

УДК 615.322:547.972+543.544



Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

О.А. Белова, В.А. Куркин, М.В. Егоров

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Получена 15.05.2022

После рецензирования 10.01.2023

Принята к печати 20.02.2023

Трава солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) является перспективным растительным сырьём, которое может быть комплексно использовано для разработки лекарственных препаратов с противовоспалительным действием.

Цель. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой.

Материал и методы. Объектами исследования являлись 5 образцов травы солодки голой, заготовленных в летний период времени в различных местах произрастания и культивирования. В качестве стандартного образца использовали пинострбин. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) методом дифференциальной спектрофотометрии. В качестве растворителя использовали спирт этиловый 96%.

Результаты. Количественное определение суммы флавоноидов в траве солодки голой проводили при аналитической длине волны 310 нм в пересчёте на пиноцетмбрин. Установлены оптимальные параметры экстрагирования суммы флавоноидов из травы солодки голой: экстрагент – спирт этиловый 90%; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:50; время экстракции – 60 мин; степень измельчения сырья – 2 мм. Определено содержание суммы флавоноидов для травы солодки голой, которое варьирует от $0,39 \pm 0,002$ до $3,41 \pm 0,015\%$ с учётом влажности растительного сырья от $9,97 \pm 0,003$ до $10,03 \pm 0,003\%$ в зависимости от места произрастания, культивирования и года сбора растительного сырья. Погрешность единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляла $\pm 0,73$.

Заключение. Разработанная методика количественного определения флавоноидов в траве солодки голой может быть использована для решения вопросов стандартизации указанного лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: солодка голая; *Glycyrrhiza glabra* L.; трава; флавоноиды; пиноцетмбрин; стандартизация; спектрофотометрия

Список сокращений: ЛП – лекарственный препарат; СО – стандартный образец; ФС – фармакопейная статья; БАВ – биологически активные вещества; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Quantitative determination of total flavonoids in *Glycyrrhiza Glabra* L. herbs

O.A. Belova, V.A. Kurkin, M.V. Egorov

Samara State Medical University,
89, Chapaevskaya Str., Samara, Russia, 443099

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Received 15 May 2022

After peer review 10 Jan 2023

Accepted 20 Feb 2023

Licorice herb (*Glycyrrhiza glabra* L.) is a promising herbal raw material, which can be comprehensively used to develop drugs with an anti-inflammatory action.

The aim of the article was to development a quantitative determination method of total flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L. herbs.

Для цитирования: О.А. Белова, В.А. Куркин, М.В. Егоров. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой. *Фармация и фармакология*. 2023;11(2):127-136. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-2-127-136

© О.А. Белова, В.А. Куркин, М.В. Егоров, 2023

For citation: O.A. Belova, V.A. Kurkin, M.V. Egorov. Quantitative determination of total flavonoids in *Glycyrrhiza Glabra* L. herbs. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(2):127-136. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-2-127-136

Materials and methods. The subjects of research were 5 samples of licorice herb harvested in summer in various places of growing and cultivation. Pinostrobin was used as a standard sample. The registration of the electronic spectra was carried out with a spectrophotometer (Analytik Jena AG, Germany) by differential spectrophotometry, 96% ethanol was used as a solvent.

Results. The methods for quantitative determination of total flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L. was carried out at an analytical wavelength of 310 nm equivalent to pinocembrin. The optimum parameters for the extraction of total flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. were as follows: the extractant – 90% ethanol; the «raw material-extractant» ratio was 1:50; the extraction time was 60 min; the degree of atomization was 2 mm. The content of total flavonoids for the *Glycyrrhiza glabra* L. herb has been determined, it varies from 0.39 ± 0.002 to $3.41 \pm 0.015\%$ with the humidity of the vegetative raw material from 9.97 ± 0.003 to $10.03 \pm 0.003\%$ depending on the place of the vegetation, cultivation and year of the raw material collection. The error of the single determination with a 95% confidence level was $\pm 0.73\%$.

Conclusion. The developed methods for the quantitative determination of total flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L. herbs can be used to solve the issues of standardization of these medicinal plant raw materials.

Keywords: licorice; *Glycyrrhiza glabra* L.; herb; flavonoids; pinocembrin; standardization; spectrophotometry

Abbreviations: SS – standard sample; PhM – pharmacopoeial monograph; GPhM – general pharmacopoeial monograph; BAC – biological active compounds; HPLC – High Performance Liquid Chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L., сем. *Fabaceae*) – одно из самых исследованных и хорошо изученных растений во всем мире. Растение многолетнее травянистое, с прямостоячими и маловетвистыми стеблями, достигающее в высоту 50–100 см (в исключительных случаях до 200 см). Подземные органы хорошо развиты, корни проникают в почву на глубину до 6–8 м, образуя мощную сеть, что способствует поддержанию популяции солодки. Листья растения очередные, сложные, непарноперистые. Цветки собраны в рыхлые кистевидные соцветия на длинных цветоносах. Растение распространено во многих регионах несмотря на то, что оно относится к средиземноморскому виду. В долинах крупных рек Средней Азии, Узбекистана и Казахстана солодка голая образует заросли^{1,2}.

Корни данного растения широко используются в официальной медицине. На основе выделенных биологически активных веществ (БАВ) из корней разработаны многие комбинированные лекарственные препараты (ЛП). Также в ходе проведенных исследований группой учёных Самарского государственного медицинского университета и Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) разработан государственный стандартный образец (СО) глицирама (ФС-42-0034-00). При этом уточнена его химическая структура, а также изучены физико-химические свойства глицирризиновой кислоты [1–4].

Корни солодки являются ценным фармакопейным сырьем, которое широко используется для производства ЛП с отхаркивающим эффектом и противовоспалительной активностью.

Данное сырьё пользуется особой популярностью не только в России, но и за рубежом [5–7]. За последние десятилетия ученые обратили внимание на различные виды рода *Glycyrrhiza* L. как на перспективные источники БАВ, используемых для создания фитопрепаратов. Одним из перспективных источников наряду с корнями солодки представляет интерес и надземная часть, а именно трава солодки голой [8, 9].

По литературным данным известно, что надземная часть солодки содержит флавоноиды, полисахариды, дубильные вещества, тритерпеноиды, витамины и др. Известно, что флавоноидный состав травы солодки голой представлен пиноцембрином, глабранином, прунетином, астрагалином и витексином [9]. Следует сделать вывод, что надземная часть солодки голой богата высоким содержанием БАВ, среди которых флавоноиды представляют наибольший интерес с точки зрения создания лекарственных препаратов.

В траве данного растения преобладают флаваноны. Доминирующим среди них является пиноцембрин (5,7-дигидроксифлаванон), эффективность которого доказана в доклинической практике. С помощью исследований *in vitro* и *in vivo* доказано, что пиноцембрин улучшал региональный мозговой кровоток беспородных крыс и уменьшал постишемическое повреждение нейроваскулярного блока. Из этого следует, что пиноцембрин обладает нейропротекторной активностью [10–14], а также обладает мощным антифибротическим эффектом, который объясняет его антиоксидантные свойства. Пиноцембрин облегчал вызванный блеомицином фиброз кожи и экспрессию белка, связанного с фиброзом, в келоидных тканях у ксенотрансплантов мышей [15, 16].

Пиноцембрин оказывал защитное действие против гентамицин-индуцированной нефротоксичности, что может быть частично связано с его антиоксидантными и антиапоптотическими

¹ Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 3: *Fabaceae* – *Ariaceae* / А.Л. Буданцев. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2009. – 599 с.

² Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2014. – 635 с.

эффектами, впоследствии приводящими к улучшению функции почек [17]. Данный флаванон проявил ярко выраженную активность в отношении грамположительных бактерий, а его метиловый эфир пиностробин (5-гидрокси-7-метоксифлаванон) менее выраженную в отношении *Escherichia coli* за счёт своего химического строения, определяющего липофильные свойства вещества и его сродство с липидной мембраной грамотрицательных бактерий [18–20]. В исследовании *in vitro* пиноцембрин показал фотопротекторную эффективность [20, 21] и ингибировал аллергическое воспаление дыхательных путей [22].

В одном из исследований пиноцембрин проявил более выраженную противовоспалительную активность, чем неселективный ингибитор циклооксигеназы – индометацин. При этом противовоспалительными ЛП сравнения являлись амидопирин, гидрокортизон и индометацин. Формалин-индуцированное воспаление у мышей уменьшалось в дозе пиноцембрина 25 мг/кг на 40,3%, а в дозе 50 мг/кг – на 43,4%. При метилировании и этилировании пиноцембрина в положении C₈ с образованием его производных приводило к снижению противовоспалительной активности [23].

С учётом вышесказанного, широкий диапазон терапевтического применения травы солодки голой представляется целесообразным с позиции комплексной переработки сырья для изучения свойств водно-спиртовых извлечений и препаратов на основе травы данного растения. Это позволит расширить спектр представлений о фармакологической активности флавоноидов и субстанций надземной части *G. glabra*, а также оценить возможность использования данного объекта при создании отечественных препаратов.

На основе суммы флавоноидов из надземной части солодки голой зарубежными учёными было разработано лекарственное средство «Глацембрин», обладающее противовоспалительным и обезболивающим действием [24]. Препарат «Глацембрин» прошел ряд клинических исследований, по показателям: острая токсичность, противовоспалительная активность. Результаты показали, что «Глацембрин» не отличается от аналогичного показателя пиноцембрина, а противовоспалительная активность лекарственного средства оказалась выше, чем в случае с пиноцембрином. Кроме того, препарат обладает болеутоляющим действием при испытании его на модели укусных корчей у мышей [23].

Все упомянутое выше открыло новые возможности использования травы солодки в фармацевтической промышленности в качестве сырья для изготовления стандартизированных препаратов, обладающих противовоспалительным и другими эффектами. В целом литературный

анализ показал недостаточную степень изученности и проработанности вопросов стандартизации травы солодки голой. Следует обратить внимание на разработанную методику определения суммы флавоноидов в надземной части солодки голой методом прямой спектрофотометрии в пересчёте на пиноцембрин, предложенную узбекскими учёными [25]. По нашему мнению, данная методика может давать завышенные результаты определения, т.к. при аналитической длине волны 290 нм вклад в оптическую плотность вносят и другие фенольные соединения. Кроме того, из-за многократной экстракции (3 раза) сырья, которая не всегда может быть оправдана, поскольку при данных условиях может возрасти ошибка методики анализа.

В этой связи актуальным является исследование в плане совершенствования методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой.

ЦЕЛЬ. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали траву солодки голой *Glycyrrhiza glabra* L., образцы которой были заготовлены: № 1 – Самарская область (Кинельский район, п. Алексеевка), август 2021 г.; № 2 – г. Самара, Ботанический сад Самарского государственного медицинского университета, август 2021 г.; № 3 – Оренбургская область, (Сакмарский район, с. Татарская Каргала), июль 2017 г.; № 4 – Республика Казахстан, г. Державинск, июнь 2018 г.; № 5 – Самарская область (Большечерниговский район, с. Большая Черниговка), август 2019 г. Влажность растительного сырья определяли в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV изд.) ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»³.

В работе использовали метод спектрофотометрии, проведённой в соответствии с ГФ РФ XIV изд., ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях». Спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений оценивали на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве растворителя использовали спирт этиловый 96%.

В качестве СО использовали раствор пиностробина, приготовленный на спирте этиловом

³ Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1–4. Министерство здравоохранения РФ. М., 2018. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

96% (Рис. 1). СО пиностробина соответствовал требованиям фармакопейной статьи (ФС 42-0073-01) и был предоставлен научно-образовательному центру «Фармация» Самарского государственного медицинского университета для определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) степени чистоты, которая составила не менее 98,0%. Водно-спиртовые извлечения готовились с использованием спирта этилового 96% (марка х.ч. ООО «Гиппократ», Россия). Необходимые концентрации спирта (50, 60, 70, 80, 90%) были получены путём разведения спирта этилового 96% по таблице № 5 приложения к ГФ РФ XIV изд.

Приготовление рабочих растворов для анализа методом УФ-спектрофотометрии

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в коническую термостойкую колбу Эрленмейера со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 90%. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на лабораторных весах марки «Сарто ГОСМ» (Россия) с точностью до $\pm 0,001$. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем её охлаждали в течение 30 мин, закрывали той же пробкой, снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначального объёма. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр (красная полоса).

Для приготовления СО пиностробина для УФ-спектрофотометрии взвешивали около 0,02 г (точная навеска) вещества, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 30 мл спирта этилового 96% при нагревании на водяной бане. Использование спирта этилового 96% позволяло обеспечить наилучшее растворение СО пиностробина. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры, его объём доводили спиртом этиловым 96% до метки (раствор А СО пиностробина). Затем 1 мл раствора А СО пиностробина помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл спиртового раствора алюминия (III) хлорида 3% и доводили объём раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытываемый раствор Б СО пиностробина).

Раствор сравнения готовили следующим образом: 1 мл раствора А пиностробина помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили объём раствора до метки спиртом этиловым 96% (раствор сравнения Б пиностробина). Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора Б пиностробина на спектрофотометре при длине волны 310 нм на фоне раствора сравнения Б СО пиностробина.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении травы солодки голой

Около 1 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 2 мл 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида и доводили объём раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытываемый раствор А), перемешивали и оставляли на 40 мин для образования комплекса флавоноидов с алюминием. В качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки (раствор сравнения А). Затем измеряли оптическую плотность испытуемого раствора А на спектрофотометре при длине волны 310 нм на фоне раствора сравнения А.

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на пиноцембрин и абсолютно сухое сырьё в процентах (X, %) вычисляли по формуле:

$$x = \frac{D * m_0 * 50 * 50 * 1,05 * 100}{D_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность испытуемого раствора Б СО пиностробина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО пиноцембрин, г; W – потеря в массе при высушивании, %; 1,05 – коэффициент пересчёта.

В случае отсутствия СО пиностробина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 310 нм – 680.

$$x = \frac{D * 50 * 25 * 100}{m * 680 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 680 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО пиноцембрин при 310 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.

Валидация аналитической методики

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, прецизионность (уровень повторяемости), внутрилабораторная прецизионность, правильность в соответствии с ГФ РФ XIV издания. При выполнении расчётов использовалось программное обеспечение Microsoft Excel 2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения эксперимента были получены водно-спиртовые извлечения из травы солодки голой и изучены их УФ-спектры. В траве данного растения преобладают флаваноны, среди которых доминирующим флавоноидом является пиноцембрин (Рис. 1), имеющий максимум поглощения при длине 290 \pm 2 нм (Рис. 2).

На наш взгляд, именно пиноцембрин в основном определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из травы солодки голой (Рис. 3). Этот вывод соответствует литературным данным [7]. Так как пиноцембрин в Российской Федерации как СО не зарегистрирован, нами была изучена возможность использования в качестве СО пиностробина (ФС 42-0073-01), близкого по химическому строению пиноцембрину. Определено, что пиноцембрин и пиностробин имеют максимум поглощения при длине волны 290 нм (прямая спектрофотометрия) (Рис. 2 и 4). Принимая во внимание то обстоятельство, что в случае содержания суммы флавоноидов методом прямой спектрофотометрии, имеет место завышение результатов эксперимента, нами была изучена возможность использования дифференциальной спектрофотометрии, используя в качестве комплексообразующего реагента алюминия (III) хлорид.

Установлено, что при добавлении алюминия (III) хлорида к испытуемому раствору и растворам пиноцембрин и пиностробина наблюдается bathochromic сдвиг в длинноволновом спектре поглощения (Рис. 2–4). При этом определено, что дифференциальная спектрофотометрия по коротковолновому максимуму поглощения растворов пиностробина и пиноцембрин находятся при длине волны 310 нм (Рис. 5 и 6), тогда как в длинноволновой области спектра максимумы поглощения у них не совпадают, что позволяет нам рекомендовать в качестве аналитической длину волны 310 нм. При использовании СО пиностробина нами осуществлялся пересчёт содержания суммы флавоноидов на пиноцембрин путём введения в формулу расчёта коэффициента.

В случае отсутствия СО пиностробина использовали теоретическое значение удельного поглощения пиностробина, определённого нами экспериментально.

Было установлено, что наиболее полное извлечение флавоноидов из травы солодки голой достигается при экстракции спиртом этиловым 90%. Следующим этапом было проведение эксперимента по определению оптимального соотношения «сырьё-экстрагент» (1:50). Затем были установлены

временные параметры экстракции, в течение которых происходило максимальное извлечение флавоноидов из сырья – 60 мин. Заключительным этапом являлось определение степени измельчения сырья (2 мм), способствующее полному извлечению флавоноидов экстрагентом (табл. 1).

Специфичность методики определяли по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы солодки голой и раствора СО пиностробина с алюминия (III) хлоридом и дифференциального пика СО пиностробина.

Линейность методики определяли для серии растворов пиностробина с концентрациями в диапазоне от 0,016 до 0,16 мг/мл (0,016; 0,032; 0,08; 0,16). На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности растворов пиностробина с алюминия (III) хлоридом от концентрации пиностробина и затем рассчитывали уравнение линейной регрессии (Рис. 8).

При изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$, коэффициент корреляции составил 0,9981, следовательно, СО пиностробина может быть использован для анализа суммы флавоноидов в траве солодки голой в указанном диапазоне концентраций (Рис. 8).

Прецизионность (уровень повторяемости) оценивали путём анализа исследуемого образца растительного сырья в 11-кратной повторности. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой с доверительной вероятностью 95% составила $\pm 0,73\%$ (табл. 2).

Для оценки внутрилабораторной прецизионности анализ испытуемого образца производил другой аналитик в другие дни с использованием того же оборудования (табл. 3). Для каждого образца проводились исследования в количестве 6 повторностей. Из таблицы 3 видно, что расчётное значение F-критерия Фишера 1,06 меньше табличной величины 5,05. Следовательно, дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквивалентны и различия между полученными значениями не значимы. Таким образом, разработанная методика соответствует требованиям валидации по показателю внутрилабораторная прецизионность.

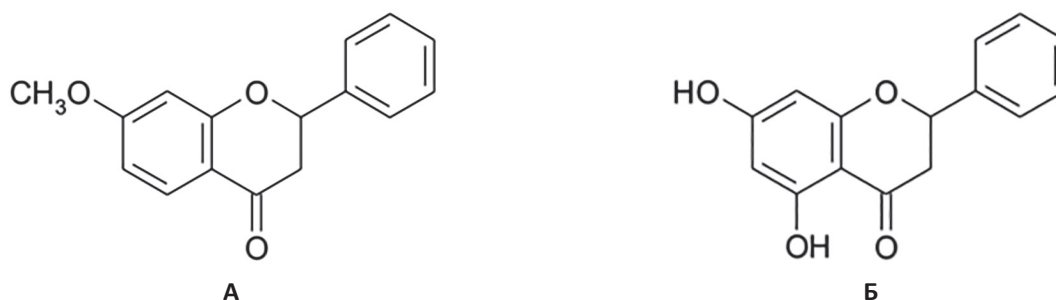


Рисунок 1 – Структурные формулы пиностробина (А) и пиноцембрин (Б)

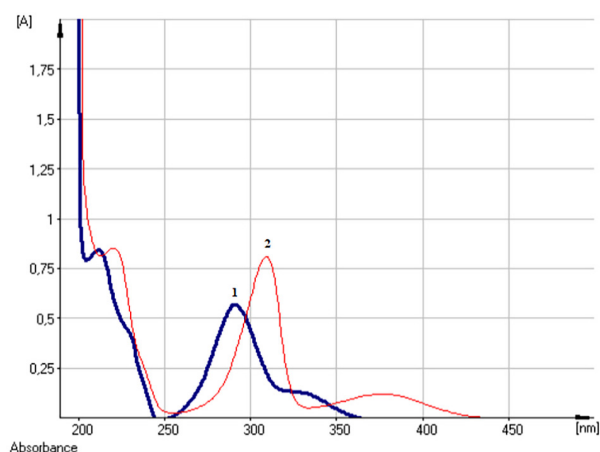


Рисунок 2 – Электронные спектры раствора пиноцембрин

Примечания: 1 – раствор пиноцембрин (прямая спектрофотометрия), 2 – раствор пиноцембрин с добавлением алюминия (III) хлорида

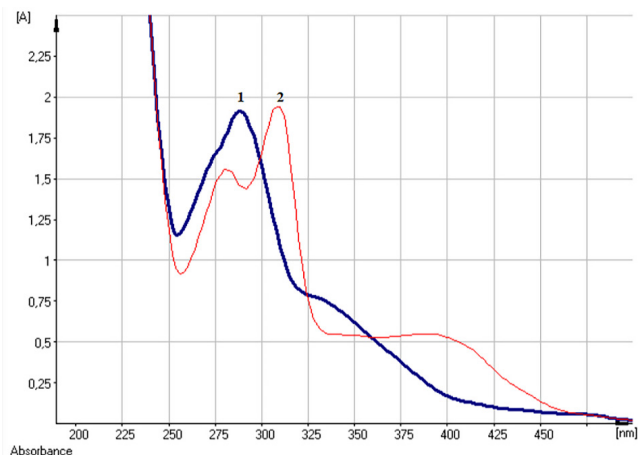


Рисунок 3 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из травы солодки голой

Примечания: 1 – раствор извлечения (прямая спектрофотометрия), 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия (III) хлорида

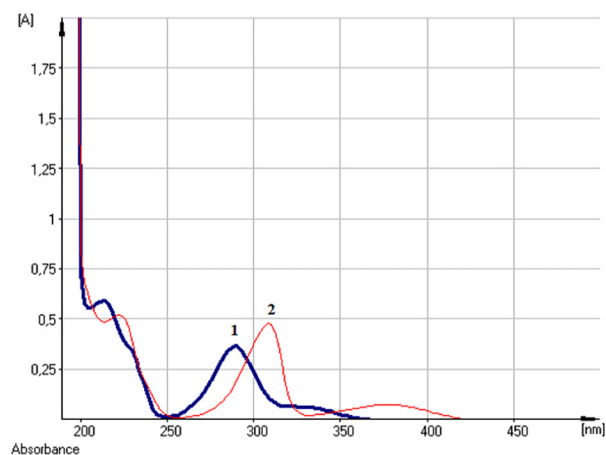


Рисунок 4 – Электронные спектры раствора пиностробина

Примечания: 1 – раствор пиностробина (прямая спектрофотометрия), 2 – раствор пиностробина с добавлением алюминия (III) хлорида

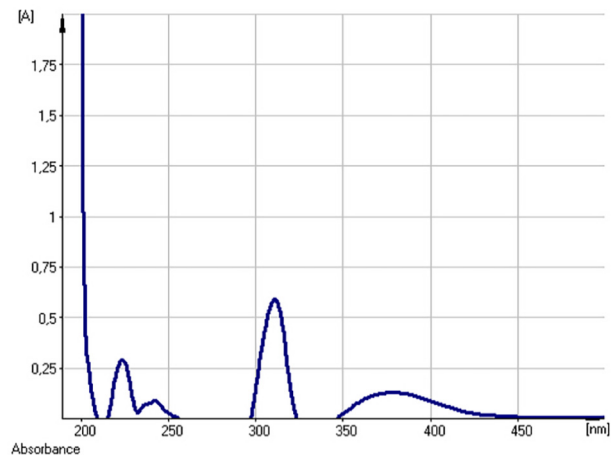


Рисунок 5 – Электронный спектр раствора пиноцембрин (дифференциальный спектр)

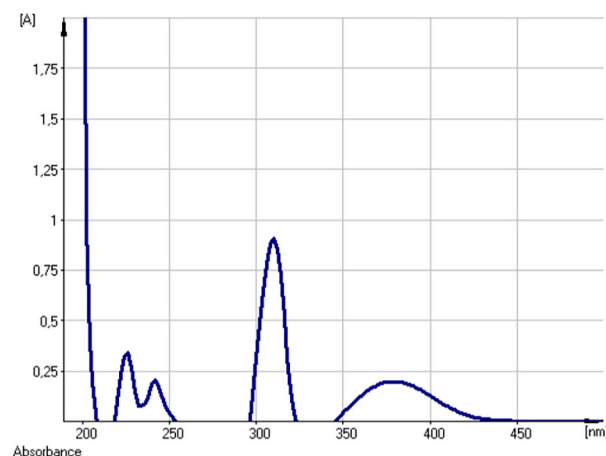


Рисунок 6 – Электронный спектр раствора пиностробина (дифференциальный спектр)

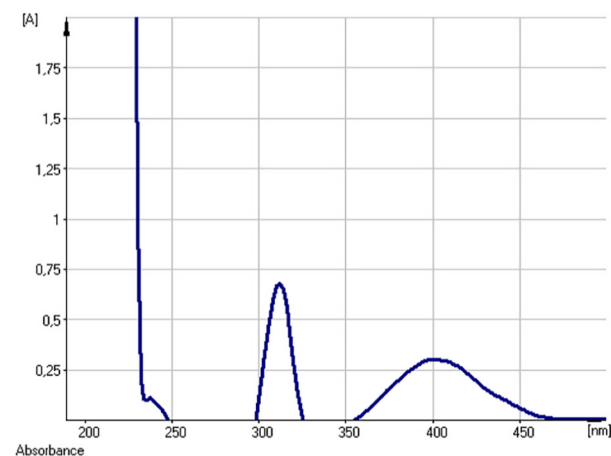


Рисунок 7 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из травы солодки голой (дифференциальный спектр)

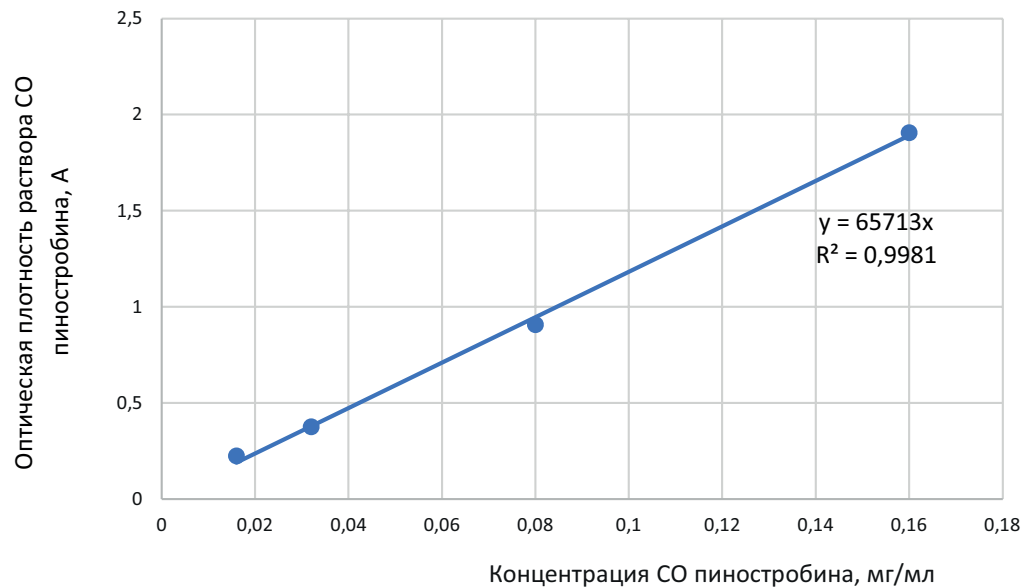


Рисунок 8 – Зависимость значений оптической плотности раствора пиностробина с алюминия (III) хлоридом от концентрации пиностробина (дифференциальный вариант)

Таблица 1 – Оптимальные показатели экстрагирования суммы флавоноидов из травы солодки голой при длине волны 310 нм

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье-экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельчения, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на пиноцембрин и абсолютно сухое сырье, %
I. Экстрагент				
50	1:50	60	2	1,50±0,006
60				1,19±0,005
70				1,21±0,031
80				1,86±0,005
90				2,28±0,001
96				1,59±0,007
II. Время экстракции				
90	1:50	30	2	2,02±0,008
		45		2,31±0,001
		60		2,76±0,012
		120		2,39±0,010
III. Степень измельчения				
90	1:50	60	1	3,10±0,013
			2	3,41±0,015
			3	2,52±0,011
IV. Соотношение «сырье–экстрагент»				
90	1:30	60	2	2,18±0,009
	1:50			3,41±0,015
	1:100			3,21±0,014

Таблица 2 – Результаты оценки прецизионности методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой (уровень повторяемости)

X, %	Метрологические характеристики
3,40	N=11
3,41	f=10
3,42	$\bar{X}=3,41$
3,42	SD=0,03690
3,45	RSD=1,0813%
3,46	$S_{\bar{X}}=0,01113$
3,39	P, %=95
3,47	t (P, t)=2,23
3,35	$\Delta\bar{X}=0,02481\%$
3,40	E=0,73%
3,37	

Таблица 3 – Валидационная оценка внутрилабораторной прецизионности методики определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

X, %	X, %	Метрологические характеристики	
Аналитик 1	Аналитик 2	Аналитик 1	Аналитик 2
3,40	3,39	$\bar{X}=3,43$	$\bar{X}=3,43$
3,42	3,41	SD=0,02229	SD=0,02229
3,42	3,42	RSD=0,2652%	RSD=0,2652%
3,44	3,43	$S_{\bar{X}}=0,009098$	$S_{\bar{X}}=0,009098$
3,45	3,44	P, %=95	P, %=95
3,46	3,45	t (P, t)=2,23 (табл.)	t (P, t)=2,23 (табл.)
		E=0,59%	E=0,59%
		$\Delta\bar{X}=0,02\%$	$\Delta\bar{X}=0,02\%$

Примечание: $t_{\text{выч}}=0,66 < t(95\%;6)$; $F_{\text{выч}}=1,06 < F(95\%;5;5)$ – различия между полученными результатами случайны.

Таблица 4 – Результаты оценки правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

Внесено пиностробина, мг/мл	Найдено, мг/мл	Открываемость, %	Метрологические характеристики
7,57	7,49	98,94	$\bar{X}=99,68\%$
7,57	7,52	99,34	SD=0,36062
7,57	7,56	99,87	RSD=0,3618%
15,15	15,08	99,54	$S_{\bar{X}}=0,120206$
15,15	15,11	99,74	P, %=95
15,15	15,16	100,07	t (P, t)=2,23
22,73	22,66	99,69	E=0,27%
22,73	22,70	99,87	$\Delta\bar{X}=0,27\%$
22,73	22,74	100,04	

Таблица 5 – Содержание суммы флавоноидов в образцах травы солодки голой (%) в пересчёте на пиноцембрин

№	Характеристика образца сырья	Содержание влаги в растительном сырье, %	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (%) в пересчёте на пиноцембрин
1.	Самарская область (Кинельский район, п. Алексеевка), август 2021	9,97±0,003	3,38±0,015
2.	г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, август 2021	9,96±0,003	0,48±0,002
3.	Оренбургская область, (Сакмарский район, с. Татарская Каргала), июль 2017	9,99±0,003	0,39±0,002
4.	Республика Казахстан, г. Державинск, июнь 2018	10,01±0,002	1,34±0,006
5.	Самарская область (Большечерниговский район, с. Большая Черниговка), август 2019	10,03±0,003	1,19±0,005

Правильность методики определяли методом добавок раствора СО пиностробина с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к испытуемому раствору водно-спиртового извлечения травы солодки голой. При этом средний процент открываемости составил $99,68 \pm 0,27\%$ (табл. 4). Для каждой концентрации проводили три определения. Погрешность, определяемая для проб с добавками СО, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствовало об отсутствии систематической погрешности (табл. 4).

Установлено, что среднее содержание флавоноидов в исследуемом образце сырья составило $3,41 \pm 0,015\%$ (относительная погрешность определения составила $\pm 0,73$).

Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммы флавоноидов в пересчёте на пиноцембрин.

С использованием этой методики было проанализировано 5 образцов травы солодки голой, заготовленных в летний период в разных местах произрастания (табл. 7). Определено, что содержание суммы флавоноидов в анализируемых образцах варьирует от $0,39 \pm 0,002$ до $3,41 \pm 0,015\%$ с учетом влажности растительного сырья от $9,97 \pm 0,003$ до $10,03 \pm 0,003\%$ в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья (табл. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведённого исследования была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием СО пиностробина при аналитической длине волны 310 нм.

Проведена валидационная оценка разработанной методики по показателям специфичность, линейность, прецизионность (уровень повторяемости), внутрिलाбораторная прецизионность, правильность в соответствии с ГФ РФ XIV издания. Исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно говорить о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммы флавоноидов в пересчёте на пиноцембрин.

Результаты исследования могут быть использованы при создании лекарственных растительных препаратов на основе травы солодки голой, обладающих нейропротекторной активностью, антифибротическими эффектами, антимикробным действием в отношении *Escherichia coli* и фотопротекторной эффективностью.

Полученные результаты исследования могут быть использованы при разработке проекта нормативной документации на перспективный вид сырья «Солодки голой трава».

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.А. Белова – сбор растительного материала для анализа, проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка черновика рукописи, анализ литературы, написание и подготовка рукописи для публикации;

В.А. Куркин – окончательное утверждение для публикации рукописи, обработка результатов, проверка критически важного интеллектуального содержания;

М.В. Егоров – участие в разработке концепции и дизайна исследования, критический анализ результатов исследования.

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Егоров М.В., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Быков В.А. Качественный и количественный анализ сырья и препаратов солодки // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 1. – С. 175–180.
2. Куркин В.А., Егоров М.В. Стандартизация корней солодки голой и лекарственного препарата «Солодки экстракт жидкий» // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 6, № 6. – С. 1232–1236.
3. Абдрахманова Г.М., Жаугашева С.К., Павелковская Г.П. Разработка технологии двуслойных суппозиториях на основе экстракта солодки и парацетамола // Фармация и фармакология. – 2014. – Т. 7, № 6. – С. 36–38. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-6(7)-36-38
4. Таланова И.О., Волкова Т.Г. Сравнительный анализ некоторых отхаркивающих препаратов на основе солодки // Международный научно-исследовательский журнал. – 2023. – Т. 129, № 3. – С. 1–5. DOI: 10.23670/IRJ.2023.129.29
5. Бровченко Б.В., Ермакова В.А., Боков Д.О., Самылина И.А., Демина Н.Б., Чернова С.В. Валидация ВЭЖХ методики определения содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 12. – С. 42–47. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-87-91.
6. Бровченко Б.В., Ермакова В.А., Боков Д.О., Самылина И.А., Лазарева Н.Б. Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и

- продуктах их переработки методом ВЭЖХ-УФ // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 87–91. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-87-91
7. Ермакова В.А., Самылина И.А., Ковалева Т.Ю., Бровченко Б.В., Доровских Е.А., Бобкова Н.В. Корни солодки: анализ фармакопейных требований // Фармация. – 2019. – Т. 68, № 6. – С. 16–19.
8. Юлдашев М.П., Ботиров Э.Х., Вдовин А.Д., Абдуллаев А.Д. Глабризофлафон – новый изофлавоноид из *Glycyrrhiza glabra* L. // Биоорганическая химия. – 2000. – Т. 26, № 11. – С. 873–876.
9. Ботиров Э.Х., Киямитдинова Ф., Маликов В.М. Флавоноиды надземной части *Glycyrrhiza glabra* // Химия природных соединений. – 1986. – № 1. – С. 111–112.
10. Gao M., Liu R., Zhu S.Y., Du G.H. Acute neurovascular unit protective action of pinocembrin against permanent cerebral ischemia in rats // J Asian Nat Prod Res. – 2008. – Vol. 10, No. 5–6. – P. 551–558. DOI: 10.1080/10286020801966955
11. Liu R., Gao M., Yang Z.H., Du G.H. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both *in vivo* and *in vitro* // Brain Res. – 2008. – Vol. 1216. – P. 104–115. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.03.049
12. Rasul A., Millimouno F.M., Ali Eltayb W., Ali M., Li J., Li X. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities // BioMed Res Int. – 2013. – Vol. 2013. – Art. ID: 379850. DOI: 10.1155/2013/379850
13. Shi L.L., Qiang G.F., Gao M., Zhang H.A., Chen B.N., Yu X.Y., Xuan Z.H., Wang Q.Y., Du G.H. Effect of pinocembrin on brain mitochondrial respiratory function // Acta Pharm Sin. – 2011. – Vol. 46, No. 6. – P. 642–649. Chinese
14. Wu C.X., Liu R., Gao M., Zhao G., Wu S., Wu C.F., Du G.H. Pinocembrin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress induced apoptosis // Neurosci Lett. – 2013. – No. 546. – P. 57–62. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.04.060
15. Li X., Zhai Y., Xi B., Ma W., Zhang J., Ma X., Miao Y., Zhao Y., Ning W., Zhou H., Yang C. Pinocembrin Ameliorates Skin Fibrosis via Inhibiting TGF- β 1 Signaling Pathway // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11, No. 8. – P. 1240. DOI: 10.3390/biom11081240
16. Said M.M., Azab S.S., Saeed N.M. Antifibrotic Mechanism of Pinocembrin: Impact on Oxidative Stress, Inflammation and TGF- β /Smad Inhibition in Rats // Ann Hepatol. – 2018. – Vol. 1 (17), No. 2. – P. 307–317. DOI: 10.5604/01.3001.0010.8661
17. Promsan S., Jaikumkao K., Pongchaidecha A., Chattipakorn N., Chatsudthipong V., Arjinajarn P., Pompimon W., Lungkaphin A. Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats // Can J Physiol Pharmacol. – 2016. – Vol. 94, No. 8. – P. 808–818. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0468
18. Dunstan M.S., Robinson C.J., Jervis A.J., Yan C., Carbonell P., Hollywood K.A., Currin A., Swainston N., Le Feuvre R., Micklefield J., Faulon J.L., Breitling R., Turner N., Takano E., Scrutton N.S. Engineering *Escherichia coli* towards *de novo* production of gatekeeper (2S)-flavanones: naringenin, pinocembrin, eriodictyol and homoeriodictyol // Synth Biol (Oxf). – 2020. – Vol. 5, No. 1. – Art. ID: ysaa012. DOI: 10.1093/synbio/ysaa012
19. Cao W., Ma W., Wang X. Enhanced pinocembrin production in *Escherichia coli* by regulating cinnamic acid metabolism // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – Art. ID: 32640. DOI: 10.1038/srep32640
20. García Forero A., Villamizar Mantilla D.A., Núñez L.A., Ocazone R.E., Stashenko E.E., Fuentes J.L. Photoprotective and Antigenotoxic Effects of the Flavonoids Apigenin, Naringenin and Pinocembrin // Photochem Photobiol. – 2019. – Vol. 95, No. 4. – P. 1010–1018. DOI: 10.1111/php.13085
21. Fuentes J.L., Villamizar Mantilla D.A., Flores González S.J., Núñez L.A., Stashenko E.E. Plants growing in Colombia as sources of active ingredients for sunscreens // Int J Radiat Biol. – 2021. – Vol. 97, No. 12. – P. 1705–1715. DOI: 10.1080/09553002.2021.1987564
22. Gu X., Zhang Q., Du Q., Shen H., Zhu Z. Pinocembrin attenuates allergic airway inflammation via inhibition of NF- κ B pathway in mice // Int Immunopharmacol. – 2017. – Vol. 53. – P. 90–95. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.10.005
23. Абдурахманов Б.А., Сотимов Г.Б., Халилов Р.М., Маматханов А.У. Технология получения субстанции на основе флавоноидов надземной части *Glycyrrhiza glabra* // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 10. – С. 18–22. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-10-18-22
24. Хасанова Р.Х., А.Н. Набиев, Вахабов А.А. Пиноцембрин препарат из солодки голой // Научно-практический журнал. «Гастроэнтерология Санкт-Петербурга». – 2003. – № 2–3. – С. 180.
25. Маматханова М.А., Абдурахманов Б.А., Нигматуллаев Б.А., Сотимов Г.Б., Халилов Р.М., Маматханов А.У. Изучение надземной части *Glycyrrhiza glabra* в качестве перспективного сырья для производства препаратов на основе флавоноидов // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 171–176.

АВТОРЫ

Белова Ольга Александровна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4767-0824. E-mail: belova_oa@pranapharm.ru

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами

фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7513-9352. E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Егоров Максим Валерьевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9441-2628. E-mail: m.v.egorov@samsmu.ru