2476.
5. Gou S.H., Huang S.F., Chen X.Y., Liu J., He M., Ma Y.Y., Zhao X.N., Zhang Y., Ni J.M. [Lipid-lowering, hepatoprotective, and atheroprotective effects of the mixture Hong-Qu and gypenosides in hyperlipidemia with NAFLD rats]. *Chinese Medical Association*, 2016, vol.79, no.3, pp.111-121.
6. He Q., Li J.K., Li F., Li R.G., Zhan G.Q., Li G., Du W.X., Tan H.B. [Mechanism of action of gypenosides on type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in rats]. *World journal of gastroenterology*, 2015, vol.21, no.7, pp.2058-2066.
7. Wang T.X., Shi M.M., Jiang J.G. [Bioassay-guided isolation and identification of anticancer and antioxidant compounds from *Gynostemma*

- antioxidant compounds from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino // RSC Advances. – 2018. – V.8, №21. – Pp.23181-23190.
8. Беленовская Л.М., Буданцев А.Л., Битюкова Н.В. *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): компонентный состав и биологическая активность // Растительные ресурсы. – 2018. – Т.54, №4. – С.443-495.
  9. Kao T.H., Huang S.C., Inbaraj B.S., Chen B.H. Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry // *Analytica chimica acta*. – 2008. – V.626, №2. – Pp.200-211.
  10. Патент SU1507394A1. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье / Беликов В.В., Колесник Н.Т. // Б.И. – 1989. – №34.
  11. Галиахметова Э.Х., Низамова А.А., Кудашкина Н.В., Хасанова С.Р., Андреева П.А., Галиахметова Р.Р., Хакимова Э.Р. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum* // Медицинский вестник Башкортостана. – 2022. – Т.17, №4. – С.35-39.
  12. Электронный ресурс: Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. I. 1814 с. / <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
  8. Belenovskaya L.M., Budantsev A.L., Bitjukova N.V. *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): *komponentnyi sostav i biologicheskaya aktivnost'* [*Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): component composition and biological activity]. *Rastitel'nye resursy* [Plant resources], 2018, no.4, pp.443-495.
  9. Kao T.H., Huang S.C., Inbaraj B.S., Chen B.H. [Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry]. *Analytica chimica acta*, 2008, vol.626, no.2, pp.200-211.
  10. Belikov V.V., Kolesnik N.T. *Sposob kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v rastitel'nom syr'e* [Method of quantitative determination of flavonoids in plant raw materials]. Patent USSR no.SU1507394A1, 1989.
  11. Galiakhmetova E.H., Nizamova A.A., Kudashkina N.V., Khasanova S.R., Andreeva P.A., Galiakhmetova R.R., Khakimova E.R. *Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v trave Gynostemma pentaphyllum* [Development of a method for quantitative determination of flavonoids in the herb of *Gynostemma pentaphyllum*]. *Meditinskiy vestnik Bashkortostana* [Medical Bulletin of Bashkortostan], 2022, no.4, pp.35-39.
  12. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya. T.I* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V.I]. 1814 p. /<http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.