

УДК 543.42.062:582.6/.9:615.322

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ *SALVIA STEPPOSA DES.-SHOST.*

© К.И. Каифуллина¹, С.Р. Хасанова^{1*}, Н.В. Кудашкина¹, Т.В. Булгаков²

¹ Башкирский государственный медицинский университет, ул. Ленина, 3,
Уфа, 450008, Россия, svet-khasanova@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, Москва, 19991, Россия

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях *Salvia stepposa Des.-Shost*. В основу разрабатываемой методики лег метод дифференциальной спектрофотометрии. В качестве целевого соединения выбран флавоноид – лютеолин-7-гликозид, что связано с присутствием его в исследуемом сырье и с совпадением максимумов поглощения дифференциальных спектров спиртового экстракта *S. stepposa* и спиртового раствора стандартного образца лютеолин-7-гликозида при добавлении к нему спиртового раствора алюминия хлорида при длине волны 396±2 нм. Изучены различные параметры экстракции для определения оптимальных условий экстрагирования флавоноидов (концентрация этилового спирта, кратность экстракции, время экстракции, размер частиц растительного сырья, соотношение растительного сырья и экстрагента), а также установлены необходимое количество и концентрация комплексообразователя, время образования и время устойчивости комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия. На основании проведенных исследований по изучению различных параметров экстракции определены оптимальные условия экстрагирования флавоноидов из листьев *S. stepposa*: измельченность сырья – 2.0 мм, экстрагент – 60% этиловый спирт, кратность экстракции – однократная, соотношение сырья и экстрагента 1 : 200, концентрации алюминия хлорида – 1%, время комплексообразования – 30 минут. Разработанная методика прошла проверку на линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность и является прецизионной.

Ключевые слова: флавоноиды, количественное определение, *Salvia stepposa Des.-Shost*, экстракция, валидация, лютеолин-7-гликозид.

Для цитирования: Каифуллина К.И., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Булгаков Т.В. Разработка и валидация методики выделения и количественного определения флавоноидов в листьях *Salvia stepposa Des.-Shost*. // Химия растительного сырья. 2025. №3. С. 167–175. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250316389>.

Введение

Род *Salvia* L., относящийся к семейству яснотковых (*Lamiaceae*), является одним из самых разнообразных и богатых лечебными свойствами родов в мире. Включает в себя около 900 видов, среди которых есть как однолетние, так и многолетние растения, травы, полукустарники и кустарники. Многие виды шалфея *Salvia* L. используются в традиционной и современной медицине в качестве средств профилактики и комплексной терапии заболеваний верхних дыхательных путей, гастроэнтерологических расстройств, инфекционно-воспалительных, кожных и других видов заболеваний. Род *Salvia* L. включает в себя множество видов, отличающихся как по морфологическим характеристикам, так и химическому составу. Богатую композицию биологически активных веществ рода *Salvia* L. составляют эфирные масла, флавоноиды, полифенолы, танины и другие соединения, обладающие антибактериальными [1, 2], противораковыми [3], антипролиферативными [4], противопротозойными [5] и другими фармакологически значимыми эффектами, которые неоднократно были подтверждены в научных исследованиях [6–11].

Некоторые виды данного рода признаны официальными и включены в фармакопеи различных стран мира [12–15]. На территории России произрастает около 80 видов рода *Salvia* L., как дикорастущих, так и

* Автор, с которым следует вести переписку.

культивируемых. Однако многие виды данного рода остаются недостаточно изученными и не используются в медицинских целях, что делает актуальным поиск перспективных видов из рода *Salvia* L. и разработку растительных лекарственных средств на их основе. Одним из таких видов является *Salvia stepposa* Des.-Shost., произрастающий на территории Республики Башкортостан как дикорастущее растение [16]. Исследования химического состава *S. stepposa* достаточно фрагментарны, и в научной литературе имеются ограниченные сведения о его химическом составе. Так, есть данные о содержании в различных частях *S. stepposa* таких групп биологически активных веществ, как флавоноиды, фенилпропаноиды, дубильные вещества, полисахариды, сапонины [8, 17, 18]. Флавоноиды считаются одними из приоритетных групп видов рода *Salvia* L., обуславливающих противовоспалительные свойства [19]. В *S. stepposa* из группы флавоноидов идентифицированы флавоноловые гликозиды, такие как рутин, лютеолин-7-гликозид [20, 21].

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях *S. stepposa* и проверка ее валидационных характеристик.

Экспериментальная часть

Объектом исследования стали листья *S. stepposa*, собранные на территории Республики Башкортостан в июле 2024 года в период цветения растения. Идентификацию *S. stepposa* проводили с использованием определителя растений [16]. Сыре высушивали воздушно-теневым способом. Хранили в сухом проветриваемом помещении при комнатной температуре, при влажности не более 50%. Для количественного определения флавоноидов применен метод дифференциальной спектрофотометрии. Изучены различные параметры экстракции для определения оптимальных условий экстрагирования флавоноидов (концентрация этилового спирта, кратность экстракции, время экстракции, размер частиц растительного сырья, соотношение растительного сырья и экстрагента), а также установлены необходимое количество и концентрация комплексообразователя, время образования и время устойчивости комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия [22]. Навеску сырья взвешивали при помощи аналитических весов OHAUS Pioneer PA214C (Швейцария). Спектрофотометрическое исследование проводилось на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 (Япония). В качестве комплексообразователя использовали алюминия хлорид (III) (№0001422561, Panreac, Испания), в качестве экстрагента – этиловый спирт 95% (№3531122, ООО «Константа-Фарм М», Россия). Получение спиртовых извлечений листьев *S. stepposa* проводили с применением водяной бани LOIP LB-140 (Эстония), раствором сравнения служил стандартный образец лютеолин-7-гликозида (Сигмабиосинтез, Россия). Дифференциальный спектр листьев *S. stepposa* измеряли в диапазоне от 350 до 450 нм. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica.10» с использованием критерия Стьюдента [23]. Пригодность разработанной методики проверяли по следующим параметрам – линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность [24].

Для разработки методики количественного определения флавоноидов в листьях *S. stepposa* необходимо было выбрать целевое вещество, на которое будет производиться пересчет. Методом тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А 100×150 мм в системе этилацетат – муравьиная кислота – вода (15 : 3 : 4) при сравнении со стандартными образцами установлено присутствие в сырье флавоноидных гликозидов группы флавонолов, таких как лютеолин-7-гликозид, рутин и гиперозид. По наиболее интенсивному свечению зоны лютеолин-7-гликозида на хроматограмме нами было вынесено предположение о том, что данный флавоноид является доминирующим в исследуемом сырье. Далее исследование дифференциального спектра спиртового экстракта *S. stepposa* показали, что у исследуемого образца максимум поглощения при добавлении раствора алюминия хлорида находился при 396±2 нм (рис. 1), что соответствует стандартному образцу лютеолин-7-гликозида (рис. 1) [25]. На основании полученных данных прототипом разрабатываемой методики стала методика количественного определения флавоноидов в траве тимьяна обыкновенного в пересчете на лютеолин-7-гликозид [26].

Для выбора оптимального экстрагента были получены извлечения из листьев *S. stepposa* с использованием этилового спирта различных концентраций – 40, 50, 60, 70, 80, 96%. Наибольший выход флавоноидов наблюдался при использовании 60% этилового спирта (табл. 1).

Для определения оптимальной концентрации и количества комплексообразователя экстракты подвергались воздействию 1, 2, 3, 4, 5% алюминия хлорида в количестве 1, 2, 3, 4, 5 мл. Максимальная оптическая плотность наблюдалась при использовании 1% спиртового раствора алюминия хлорида (III) в количестве 5 мл (табл. 1).

При определении временного интервала комплексообразования максимальная оптическая плотность наблюдалась через 30 мин с начала реакции. Комплекс оставался стабильным не менее 30 мин (рис. 2).

Для определения оптимальной измельченности сырья содержание флавоноидов определяли в извлечениях из листьев *S. stepposa*, измельченных до размера 1, 2, 3, 4 и 5 мм. Установлено, что максимально извлекаются флавоноиды при использовании сырья размером 1–2 мм (табл. 1).

Далее исследовали различное соотношение сырья и экстрагента, а именно – 1 : 50, 1 : 100 и 1 : 200. Максимальный выход флавоноидов наблюдался при соотношении сырья и экстрагента 1 : 200 (табл. 1).

Далее было проверено влияние кратности экстракции при использовании данного соотношения. По результатам одно-, двух- и трехкратной экстракции пришли к выводу, что кратность экстракции не влияет на выход флавоноидов и однократная экстракция является достаточной для максимального извлечения целевой группы компонентов (табл. 1).

На основании проведенного исследования разработана следующая методика количественного определения флавоноидов в листьях *S. stepposa*: 1.0 г (точная навеска) сырья, измельченного до 2 мм, помещают в колбу на 250 мл, прибавляют 200 мл 60% этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане 30 мин. Затем извлечение фильтруют и доводят в мерной колбе до 200 мл этиловым спиртом концентрации 60% (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл 1% спиртового раствора хлорида алюминия, 0.1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят раствор до метки 60% этиловым спиртом (раствор В). Оптическую плотность полученного раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете толщиной слоя 1 см. Раствором сравнения служит следующий раствор: 2 мл раствора А, 0.1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доведенный 60% этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов (Х) в пересчете на лютеолин-7-гликозид и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 0.05 \cdot 1}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot 25},$$

где А – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность раствора Б СО лютеолин-7-гликозида; м – навеска сырья, г; В – влажность сырья, %.

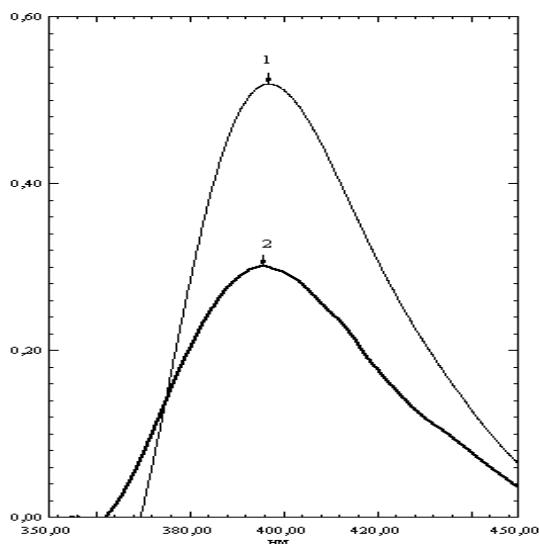


Рис. 1. Дифференциальный спектр СО лютеолин-7-гликозид (1), дифференциальный спектр экстракта листьев *S. stepposa* (2)

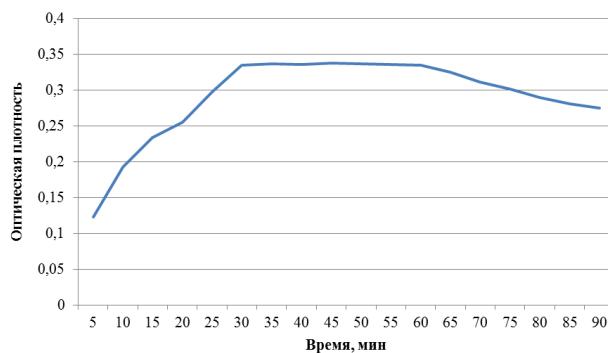


Рис. 2. График зависимости комплексообразования от времени

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид также можно вычислить с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолин-7-гликозид с алюминия хлоридом по формуле

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 100 \cdot 25}{E \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора (раствор В); Е – удельный показатель поглощения лютеолин-7-гликозид с хлоридом алюминия, равный 400; м – навеска сырья, г; В – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Результаты представлены в таблице 1.

Обсуждение результатов

Разработанная методика количественного анализа подверглась процессу верификации, называемым валидацией, путем предоставления объективных доказательств пригодности данной методики. Доказательствами пригодности являются следующие критерии стандартизации: линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность [24].

Для определения линейности готовили 5 концентраций флавоноидов (от 60 до 140%) в пересчете на лютеолин-7-гликозид от содержания флавоноидов в листьях *S. stepposa*. Для выяснения, является ли методика линейной, необходимо было рассчитать коэффициент корреляции. Размер данного коэффициента должен быть не меньше 0.99, что является свидетельством линейной зависимости. В нашем случае $r = 0.994$, следовательно, разработанная методика отвечает критериям линейности (табл. 2–3, рис. 3).

При исследовании следующего критерия – повторяемости измеряли оптическую плотность 9 аликвот (получали извлечения из 3 образцов сырья в 3 повторениях). Далее рассчитывали относительное стандартное отклонение, значение которого не должно превышать 10%. В нашем случае показатель составил 6.00% (табл. 4).

Для определения воспроизводимости исследования выполняли два аналитика на 3 образцах и использовали 3 повторения измерений каждого образца (табл. 5). Далее рассчитывали относительное стандартное отклонение – показатель приемлемости воспроизводимости методики, который не должен быть выше 15%. В нашем случае показатель находился в пределах от 2.71 до 3.42%. Полученные данные свидетельствуют о прецизионности методики в условиях воспроизводимости.

Таблица 1. Влияние условий экстрагирования на содержание суммы флавоноидов в листьях *S. stepposa*

Концентрация этанола, %	Содержание флавоноидов, %	Время экстракции, мин	Содержание флавоноидов, %
40	1.55±0.08	10	1.18±0.06
50	1.74±0.09	15	1.34±0.07
60	1.80±0.09	30	1.84±0.09
70	1.38±0.07	45	1.83±0.09
80	1.58±0.08	60	1.84±0.09
96	1.06±0.05	–	–
Концентрация AlCl ₃ , %	Содержание флавоноидов, %	Количество AlCl ₃ 1% р-р, мл	Содержание флавоноидов, %
1	2.10±0.10	1	1.91±0.10
2	1.95±0.10	2	1.95±0.10
3	1.95±0.10	3	2.02±0.10
4	2.09±0.10	4	2.09±0.10
5	2.14±0.10	5	2.15±0.10
Измельченность сырья, мм	Содержание флавоноидов, %		
1		2.19±0.11	
2		2.19±0.11	
3		2.16±0.11	
4		2.04±0.10	
5		2.01±0.10	
Соотношение сырье – экстрагент	Содержание флавоноидов, %	Кратность экстракции	Содержание флавоноидов, %
1 : 50	1.16±0.06	1-кратная	2.04±0.10
1 : 100	1.38±0.07	2-кратная	2.03±0.10
1 : 200	1.51±0.08	3-кратная	2.04±0.10

Таблица 2. Определение линейности

Содержание, %	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов в аликвоте, в пересчете на лютеолин-7-гликозид, мг
60	1.2	0.193	0.579
80	1.6	0.248	0.992
100	2.0	0.290	1.450
120	2.4	0.335	2.010
140	2.8	0.389	2.720

Таблица 3. Данные для вычисления коэффициента корреляции

N	X	Y	XY	X ²	Y ²
1	1.2	0.579	0.694	1.44	0.335
2	1.6	0.992	1.587	2.56	0.984
3	2.0	1.450	2.900	4.00	2.102
4	2.4	2.010	4.824	5.76	4.040
5	2.8	2.720	7.616	7.84	7.398
Σ	$\Sigma X=10$	$\Sigma Y=7.751$	$\Sigma XY=17.621$	$\Sigma X^2=21.600$	$\Sigma Y^2= 14.859$
Коэффициент корреляции		$r = 0.994$			

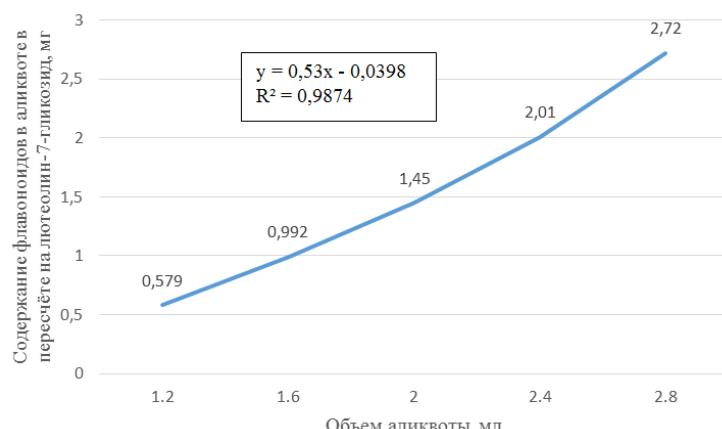


Рис. 3. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов

Таблица 4. Определение повторяемости

№ пробы	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в листьях <i>S. stepposa</i> , %	№ пробы	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в листьях <i>S. stepposa</i> , %	№ пробы	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в листьях <i>S. stepposa</i> , %
1	1.84	4	1.98	7	2.07
2	1.90	5	1.99	8	2.15
3	1.93	6	2.04	9	2.22
Среднее значение		2.013			
Относительное стандартное отклонение		6.00%			

Таблица 5. Определение воспроизводимости

Повторность	Аналитик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в листьях <i>S. stepposa</i> , %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	1	2.05	1.89	2.13
2	1	2.11	1.99	2.10
3	1	1.99	1.95	2.22
4	2	2.09	1.99	2.19
5	2	2.12	1.80	2.08
6	2	2.00	1.92	2.27
Среднее значение		2.06	1.92	2.17
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		2.71	3.74	3.42

Следующий критерий – правильность определяли в экстрактах, полученных с добавлением к ним известного количества стандартного образца – в данном исследовании таковым служит стандартный образец лютеолин-7-гликозида. Далее рассчитывали ожидаемую и фактически полученную концентрацию флавоноидов в листьях *S. stepposa*. Затем рассчитывали отклонение, величина которого не должна была превышать 5%. Экспериментальная величина погрешности находилась в пределах от 96.38 до 104.63% (табл. 6), что свидетельствовало о прецизионности методики в условиях правильности.

Таблица 6. Определение правильности

Объем экстракта в аликовте, мл	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в аликовте, мг	Добавлено СО лютеолин-7-гликозида, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %
1	0.515		1.015	1.062	0.047 (4.63%)
1.5	0.883		1.383	1.333	-0.050 (3.62%)
2	1.395	0.5	1.895	1.846	-0.049 (2.59%)

Выходы

Таким образом, на основании проведенных исследований разработана и валидирована методика количественного определения флавоноидов в листьях *S. stepposa*. Определены оптимальные условия экстрагирования, а именно: измельченность сырья – 2.0 мм, концентрация этилового спирта – 60%, соотношение сырья и экстрагента – 1 : 200, концентрации AlCl_3 – 1%, время комплексообразования – 30 мин, кратность экстракции – однократная.

Разработанная методика прошла проверку на пригодность: линейность (коэффициент корреляции составил 0.994), повторяемость (относительное стандартное отклонение – 6%), воспроизводимость (относительное стандартное отклонение в пределах – 2.71–3.42%) и правильность (величина погрешности в пределах 2.59–4.63%), на основании чего можно сделать вывод, что данная методика является прецизионной.

Полученные данные могут быть использованы для разработки проекта нормативной документации на листья *S. stepposa*.

Финансирование

Исследования выполнены при поддержке государственной программы поддержки университетов «Приоритет 2030», а также в рамках международного сотрудничества с Исследовательским центром фармацевтических наук при университете медицинских наук Шахида Бехешти (Тегеран, Иран), проект Herbal Data Bank.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Levaya Ya.K., Zholdasbaev M.E., Atazhanova G.A., Akhmetova S.B. Antibacterial activity of ultrasonic extracts of *Salvia stepposa* growing in Kazakhstan // Bulletin of the Karaganda university. Biology. Medicine. Geography Series. 2021. Vol. 101, no. 1. Pp. 45–49. <https://doi.org/10.31489/2021BMG1/45-49>.
2. Тавасиев Т.В., Коршунова К.В. Антимикобактериальная эффективность эфирных масел *in vitro* у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких // Молодые ученые – медицине: материалы XXII научной конференции молодых ученых и специалистов с международным участием. Владикавказ, 2023. С. 71–76.
3. Srećković N., Mišić D., Gašić U., Matić S.Lj., Katanić Stanković J.S., Mihailović N.R., Monti D.M., D'Elia L., Mihailović V. Meadow sage (*Salvia stepposa*): A neglected sage species with valuable phenolic compounds and biological potential // Industrial Crops and Products. 2022. Vol. 189. 115841. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115841>.
4. Бубенчикова В.Н., Кондратова Ю.А. Антипролиферативная активность водорастворимых полисахаридных комплексов растений рода *Salvia* L. // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. №3. С. 91–93.
5. Montesino N.L., Schmidt T.J. Salvia Species as Sources of Natural Products with Antiprotozoal Activity // International Journal of Molecular Sciences. 2018. Vol. 19, no. 1. 264. <https://doi.org/10.3390/ijms19010264>.

6. Кашфуллина К.И., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Булгаков Т.В. Исследование метаболомного профиля *Salvia stepposa* Des.-Shost. методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. 2024. Т. 3, №19. С. 71–76. <https://doi.org/10.51620/2687-1521-2024-3-19-71-76>.
7. Агаджанян А.А. Гипогликемическая и гиполипидемическая активность экстракта листьев *Salvia officinalis* L. // Евразийский союз ученых. 2015. С. 5–8.
8. Левая Я.К., Атажанова Г.А. Химический состав и фармакологическая активность некоторых видов шалфея // Евразийское Научное Объединение. 2020. №2-1(60). С. 75–78.
9. Немерешина О.Н., Никоноров А.А., Тиньков А.А., Малкова Т.Л. Применение метода газовой хромато-масс-спектрометрии в исследовании биологически активных веществ *Salvia stepposa* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2017. №2. С. 32–37.
10. Айтбеков Р.Н., Мурзахметова М.К., Жаманбаева Г.Т., Жусупова А.И. Фармакологические свойства *Salvia officinalis* и его компонентов // Фармация Казахстана. 2023. №5. С. 390–400. <https://doi.org/10.53511/pharmkaz.2023.26.73.051>.
11. Патент №2736357 (РФ). Композиция традиционной китайской медицины для лечения гипертонии, вызванной атеросклерозом, и ее применение / Г. Вань, Ю. Цзин, Г. Пань, М. Чжу, Ц. Вань, П. Ли, Х. Ню, Ц. Сюэ. – 2020.
12. British Herbal Pharmacopoeia. Processed *Salvia Miltorrhiza* Rhizome and Root. British Pharmacopeia Online, 2014.
13. Yiqun D., Ziyu Y., Hui L., Ruirui Z., Lanlan S., Shuai L., Guoyong X., Yan Z., Yucheng Z., Minjian Q. The chemical profiling of *Salvia plebeia* during different growth periods and the biosynthesis of its main flavonoids ingredients // Frontiers in Plant Science. 2023. Vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1228356>.
14. European pharmacopoeia 8.0, 2013, ref. 1889 and 1561.
15. ФС.2.5.0051.15. Шалфея лекарственного листья // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/shalfeya-lekarstvennogo-listya-salviae-officinalis-folia/>.
16. Алексеев Ю.Е., Галеева А.Х., Губанов И.А., Гуфранова И.Б., Жирнова Т.В., Князев М.В., Кулагин Ю.З., Кулаковская Л.А., Культиасов И.М., Кучеров Е.В., Михайлова Т.П., Мулдашев А.А., Скворцов А.К., Тихомиров В.Н., Шурова Е.А. Определитель высших растений Башкирской АССР. М., 1989. Т. 2. 375 с.
17. Левая Я.К., Атажанова Г.А., Ивасенко С.А., Сапиева А.О., Смагулов М.К. Розмариновая кислота из *Salvia stepposa* и ее антирадикальная активность // Вестник Карагандинского университета. Серия Биология. Медицина. География. 2023. №4(112). С. 150–155. <https://doi.org/10.31489/2023BMG4/150-155>.
18. Полухина Т.С., Сальникова Н.С., Алахвердиева К.Ш. Количественное содержание тритерпеновых сапонинов в сырье *Salvia stepposa* Schost. // Прикаспийский вестник медицины и фармации. 2021. Т. 2, №4. С. 19–23. <https://doi.org/10.17021/2021.2.4.19.23>.
19. Mansourabadi A.M., Sadeghi H.M., Razavi N., Rezvani E. Anti-inflammatory and analgesic properties of salvigenin, *Salvia officinalis* flavonoid extracted // Adv. Herb. Med. 2015. Vol. 1. Pp. 31–41.
20. Полухина Т.С. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье шалфея степного // Медико-фармацевтический журнал Пульс. 2020. Т. 22, №9. С. 52–57. <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-9-52-57>.
21. Немерешина О.Н. Изучение биологически активных веществ *Salvia stepposa* // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2014. Т. 12, №3. С. 36–41.
22. Потанина А.П., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В. Разработка методики количественного определения флавоноидов в растительном сборе «Кардиофит» // Башкирский химический журнал. 2013. Т. 20, №3. С. 60–62.
23. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М., 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/?ysclid=m3br9crflh866058209>.
24. Дьякова Н.А. Разработка и валидация методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов из корней подсолнечника однолетнего // Химия растительного сырья. 2022. №4. С. 59–66. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20220410906>.
25. Лапина А.С., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации травы монарды дудчатой // Фармация. 2019. Т. 68, №4. С. 11–16. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-02>.
26. ФС.2.5.0097.18. Тимьяна обыкновенного трава // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М., 2023. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/timyana-obyknovennogo-trava-thymi-vulgaris-herba/?phrase_id=763794.

Поступила в редакцию 26 ноября 2024 г.

После переработки 13 января 2025 г.

Принята к публикации 20 февраля 2025 г.

Kashfullina K.I.¹, Khasanova S.R.^{1}, Kudashkina N.V.¹, Bulgakov T.V.² DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF ISOLATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN LEAVES OF *Salvia stepposa* DES.-SHOST.*

¹ Bashkir State Medical University, st. Lenina, 3, Ufa, 450008, Russia, svet-khasanova@yandex.ru

² Moscow State University named after M.V. Lomonosova, Leninskie Gory, 1, Moscow, 19991, Russia

The aim of the study was to develop and validate a method of quantitative determination of flavonoids in *Salvia stepposa* Des.-Shost leaves. The basis of the developed methodology is the method of differential spectrophotometry. The flavonoid luteolin-7-glycoside was chosen as the main compound due to its presence in the studied raw material and to the match of absorption maxima of differential spectra of alcoholic extract of *S. stepposa* and alcoholic solution of standard sample of luteolin-7-glycoside when adding alcoholic solution of aluminum chloride at a wavelength of 396±2 nm. Various extraction parameters were studied to determine the optimal conditions for extraction of flavonoids (concentration of ethyl alcohol, extraction rate, extraction time, particle size of plant material, ratio of plant material and extractant), as well as the required amount and concentration of complexing agent, formation time and stability time of flavonoids complex with aluminum chloride were determined. On the basis of the conducted research of the study of various extraction parameters there were determined the optimal conditions for extraction of flavonoids from the leaves of *S. stepposa*: grinding of raw materials – 2.0 mm, extractant – 60% ethyl alcohol, extraction rate - single, the ratio of raw materials and extractant 1 : 200, aluminum chloride concentration – 1%, complexation time – 30 minutes. The developed methodology was tested for linearity, repeatability, reproducibility and correctness. Therefore, the developed method is precision.

Keywords: flavonoids, quantitative determination, *Salvia stepposa* Des.-Shost., extraction, validation, luteolin-7-glycoside.

For citing: Kashfullina K.I., Khasanova S.R., Kudashkina N.V., Bulgakov T.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 3, pp. 167–175. (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250316389>.

References

1. Levaya Ya.K., Zholdasbaev M.E., Atazhanova G.A., Akhmetova S.B. *Bulletin of the Karaganda university. Biology. Medicine. Geography Series*, 2021, vol. 101, no. 1, pp. 45–49. <https://doi.org/10.31489/2021BMG1/45-49>.
2. Tavasiyev T.V., Korshunova K.V. *Molodye uchenyye – meditsine: Materialy XXII nauchnoy konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov s mezhdunarodnym uchastiyem*. [Young scientists – medicine: Proceedings of the XXII scientific conference of young scientists and specialists with international participation]. Vladikavkaz, 2023, pp. 71–76. (in Russ.).
3. Srećković N., Mišić D., Gašić U., Matić S.I.j., Katanić Stanković J.S., Mihailović N.R., Monti D.M., D'Elia L., Mihailović V. *Industrial Crops and Products*, 2022, vol. 189, 115841. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115841>.
4. Bubenchikova V.N., Kondratova Yu.A. *Meditinskij vestnik Bashkortostana*, 2013, no. 3, pp. 91–93. (in Russ.).
5. Montesino N.L., Schmidt T.J. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 1, 264. <https://doi.org/10.3390/ijms19010264>.
6. Kashfullina K.I., Khasanova S.R., Kudashkina N.V., Bulgakov T.V. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*, 2024, vol. 3, no. 19, pp. 71–76. <https://doi.org/10.51620/2687-1521-2024-3-19-71-76>. (in Russ.).
7. Agadzhanyan A.A. *Yevraziyiskiy soyuz uchenykh*, 2015, pp. 5–8. (in Russ.).
8. Levaya Ya.K., Atazhanova G.A. *Yevraziyiskoye Nauchnoye Ob'yedineniye*, 2020, no. 2-1(60), pp. 75–78. (in Russ.).
9. Nemerezhina O.N., Nikonorov A.A., Tin'kov A.A., Malkova T.L. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevicheskoy khimii*, 2017, no. 2, pp. 32–37. (in Russ.).
10. Aytbekov R.N., Murzakhmetova M.K., Zhamanbayeva G.T., Zhusupova A.I. *Farmatsiya Kazakhstana*, 2023, no. 5, pp. 390–400. <https://doi.org/10.53511/pharmkaz.2023.26.73.051>. (in Russ.).
11. Patent 2736357 (RU). 2020. (in Russ.).
12. *British Herbal Pharmacopoeia. Processed Salvia Miltiorrhiza Rhizome and Root*. British Pharmacopeia Online, 2014.
13. Yiqun D., Ziyu Y., Hui L., Ruirui Z., Lanlan S., Shuai L., Guoyong X., Yan Z., Yucheng Z., Minjian Q. *Frontiers in Plant Science*, 2023, vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1228356>.
14. *European pharmacopoeia 8.0*, 2013, ref. 1889 and 1561.
15. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition]. Moscow, 2018. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/shalfeya-lekarstvennogo-listya-salviae-officinalis-folia/>. (in Russ.).
16. Alekseyev Yu.Ye., Galeyeva A.Ku., Gubanov I.A., Gufranova I.B., Zhirnova T.V., Knyazev M.V., Kulagin Yu.Z., Kulakovskaya L.A., Kul'tiasov I.M., Kucherov Ye.V., Mikhaylova T.P., Muldashev A.A., Skvortsov A.K., Tikhomirov V.N., Shurova Ye.A. *Opredelitel' vysshikh raseniyy Bashkirskoy ASSR*. [Key to higher plants of the Bashkir Autonomous Soviet Socialist Republic]. Moscow, 1989, vol. 2, 375 p. (in Russ.).
17. Levaya Ya.K., Atazhanova G.A., Ivasenko S.A., Sapiyeva A.O., Smagulov M.K. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya Biologiya. Meditsina. Geografiya*, 2023, no. 4(112), pp. 150–155. <https://doi.org/10.31489/2023BMG4/150-155>. (in Russ.).
18. Polukhina T.S., Sal'nikova N.S., Alakhverdiyeva K.Sh. *Prikaspiyskiy vestnik meditsiny i farmatsii*, 2021, vol. 2, no. 4, pp. 19–23. <https://doi.org/10.17021/2021.2.4.19.23>. (in Russ.).
19. Mansourabadi A.M., Sadeghi H.M., Razavi N., Rezvani E. *Adv. Herb. Med.*, 2015, vol. 1, pp. 31–41.

* Corresponding author.

20. Polukhina T.S. *Mediko-farmatsevicheskiy zhurnal Pul's*, 2020, vol. 22, no. 9, pp. 52–57. <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-9-52-57>. (in Russ.).
21. Nemershina O.N. *Vestnik Novosibirskogo go-sudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina*, 2014, vol. 12, no. 3, pp. 36–41. (in Russ.).
22. Potanina A.P., Khasanova S.R., Kudashkina N.V. *Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal*, 2013, vol. 20, no. 3, pp. 60–62. (in Russ.).
23. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition]. Moscow, 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/?ysclid=m3br9crfh866058209>. (in Russ.).
24. D'yakova N.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2022, no. 4, pp. 59–66. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20220410906>. (in Russ.).
25. Lapina A.S., Kurkin V.A. *Farmatsiya*, 2019, vol. 68, no. 4, pp. 11–16. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-02>. (in Russ.).
26. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition]. Moscow, 2023. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/timyana-obyknovennogo-trava-thymi-vulgaris-herba/?sphrase_id=763794. (in Russ.).

Received November 26, 2024

Revised January 13, 2025

Accepted February 20, 2025

Сведения об авторах

Кашфуллина Камилла Ильдаровна – ассистент кафедры фармакологии, svet-khasanova@yandex.ru
 Хасанова Светлана Рашитовна – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармакогнозии и ботаники, svet-khasanova@yandex.ru
 Кудашкина Наталья Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор, декан фармацевтического факультета, заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники, phytoart@mail.ru
 Булгаков Тимур Вилюрович – кандидат фармацевтических наук, ведущий специалист допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории, svet-khasanova@yandex.ru

Information about authors

Kashfullina Kamilla Ildarovna – assistant of the pharmacology department, svet-khasanova@yandex.ru
 Khasanova Svetlana Rashitovna – doctor of pharmaceutical sciences, professor, professor of the department of pharmacognosy and botany, svet-khasanova@yandex.ru
 Kudashkina Natalya Vladimirovna – doctor of pharmaceutical sciences, professor, dean of the pharmaceutical faculty, head of the department of pharmacognosy and botany, phytoart@mail.ru
 Bulgakov Timur Vilyurovich – candidate of pharmaceutical sciences, leading specialist of doping control of the National anti-doping laboratory, svet-khasanova@yandex.ru