

УДК 615.015.11.07.322:582.918:577.127.4

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИСТЬЕВ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ»

Г.М. ЛАТЫПОВА¹
В.Н. БУБЕНЧИКОВА²
З.Р. РОМАНОВА¹
Д.Ф. ГАЛИМОВА¹

¹ Башкирский государственный
медицинский университет

² Курский государственный
медицинский университет

e-mail: primula17@rambler.ru

Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета весеннего, основанная на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом.

Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости, специфичности, линейности.

Ключевые слова: листья первоцвета весеннего, методика количественного определения аскорбиновой кислоты.

Листья первоцвета весеннего (лекарственного) (*Primula veris* L., или *P. officinalis* (L.) Hill.), семейства первоцветных (Primulaceae) разрешены к применению в качестве поливитаминного пищевого растительного сырья [4]. Существующая отечественная нормативная документация (НД) на листья первоцвета весеннего (ГОСТ 3166-76) оценивает качество сырья по содержанию аскорбиновой кислоты и числовых показателей: влажности, массовой доли общей золы, массовой доли других частей растения и посторонних примесей [2]. ГОСТ 3166-76 предусматривает количественное определение аскорбиновой кислоты титриметрическим методом с использованием 0,001 н раствора 2,6-дихлофенолиндофенолята натрия в кислой среде. Данная методика затрудняет определение аскорбиновой кислоты в связи со сложностью фиксирования точки перехода окраски титранта из-за собственного окрашивания водного извлечения из сырья. Поэтому для количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета весеннего нами разработана спектрофотометрическая методика, основанная на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом, который показал близкие результаты определения в сравнении с титриметрическим методом [3, 5, 6].

Экспериментальная часть. Для разработки методики использовали листья первоцвета весеннего, заготовленные в Курской, Белгородской областях России и в некоторых районах республики Башкортостан.

Определение оптимальных условий экстракции кислоты аскорбиновой из листьев первоцвета проводили на одном образце сырья.

При разработке методики изучены и определены оптимальные условия экстракции аскорбиновой кислоты из листьев первоцвета: степень измельчения сырья – 1 мм, экстрагент – 40% спирт этиловый, нагревание на кипящей водяной бане – 30 мин., соотношение сырье-экстрагент – 1:100. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышала 4,48 %.

Методика количественного определения кислоты аскорбиновой. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 40% раствора спирта этилового, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на водяной бане в течение 30 мин. Экстракцию 40% спиртом этиловым повторяли еще два раза по 50 мл в течение 30 мин каждый раз. Полученные извлечения объединяли, фильтровали через бумажный фильтр (раствор А). В колбу вместимостью 50 мл помещали 20 мл



раствора А, прибавляли 20 мл 96% спирта этилового, перемешивали и через 10 мин фильтровали через бумажный фильтр (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мл раствора Б и доводили объем раствора до метки, перемешивали (раствор В).

В три колбы вместимостью по 50 мл помещали: в первую 10 мл раствора В, во вторую 10 мл раствора рабочего стандартного образца (РСО) кислоты аскорбиновой и в третью 10 мл воды. В каждую колбу прибавляли по 10 мл раствора натрия фосфорномолибдата, нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 мин и быстро охлаждали под струей холодной воды. Оптическую плотность испытуемого раствора (колба 1) и раствора РСО кислоты аскорбиновой (колба 2) измеряли на спектрофотометре при длине волны 730 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор из третьей колбы.

Содержание кислоты аскорбиновой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 150 \cdot 40 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 20 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца (РСО) кислоты аскорбиновой; m – масса сырья в граммах; m₀ – масса РСО кислоты аскорбиновой в граммах; W – влажность сырья в процентах.

Приготовление раствора РСО кислоты аскорбиновой. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали около 0,05 г (точная навеска) кислоты аскорбиновой (ФС 42-2668-95), высушенной до постоянной массы при температуре от 100° до 105° С, растворяли в 30 мл воды, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 1). Срок годности раствора 1–3 суток.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5 мл раствора 1, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 2). Раствор использовали свежеприготовленным.

Приготовление раствора натрия фосфорномолибдата. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещали 0,05 г натрия фосфата двузамещенного (ГОСТ 4172-76), растворяли в 100 мл воды, прибавляли 10 мл кислоты серной концентрированной, 50 мл воды и 0,8 г аммония молибдата. Объем раствора доводили водой до метки и тщательно перемешивали. Срок годности раствора – 3 месяца.

Таблица 1

Результаты анализа модельных смесей с РСО кислоты аскорбиновой

| № | Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси (кислота аскорбиновая), мг | Экспериментально найденное значение (кислота аскорбиновая) | |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------|
| | | абсолютная величина, мг | процент восстановления, % |
| 1 | 9,00 | 9,08 | 100,89 |
| 2 | 9,00 | 9,16 | 101,78 |
| 3 | 9,00 | 8,94 | 99,33 |
| 4 | 12,00 | 11,8 | 98,33 |
| 5 | 12,00 | 11,89 | 99,08 |
| 6 | 12,00 | 11,91 | 99,25 |
| 7 | 15,00 | 14,86 | 99,07 |
| 8 | 15,00 | 15,07 | 100,47 |
| 9 | 15,00 | 14,81 | 98,73 |
| Средний процент восстановления для 3 концентраций в трех повторностях | | | 99,66 |



Валидацию методики проводили методом математической статистики по показателям: правильность, прецизионность, специфичность [1].

Правильность методики устанавливали на модельных смесях с РСО кислоты аскорбиновой. Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием кислоты аскорбиновой в % к исходной концентрации 75, 100, 125. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации (табл. 1).

Полученный средний процент восстановления для трех концентраций в трех повторностях составил 99,66, что соответствует критериям приемлемости (100±2%).

Таблица 2

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

| Содержание кислоты аскорбиновой в аликвоте, мкг | Добавлено РСО кислоты аскорбиновой, мкг | Ожидаемое содержание, мкг | Полученное содержание, мкг | Ошибка, % | |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------|---------|
| | | | | абс., мкг | отн., % |
| 421,47 | 50 | 471,47 | 475,12 | + 3,65 | 0,77 |
| 421,47 | 50 | 471,47 | 473,90 | + 2,43 | 0,52 |
| 421,47 | 50 | 471,47 | 466,87 | -4,60 | 0,98 |
| 421,47 | 100 | 521,47 | 518,67 | +2,80 | 0,54 |
| 421,47 | 100 | 521,47 | 529,19 | +7,72 | 1,48 |
| 421,47 | 100 | 521,47 | 530,56 | +9,09 | 1,74 |
| 421,47 | 150 | 571,47 | 563,18 | -8,29 | 1,45 |
| 421,47 | 150 | 571,47 | 582,19 | +10,72 | 1,88 |
| 421,47 | 150 | 571,47 | 560,89 | -10,58 | 1,85 |

Достоверность методики определения подтверждена опытами с добавками РСО кислоты аскорбиновой. Испытание проводилось на одном образце листьев первоцвета весеннего в 3 концентрациях с добавками РСО кислоты аскорбиновой в трех повторностях (табл. 2).

Таблица 3

Результаты количественного определения кислоты аскорбиновой в разные дни

| Образец № | Содержание кислоты аскорбиновой, % | Стандартное отклонение S | Относительное стандартное отклонение RSD, % |
|-----------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|
| 1-й день | | | |
| 1 | 2,54 | | |
| 2 | 2,58 | | |
| 3 | 2,47 | | |
| 4 | 2,49 | | |
| 5 | 2,55 | | |
| 6 | 2,59 | | |
| среднее | 2,54 | 0,04806 | 1,89 |
| 2-й день | | | |
| 1 | 2,57 | | |
| 2 | 2,63 | | |
| 3 | 2,61 | | |
| 4 | 2,55 | | |
| 5 | 2,52 | | |
| 6 | 2,65 | | |
| среднее | 2,59 | 0,04494 | 1,74 |



Относительная ошибка опытов с добавками находилась в пределах случайной ошибки предложенных методик, что свидетельствует об отсутствии ошибки систематической.

Испытания прецизионности (сходимости) проводились в разные дни одним и тем же специалистом на одном образце сырья листьев первоцвета весеннего в шести повторностях с использованием спектрофотометра «СФ-46» (табл. 3).

Относительное стандартное отклонение RSD не превысило 2 %.

Воспроизводимость методики количественного определения проводилась на одном образце листьев первоцвета весеннего в двух лабораториях на приборах «СФ-46» и «СФ-26» в шести повторностях (табл. 4).

Таблица 4

**Результаты количественного определения
кислоты аскорбиновой в разных лабораториях**

| Истинное значение определяемой величины | | | |
|-----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|
| образец № | содержание кислоты аскорбиновой, % | стандартное отклонение S | относительное стандартное отклонение RSD, % |
| Лаборатория № 1 | | | |
| 1 | 2,61 | | |
| 2 | 2,65 | | |
| 3 | 2,58 | | |
| 4 | 2,59 | | |
| 5 | 2,64 | | |
| 6 | 2,71 | | |
| среднее | 2,63 | 0,04775 | 1,82 |
| Лаборатория № 2 | | | |
| 1 | 2,72 | | |
| 2 | 2,69 | | |
| 3 | 2,76 | | |
| 4 | 2,70 | | |
| 5 | 2,67 | | |
| 6 | 2,79 | | |
| среднее | 2,72 | 0,04538 | 1,67 |

Относительное стандартное отклонение RSD не превысило 3 %.

Специфичность определялась визуально – отсутствие отклика при отсутствии анализируемого вещества. При прибавлении дистиллированной воды (вместо раствора кислоты аскорбиновой) к раствору натрия фосфорномолибдата и нагревании на кипящей водяной бане в течение 10 мин синего окрашивания не наблюдалось.

Линейность методики исследовали в диапазоне концентраций РСО кислоты аскорбиновой от 80 до 120% от теоретического содержания кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего (табл. 5, рис.).

Установлено, что требования к параметрам линейной зависимости выполняются, т.е. линейность методики определяется в диапазоне концентраций от 80 до 120% от теоретического содержания кислоты аскорбиновой. Коэффициент корреляции составляет 0,99889.

Таблица 5

Результаты определения линейности валидируемой методики

| Оптическая плотность, D | Концентрация кислоты аскорбиновой, мкг/мл | Коэффициент корреляции | y = b·x + a | |
|-------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------|--------|
| | | | b | a |
| 0,289 | 2,4 | 0,99889 | 0,107 | 0,0292 |
| 0,318 | 2,7 | | | |
| 0,356 | 3,0 | | | |
| 0,395 | 3,3 | | | |
| 0,429 | 3,6 | | | |

D

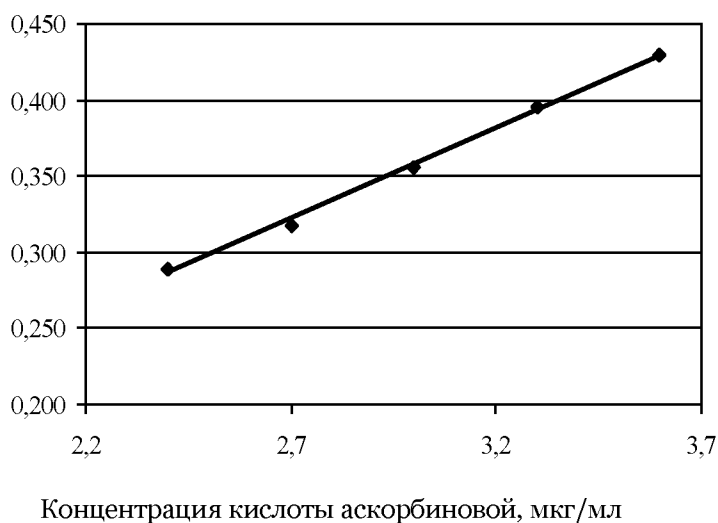


Рис. Линейная зависимость оптической плотности раствора от концентрации кислоты аскорбиновой (D – оптическая плотность)

С помощью данной методики было проанализировано 5 партий сырья по 5 образцов в каждой (табл. 6).

Таблица 6

Метрологическая характеристика метода количественного определения кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего

| № п/п | n | x ср. | S ² | S | P, % | t (P,f) | Δx | E отн., % |
|-------|---|-------|----------------|--------|------|---------|-------|-----------|
| 1 | 5 | 2,12 | 0,00115 | 0,034 | 95 | 2,78 | 0,095 | 4,48 |
| 2 | 5 | 3,64 | 0,0005 | 0,022 | 95 | 2,78 | 0,061 | 1,67 |
| 3 | 5 | 2,54 | 0,00093 | 0,0305 | 95 | 2,78 | 0,084 | 3,36 |
| 4 | 5 | 2,03 | 0,00088 | 0,0296 | 95 | 2,78 | 0,082 | 4,04 |
| 5 | 5 | 2,09 | 0,00102 | 0,0319 | 95 | 2,78 | 0,089 | 4,26 |



Данные количественного определения показали, что в листьях первоцвета весеннего содержание аскорбиновой кислоты колеблется от 1,80 до 3,65%.

Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 4,48%.

В результате проведенных исследований стабильности листьев первоцвета весеннего при хранении (в течение 3 лет) рекомендуем установить норму содержания аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета не менее 0,5% [5].

Полученные результаты включены в проект ФС «Первоцвета листья».

Выводы.

1. Разработана методика количественного определения кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего.

2. Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости, специфичности, линейности.

Литература

1. Аладышева, Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляева, В.В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9-14.

2. ГОСТ 3166-76. Листья первоцвета весеннего. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт. – Взамен ГОСТ 3166-46; Введ. 01.07.1977. – М., 1977. – С. 51-53.

3. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Раеoniaceae – Thimelaeaceae / отв. ред. П.Д. Соколов. – Л.: Наука, 1986. – С. 175-176.

5. Романова, З.Р. Фармакогностическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного: дис. ... канд. фарм. наук / З.Р. Романова. – Курск, 2010. – 138 с.

6. ТУ 9161-037-46865780-03. БАД таблетки «Виратон», рег. уд. 77.99.02.916.Б.000641.0803.

STANDARTIZATION OF PRIMULA OFFICINALIS LEAVES ACCORDING TO THE INDICATOR «ASCORBIC ACID CONTENT»

G.M. LATYPOVA¹

V.N. BUBENCHIKOVA²

Z.R. ROMANOVA¹

D.F. GALIMOVA¹

¹ *Bashkir State Medical University, Ufa*

² *Kursk State Medical University*

e-mail: primula17@rambler.ru

Spectrophotometric technique for quantitative determination of ascorbic acid in the leaves of *Primula officinalis* based on the colour reaction of ascorbic acid with phosphoro-molybdenum complex has been developed. Validation of the technique according to such indications as correctness, similarity, reproducibility linearity, specificity has been performed.

Key words: leaves of *Primula officinalis*, the technique for quantitative determination of ascorbic acid.