

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Абдулкарим Аффиф, О.Л. Блинова, А.А. Гилева, В.Д. Белоногова, А.Ю. Турышев
Пермская государственная фармацевтическая академия,
Российская Федерация, 614990, Пермь, ул. Полевая, д. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абдулкарим Аффиф – аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА). Тел.: +7 (965) 575-40-94. E-mail: aboud.bashar89@gmail.com

Блинова Ольга Леонидовна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (952) 328-76-22. E-mail: oblinova@mail.ru

Гилева Ангелина Александровна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (964) 185-60-96. E-mail: angelinaustino@mail.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (919) 715-93-17. E-mail: belonogova@pfa.ru

Турышев Алексей Юрьевич – ректор ПГФА, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7(342) 233-55-01. E-mail: perm@pfa.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. С целью стандартизации сырья якорцев стелющихся нами была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Чтобы данная методика гарантировала достоверные и точные результаты анализа предусмотрена процедура валидации разработанной методики.

Цель исследования – валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в якорцах стелющихся траве с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

Материал и методы. Валидацию методики проводили на объединенном образце якорцев стелющихся травы. Валидационные параметры определяли на спектрофотометрах СФ – 2000 и SHIMADZU UV – 1800.

Результаты. Установлены валидационные характеристики: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность. Линейность определяли на пяти уровнях концентрации. Коэффициент корреляции составил 0,995, что говорит о линейной зависимости между величинами оптической плотности и содержанием суммы флавоноидов в извлечениях. Повторяемость методики определяли в десятикратной повторности в идентичных условиях в пределах короткого промежутка времени. Внутривлабораторную воспроизводимость методики определяли на трех образцах в трехкратной повторности. Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трехкратной повторности в двух лабораториях. Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутривлабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%. Правильность методики устанавливали путем добавления в извлечение необходимого количества стандарта. Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 2,89%.

Заключение. Разработанная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в якорцах стелющихся траве является валидной. Не требует дорогостоящих реактивов, является точной, воспроизводимой и доступной, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья.

Ключевые слова: валидация, методика, якорцы стелющиеся, *Tribulus terrestris* L., трава, флавоноиды, спектрофотометрия.

Для цитирования: Абдулкарим Аффиф, Блинова О.Л., Гилева А.А., Белоногова В.Д., Турышев А.Ю. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве. Фармация, 2020; 69 (5): 18–23. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-05-03>

VALIDATION OF A PROCEDURE FOR QUANTIFYING THE AMOUNT OF FLAVONOIDS IN IN THE GROUND BURNUT (*TRIBULUS TERRESTRIS*) HERB

Abdulkarim Affouf, O.L. Blinova, A.A. Gileva, V.D. Belonogova, A.Yu. Turyshev
Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya St., Perm 614990, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Abdulkarim Affouf – postgraduate student of the department of the pharmacognosy with a course of botany, Perm State Pharmaceutical Academy (PSPHA). Tel.: +7 (965) 575-40-94. E-mail: aboud.bashar89@gmail.com

Blinova Olga Leonidovna – associate professor of the department of the pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, PhD of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (952) 328-76-22. E-mail: oblinova@mail.ru

Gileva Angelina Alexandrovna – associate professor of the department of the pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, PhD of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (964) 185-60-96. E-mail: angelinaustinova@mail.ru

Belonogova Valentina Dmitrievna – Head of the department of pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (919) 715-93-17. E-mail: belonogova@pfa.ru

Turyshchikov Alexey Yurevich – Rector of PSPhA, associate professor of the department of the pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, PhD of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (342) 233-55-01. E-mail: perm@pfa.ru

SUMMARY

Introduction. To standardize the raw materials of ground burnut (*Tribulus terrestris*) herb, the authors have developed a procedure to measure the amount of flavonoids calculated with reference to rutin. To ensure that this procedure guarantees reliable and accurate test results, a technique is provided to validate the developed procedure.

Objective: to validate a procedure for quantitative determination of the amount of flavonoids calculated with reference to rutin in the ground burnut herb, by using differential spectrophotometry.

Material and methods. The procedure was validated on a combined sample of ground burnut herb. The validation parameters were determined using SF-2000 and SHIMADZU UV-1800 spectrophotometers.

Results. The investigators established validation characteristics, such as linearity, precision (repeatability, reproducibility), and accuracy. Linearity was determined at five concentration levels. The correlation coefficient was 0.995, which indicates a linear relationship between the optical density and the total flavonoid content in extracts. The repeatability of the procedure was determined with tenfold replication under identical conditions within a short time interval. The intralaboratory reproducibility of the procedure was determined using three samples in triplicate. Its interlaboratory reproducibility was carried out on three samples in triplicate in two laboratories. The determination results confirmed the precision of the procedure under intralaboratory and interlaboratory reproducibility conditions, since the relative standard deviation did not exceed 15%. The accuracy of the procedure was established by adding the required amount of the standard to the extract. The results showed that the error in analysis was within the error in one determination and did not exceed 2.89%.

Conclusion. The developed procedure is valid for the spectrophotometric determination of the sum of flavonoids calculated with reference to rutin in the ground burnut herb. The procedure requires no expensive reagents, is accurate, reproducible, and affordable, which allows it to be used for a reliable assessment of the quality of raw materials.

Key words: validation, procedure, ground burnut, *Tribulus terrestris* L., herb, flavonoids, spectrophotometry.

For reference: Abdulkarim Affouf, Blinova O.L., Gileva A.A., Belonogova V.D., Turyshchikov A.Yu. Validation of a procedure for quantifying the amount of flavonoids in in the ground burnut (*Tribulus terrestris*) herb. Farmatsiya, 2020; 69 (5): 18–23. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-05-03>

Введение

Род якорцы – *Tribulus* L. семейства парнолистниковых – *Zygophyllaceae* включает до 20 видов растений, широко используемых в традиционной и научной медицине 25 стран Азии, Африки, Южной Европы и Америки. В Российской Федерации в научной медицине применяется только один вид – якорцы стелющиеся (*Tribulus terrestris* L.), сырьем которого является трава [1] как субстанция для получения противовосклеротического препарата. Вместе с тем трава якорцев стелющихся обладает широким спектром фармакологического действия: гиполипидемическим, противовоспалительным, антибактериальным, противогрибковым, общетонизирующим, мочегонным, обезболивающим действием, стимулирует секрецию желудочного сока и усиливают перистальтику кишечника. В народной медицине используется при заболеваниях сердечно-сосудистой, пищеварительной и эндокринной систем, а также для стимуляции функции половых желез, лечения андрологических заболеваний мочеполовых органов, способствует естественному производству тестостерона [2–4].

В настоящее время стандартизацию травы якорцев стелющихся проводят по содержанию фураностаноловых гликозидов [1]. По литературным данным в траве якорцев стелющихся содержатся не только стероидные сапонины [5–7], но и флавоноиды [6, 8–11], по содержанию которых можно достоверно и объективно оценить качество сырья. Ранее нами была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Для того чтобы данная методика заняла достойное место в системе обеспечения качества, гарантировала достоверные и точные результаты анализа предусмотрена процедура валидации разработанной методики [12].

Цель настоящего исследования – валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в якорцах стелющихся траве с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

Материал и методы

Валидацию разработанной методики проводили на объединенном образце якорцев стелю-

щихся травы, полученном путем смешивания в равных количествах образцов, собранных в течение 2016–2018 гг. в РФ – ботанический сад ВИЛАР (Москва) и Крым, в республике Молдова и в Сирии.

Валидационные параметры определяли с помощью дифференциальной спектрофотометрии на спектрофотометрах СФ – 2000 и SHIMADZU UV – 1800.

Результаты и обсуждение

Валидируемая методика: аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл 80% этилового спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр Filtrak в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. После охлаждения фильтр промывают 80% этиловым спиртом, доводят объем извлечения до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, 1 каплю 5% уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (раствор

Б). Через 15 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю 5% уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – стандарт на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность (раствор Б) испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность (раствор Б) СО рутин; а – навеска сырья в граммах; а₀ – навеска СО рутин в граммах; Р – содержание основного вещества в СО рутин в %; W – потеря в массе при высушивании (%).

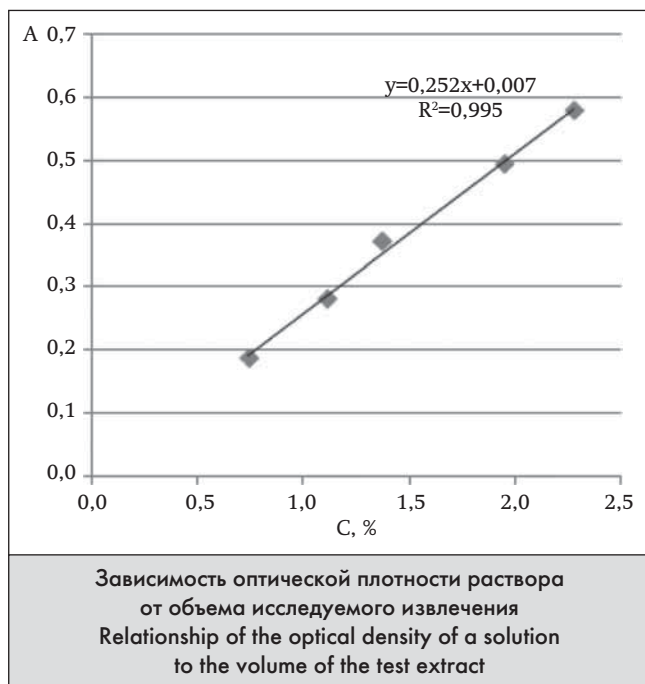
Приготовление СО рутин: около 0,05 г (точная навеска) СО рутин, предварительно высу-

Таблица 1

Определение повторяемости методики определения флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 1

Determination of the repeatability of the procedure for determination of flavonoids in the ground burnut herb



| Повторность | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % |
|---|--|
| 1 | 1,54 |
| 2 | 1,56 |
| 3 | 1,52 |
| 4 | 1,47 |
| 5 | 1,59 |
| 6 | 1,72 |
| 7 | 1,58 |
| 8 | 1,58 |
| 9 | 1,65 |
| 10 | 1,58 |
| Среднее значение | 1,58 |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,069 |

Таблица 2

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики определения флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 2

Determination of intralaboratory reproducibility of the procedure for determination of flavonoids in the ground burnut herb

| Повторность | Аналитик | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % | | |
|---|----------|--|----------------------------|-----------------------------------|
| | | Молдова, окрестности, Кишинев | Сирия, окрестности, Дамаск | РФ, Москва Ботанический сад ВИЛАР |
| 1 | 1 | 1,18 | 1,12 | 1,90 |
| 2 | 1 | 1,10 | 1,15 | 1,52 |
| 3 | 1 | 0,95 | 1,19 | 1,75 |
| 4 | 2 | 1,17 | 1,23 | 1,62 |
| 5 | 2 | 0,94 | 1,19 | 1,32 |
| 6 | 2 | 1,18 | 1,12 | 1,69 |
| Среднее значение | | 1,09 | 1,17 | 1,64 |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | | 0,113 | 0,044 | 0,194 |

шенного при температуре 130–135°C в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96% этилового спирта, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А) СО рутина. 2 мл раствора А СО рутина, 1 капля 5% уксусной кислоты, 5 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, помещают в мерную колбу, вместимостью 25 мл и доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор Б) СО рутина.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в используемых образцах сырья составляло 1,370±0,051%.

При проведении валидационных исследований устанавливали следующие характеристики разработанной методики: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность.

Линейность определяли на пяти уровнях концентрации. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме:

- 1 уровень: аликвота раствора А 1 мл – объем раствора Б 2,5 мл (50%);
- 2 уровень: аликвота раствора А 1,5 мл – объем раствора Б 3,75 мл (75%);
- 3 уровень: аликвота раствора А 2,0 мл – объем раствора Б 5,0 мл (100%);
- 4 уровень: аликвота раствора А 2,5 мл – объем раствора Б 6,25 мл (125%);
- 5 уровень: аликвота раствора А 3,0 мл – объем раствора Б 7,5 мл (150%).

Критерий приемлемости – коэффициент корреляции составил 0,995 (см. рисунок). На основании полученных данных можно утверждать, что соблю-

Таблица 3

Определение межлабораторной воспроизводимости методики определения флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 3

Determination of interlaboratory reproducibility of the procedure for determination of flavonoids in the ground burnut herb

| № | Место сбора | Повторность | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % | |
|---|------------------------------------|--|--|-----------------------------------|
| | | | СФ-2000, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники | UV-1800 SHIMADZU, РИЦ «Фарматест» |
| 1 | Молдова, окрестности Кишинева | 1 | 1,36 | 1,41 |
| | | 2 | 1,36 | 1,37 |
| | | 3 | 1,35 | 1,40 |
| | | Среднее значение | 1,36 | 1,39 |
| | | Относительное стандартное отклонение (RSD) при $f = 2\%$ | 0,006 | 0,021 |
| 2 | Сирия, окрестности Дамаска | 1 | 1,18 | 1,29 |
| | | 2 | 1,29 | 1,25 |
| | | 3 | 1,23 | 1,23 |
| | | Среднее значение | 1,23 | 1,26 |
| | | Относительное стандартное отклонение (RSD) при $f = 2, \%$ | 0,055 | 0,031 |
| 3 | РФ, Москва, Ботанический сад ВИЛАР | 1 | 1,65 | 1,72 |
| | | 2 | 1,67 | 1,75 |
| | | 3 | 1,68 | 1,82 |
| | | Среднее значение | 1,67 | 1,76 |
| | | Относительное стандартное отклонение (RSD) при $f = 2, \%$ | 0,015 | 0,051 |

дается линейная зависимость между величинами оптической плотности и содержанием суммы флавоноидов в извлечениях из якорцев стелющихся травы в интервале концентраций 50–150% от номинального значения определяемой величины.

Повторяемость методики устанавливали в десятикратной повторяемости, в одной лаборатории в идентичных условиях, с использованием одного и того же оборудования, одним и тем же исследователем, в пределах короткого промежутка времени. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения RSD, которое не должно превышать 10% (табл. 1).

Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли два провизора – аналитика кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА. Исследования проводили на трех образцах в трехкратной повторяемости на спектрофотометре СФ–2000 (табл. 2).

Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трехкрат-

ной повторяемости в двух лабораториях (на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА на спектрофотометре СФ – 2000 и в лаборатории РИЦ «Фарматест» на спектрофотометре SHIMADZU UV – 1800). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15% (табл. 3).

Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору непосредственно в извлечение из якорцев стелющихся травы (табл. 4). Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 2,89% (табл. 5).

Таблица 4

Определение правильности методики определения флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 4

Determination of accuracy of the procedure for determination of flavonoids in the ground burnut herb

| № | Место сбора | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье, мг | Добавлено СО рутин, мг | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, мг | | Ошибка, % |
|---|-----------------------------------|---|------------------------|---|------------|-----------|
| | | | | Ожидаемое | Полученное | |
| 1 | Молдова, окрестности Кишинева | 10,8 | 0,05 | 10,85 | 10,90 | 0,46 |
| | | 10,8 | 0,1 | 10,90 | 11,10 | 1,83 |
| | | 10,8 | 0,15 | 10,95 | 11,13 | 1,64 |
| 2 | Сирия, окрестности Дамаска | 11,5 | 0,05 | 11,55 | 11,70 | 1,30 |
| | | 11,5 | 0,1 | 11,60 | 11,78 | 1,55 |
| | | 11,5 | 0,15 | 11,65 | 11,95 | 2,57 |
| 3 | РФ, Москва Ботанический сад ВИЛАР | 17,6 | 0,05 | 17,65 | 17,67 | 0,11 |
| | | 17,6 | 0,1 | 17,70 | 18,03 | 1,86 |
| | | 17,6 | 0,15 | 17,75 | 17,95 | 1,13 |

Таблица 5

Метрологическая характеристика методики определения флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 5

Metrological characteristics of the procedure for determination of flavonoids in the ground burnut herb

| n | f | \bar{x} | S ² | S | P, % | t (p, f) | $\Delta\bar{x}$ | ϵ | $\delta, \%$ |
|---|---|-----------|----------------|--------|------|----------|-----------------|------------|--------------|
| 5 | 4 | 2,086 | 0,0596 | 0,2441 | 95 | 2,78 | 0,03 | 0,77 | 2,89 |

Заключение

Разработанная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в якорцах стелющихся траве является валидной. Методика не требует дорогостоящих реактивов, является точной, воспроизводимой и доступной, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Временная фармакопейная статья 42-827-79. *Herba Tribuli terrestris* – Трава якорцев стелющихся.
2. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. М.: Медицина, 1984; 464.
3. Хорлякова О.В., Дремова Н.Б. Современные фитопрепараты для нормализации/регуляции нарушения липидного обмена на фармацевтическом рынке России. «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития». Сборник научных трудов. Казань, 2016; 295–9.
4. Firas A. Al-Bayati, Hassan F. Al-Mola. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2008; 9 (2): 154–9.
5. Искендеров Г.Б., Гусейнгулиева К.Ф. Изучение стероидных гликозидов якорцев стелющихся, произрастающих в Азербайджане. Химия растительного сырья. 2016; 2: 47–52.
6. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства *Fabaceae–Apiaceae* (отв. ред. А.Л. Буданцев). СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010; 102–5.
7. Shishovska M., Arsova-Sarafinovska Z., Memeti Sh. A Simple Method for Determination of Protodioscin in *Tribulus terrestris* L. and Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography Using Diode-Array Detection. J. of Chemical Engineering Research Updates. 2015; 2: 12–21.
8. Худенко П.Е. и др. Флавоноиды в траве якорцев стелющихся. Фармация и фармакология. 2015; 2 (9): 18–23.
9. Худенко П.Е., Терешина Н.С., Морохина С.Л. Химический состав и использование в медицине якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.). III научно-практическая конференция «Молодые ученые и фармация XXI века». Сборник трудов. 2015; 416–20.
10. Худенко П.Е., Терешина Н.С., Морохина С.Л. Определение флавоноидов в траве якорцев стелющихся методом ВЭЖХ. Фармация, 2016; 65 (5): 19–22.
11. Ashwani Kumar. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in North Indian popula-

tion of *Tribulus terrestris* L. by HPLC. International J. of Pharma and Bio Sciences. 2012; 3 (4): 69–79.

12. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. [Электронное издание]. Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=zz

References

1. Temporary pharmacopoeial article 42-827-79. *Herba Tribuli terrestris* – Grass of the *Tribulus terrestris*. (in Russian)
2. Sokolov S.Ya., Zamotaev I.P. Handbook of Medicinal Plants. M.: Meditsina, 1984; 464 (in Russian)
3. Horlyakova, O.V., Dremova N.B. Modern phytopreparations for the normalization/regulation of lipid metabolism disorders in the Russian pharmaceutical market. «Pharmaceutical education, science and practice: horizons of development». Sbornik nauchnikh trudov. Kazan, 2016; 295–9 (in Russian)
4. Firas A. Al-Bayati, Hassan F. Al-Mola. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2008; 9 (2): 154–9.
5. Iskenderov G. B., Huseynquliyev K.F. Study of steroid glycosides of anchorlets creeping, growing in Azerbaijan. Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2016; 2: 47–52 (in Russian)
6. Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. T. 3. Families *Fabaceae – Apiaceae* (by ed. A.L. Budanets). SPb. M.: Tovarishestvo nauchnikh izdaniy KMK, 2010; 102–5 (in Russian)
7. Shishovska M., Arsova-Sarafinovska Z., Memeti Sh. A Simple Method for Determination of Protodioscin in *Tribulus terrestris* L. and Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography Using Diode-Array Detection. J. of Chemical Engineering Research Updates. 2015; 2: 12–21.
8. Hudenko P.E. et al. Flavonoids in the grass of *Tribulus terrestris*. Farmatsiya i farmakologiya. 2015; 2 (9): 18–23 (in Russian)
9. Hudenko P.E., Tereshina N.S., Morokhina S.L. The chemical composition and use in medicine of *Tribulus terrestris* L. III nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Young scientists and pharmacy of the XXI century». Sbornik trudov. 2015; 416–20 (in Russian).
10. Hudenko P.E., Tereshina N.S., Morokhina S.L. Determination of flavonoids in the grass of the *Tribulus terrestris* by HPLC. Farmatsiya. 2016; 65 (5): 19–22 (in Russian)
11. Ashwani Kumar. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in North Indian population of *Tribulus terrestris* L. by HPLC. International J. of Pharma and Bio Sciences. 2012; 3 (4): 69–79.
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. OFS.1.1.0012.15. Validation of analytical methods. [Electronic edition]. Access mode: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=zz (in Russian)

Поступила 09 ноября 2018г.

Received 09 November 2018

Принята к публикации 13 июля 2020г.

Accepted 13 July 2020