



РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ТРАВЕ *GALINSOGA PARVIFLORA*

В.Н.БУБЕНЧИКОВА¹⁾
С.А.БОЕВА²⁾

¹⁾ Курский государственный
медицинский университет

²⁾ Воронежская государственная
медицинская академия
им. Н.Н.Бурденко

e-mail:fg.ksmu@mail.ru

В статье изложены данные по разработке методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве галинзоги мелкоцветковой (*Galinsoga parviflora*) семейства сложноцветные (Compositae), которая в народной медицине применяется как ранозаживляющее, гемостатическое, гипотензивное средство. Снят электронный спектр водно-спиртового извлечения из травы галинзоги мелкоцветковой. Установлены оптимальные параметры проведения экстракции для количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в изучаемом растительном сырье: дисперсность сырья, природа экстрагента, время экстракции. Проведена валидация разработанной методики по следующим характеристикам: линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность.

Ключевые слова: *Galinsoga parviflora*, сложноцветные, гидроксикоричные кислоты, хлорогеновая кислота, экстракция, валидация

Введение.

В настоящее время в медицинской практике активно применяются фармацевтические препараты, полученные из лекарственного растительного сырья. Это связано с рядом преимуществ лекарственных средств природного происхождения перед синтетическими, в частности, с широким спектром терапевтического действия и низкой токсичностью [1]. Помимо дополнительного изучения фармакопейных растений и их разновидностей, стремительно возрастает интерес к растительному сырью, ранее используемому лишь в народной медицине. Объектом нашего исследования была выбрана трава галинзоги мелкоцветковой (*Galinsoga parviflora*) семейства сложноцветные (Compositae), которая в народной медицине применяется как ранозаживляющее, гемостатическое, гипотензивное средство.

Ранее в наших исследованиях [2] методом ВЭЖХ в траве галинзоги мелкоцветковой (*Galinsoga parviflora*), были идентифицированы гидроксикоричные кислоты, в числе которых, кислота хлорогеновая. Гидроксикоричные кислоты обладают сильными антиоксидантными, антивирусными, антибактериальными и антигрибковыми свойствами, проявляет гипогликемическое, гипохолестеринемическое, противораковое и гепатопротекторное действие. Установлены ее пребиотические свойства [3].

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения гидроксикоричных кислот в траве галинзоги и демонстрация ее пригодности для применения по назначению.

Объекты и методы.

Для разработки методики количественного определения гидроксикоричных кислот использовали воздушно-сухое сырье – траву галинзоги мелкоцветковой, собранную на территории Воронежской области в период массового цветения растения. В основе метода количественного определения гидроксикоричных кислот положен метод прямой спектрофотометрии [4].

Полученные данные обрабатывали статистически посредством электронных таблиц «Microsoft Excel»: вычисляли средние арифметические, стандартное отклонение. Валидацию проводили по линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности методики [5-7].

Результаты и их обсуждение.

На первом этапе исследования по описанной методике был снят электронный спектр поглощения водно-спиртового извлечения из травы галинзоги мелкоцветковой в диапазоне длин волн 250-350 нм (рис. 1).

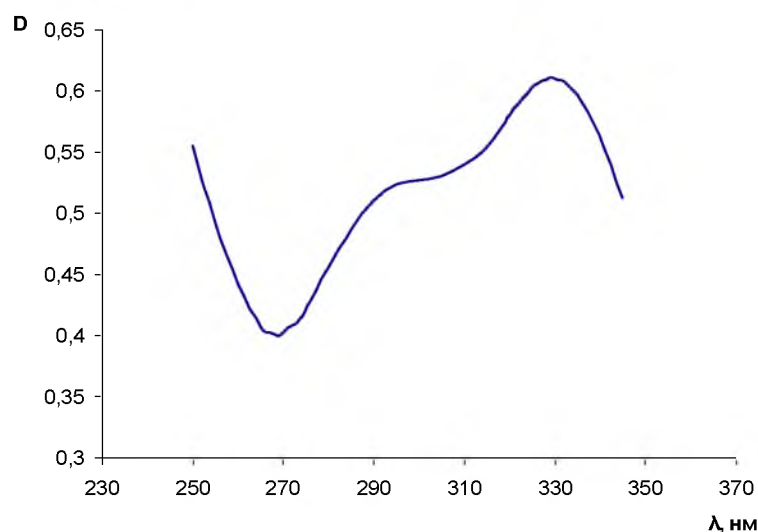


Рис. 1. Спектр 70% этанольного извлечения из травы галинзоги мелкоцветковой.

На рис. 1 отчетливо наблюдаются максимум поглощения при $\lambda = 330$ нм и «плечо» в области 290-310 нм, соответствующие сопряженным $-CH=CH-$ связям в ароматических циклах гидроксикоричных кислот. Далее, при разработке методики использовали значения оптических плотностей при длине волны 330 нм, что соответствует максимуму поглощения хлорогеновой кислоты, поэтому расчет содержания гидроксикоричных кислот проводили в пересчете на хлорогеновую кислоту. Использовали удельный показатель поглощения, значение которого для хлорогеновой кислоты 504,425.

На следующем этапе исследования определяли условия проведения экстракции. Для этого изучали влияние дисперсности сырья, природы экстрагента и времени экстрагирования на полноту извлечения суммы гидроксикоричных кислот.

Траву галинзоги мелкоцветковой измельчали, просеивали через сита, брали навески с размерами частиц менее 2 мм, 1 мм, 0,5 мм. Влажность сырья составила 13%.

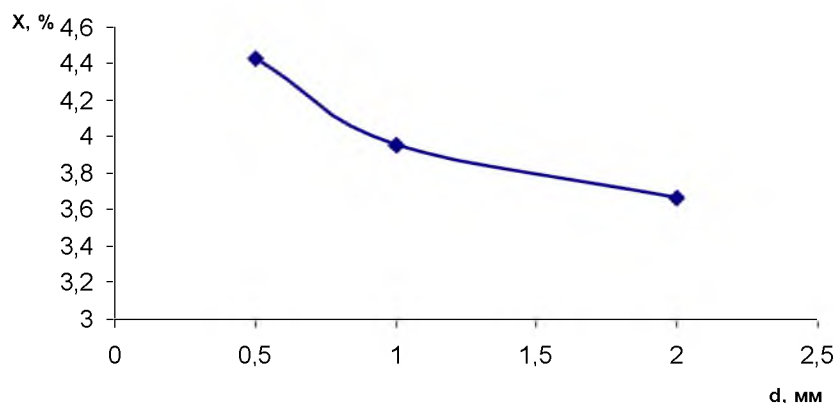


Рис. 2. Влияние степени измельчения сырья на полноту извлечения гидроксикоричных кислот

В результате можно отметить, что наибольшего выхода гидроксикоричных кислот из растения ($4,43 \pm 0,13\%$ в пересчете на хлорогеновую кислоту) можно добиться, используя сырье с диаметром частиц менее 0,5 мм, так как при большем измельчении сырья увеличивается поверхность соприкосновения фаз «растительный материал – экстрагент» (рис. 2).

Изучение влияния концентрации экстрагента (спирта этилового 30%, 50%; 70% и 96%) на полноту извлечения гидроксикоричных кислот показало, что у водно-спиртовых растворов с увеличением содержания спирта этилового экстрагирующая способность улучшается: выход гидроксикоричных кислот при экстракции 70% раствора спирта этилового составил $4,41 \pm 0,04\%$; использование спирта этилового 96% не обеспечило хорошего набухания сырья, уменьшило проникновение экстрагента внутрь клеток сырья и десорбцию извлекаемых ве-



ществ: содержание суммы гидроксикоричных кислот составило лишь $1,27 \pm 0,05\%$, поэтому применение спирта этилового 96% в качестве экстрагента нецелесообразно (рис. 3).

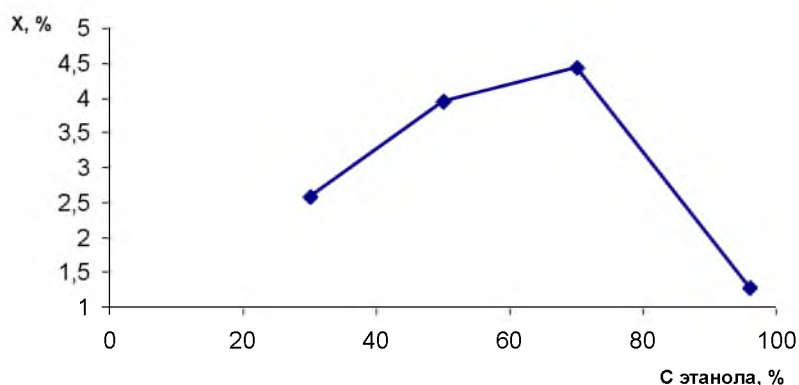


Рис. 3. Влияние природы экстрагента на полноту извлечения гидроксикоричных кислоты

Для установления оптимального времени экстракцию сырья проводили в течение 15, 30, 45, 60 минут до наступления равновесия.

Результат эксперимента показал, что динамическое равновесие в системе «сырье-экстрагент» наступает после 30 минут экстрагирования (выход гидроксикоричных кислот $4,43 \pm 0,13\%$) (рис. 4), и при дальнейшем нагревании общая картина выхода извлекаемых веществ не меняется. Так как гидроксикоричные кислоты имеют небольшую молекулярную массу, они быстрее диффундируют, чем высокомолекулярные вещества, следовательно, при дальнейшей экстракции в вытяжку будут экстрагироваться балластные вещества, что приведет к ухудшению качества экстракта.

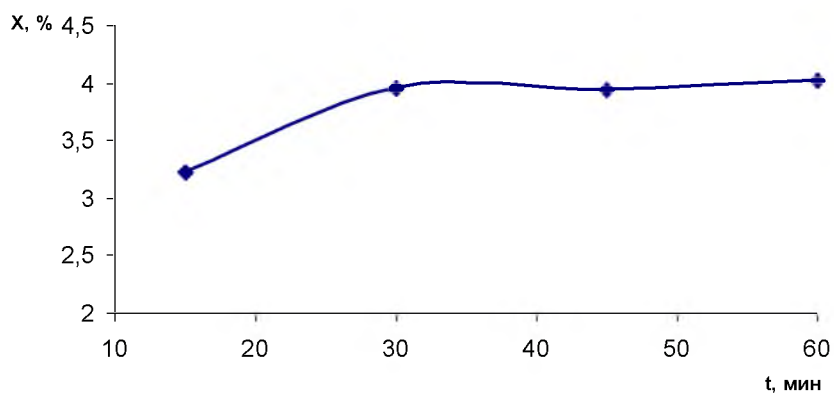


Рис. 4. Влияние времени экстракции на полноту извлечения гидроксикоричных кислоты

Таким образом, для определения количественного содержания суммы гидроксикоричных кислот в траве галинзоги мелкоцветковой были подобраны следующие условия: степень измельчения сырья с диаметром частиц не более 0,5 мм, экстрагент – 70% спирт этиловый, время экстракции – 30 минут.

Валидацию разработанной методики проводили по следующим показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность.

Для проверки линейности брали 6 экспериментальных точек: взвешивали отдельные навески, массой от 0,7 до 1,2 г (т.н.), и готовили из них извлечения соответствующих концентраций.

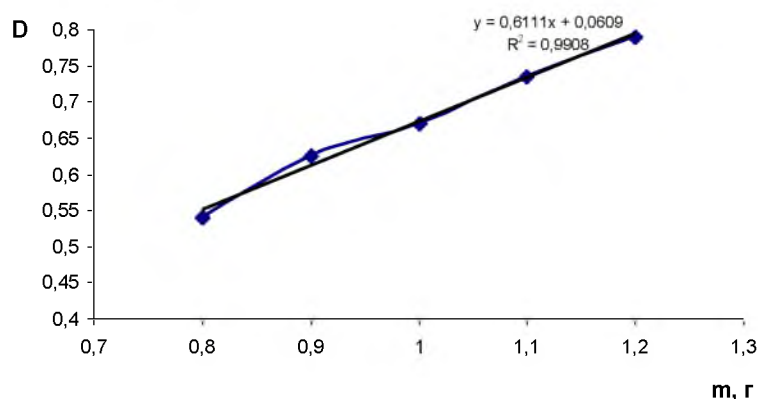


Рис. 5. Зависимость оптической плотности полученных извлечений от концентрации гидроксикоричных кислот

На рис. 5 представлена зависимость значения оптической плотности полученных извлечений от содержания хлорогеновой кислоты в навеске сырья. Коэффициент корреляции, который является главным критерием приемлемости линейности, составил 0,9908, что близко к единице. Значит, наши результаты можно описать прямой, т.е. в пределах диапазона «масса навески 0,7-1,2 г» оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации хлорогеновой кислоты в пробе.

При установлении повторяемости проводили 6 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (S) и относительного стандартного отклонения (S отн) (табл. 1). Относительное стандартное отклонение составило 8,55% (не более 10%), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Воспроизводимость определяли 2 аналитика на 3 образцах в 3 повторностях. Относительное стандартное отклонение составило 8,71% – для первого образца, 7,05% – для второго образца, 11,25% – для третьего образца, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях воспроизводимости (табл. 2-4).

Таблица 1

Определение повторяемости разработанной методики

	X	d _i	d _i ²	S ²	S	ΔX	Sотн
1	3,64	0,22	0,047669	0,01698	0,13031	0,33	8,55
2	3,81	0,05	0,002336				
3	3,9	-0,04	0,001736				
4	3,84	0,02	0,000336				
5	3,94	-0,08	0,006669				
6	4,02	-0,16	0,026136				
	3,858333		0,084883				

Таблица 2

Определение воспроизводимости разработанной методики (1 образец)

	X	d _i	d _i ²	S ²	S	ΔX	Sотн	
1	3,64	0,03	0,001111	0,01559	0,12486	0,32	8,71	1 аналитик
2	3,81	-0,14	0,018678					
3	3,84	-0,17	0,027778					
4	3,53	0,14	0,020544					
5	3,58	0,09	0,008711					2 аналитик
6	3,64	0,03	0,001111					
	3,673333		0,077933					



Таблица 3

Определение воспроизводимости разработанной методики (2 образец)

	X	d _i	d _i ²	S ²	S	ΔX	Soth	
1	3,63	0,06	0,0036	0,01056	0,10276	0,26	7,05	1 аналитик
2	3,52	0,17	0,0289					
3	3,72	-0,03	0,0009					
4	3,7	-0,01	0,0001					2 аналитик
5	3,76	-0,07	0,0049					
6	3,81	-0,12	0,0144					
	3,69		0,0528					

Таблица 4

Определение воспроизводимости разработанной методики (3 образец)

	X	d _i	d _i ²	S ²	S	ΔX	Soth	
1	2,15	0,07	0,005136	0,00946	0,09726	0,25	11,25	1 аналитик
2	2,13	0,09	0,008403					
3	2,19	0,03	0,001003					
4	2,4	-0,18	0,031803					2 аналитик
5	2,21	0,01	0,000136					
6	2,25	-0,03	0,000803					
	2,221667		0,047283					

Правильность оценивали путем добавления к исследуемому извлечению стандартного раствора кислоты хлорогеновой с использованием 9 определений на 3 концентрациях, охватывающих требуемый диапазон. Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, его средняя величина должна находиться в пределах 100±5%. В разработанной методике процент восстановления находится в пределах от 96,78 до 102,05% (табл. 5).

Таблица 5

Определение правильности методики (эксперимент с добавками)

№п/п	Содержание хлорогеновой кислоты, г	Добавлено РСО хлорогеновой кислоты, г	Ожидаемое содержание хлорогеновой кислоты, г	Полученное содержание хлорогеновой кислоты, г	Полученное содержание хлорогеновой кислоты, %
1	0,0447	0,0112	0,0559	0,0549	98,21
2	0,0447	0,0112	0,0559	0,0563	100,72
3	0,0447	0,0112	0,0559	0,0541	96,78
4	0,0447	0,0224	0,0671	0,0652	97,17
5	0,0447	0,0224	0,0671	0,0683	101,79
6	0,0447	0,0224	0,0671	0,0675	100,60
7	0,0447	0,0335	0,0782	0,0798	102,05
8	0,0447	0,0335	0,0782	0,0788	100,77
9	0,0447	0,0335	0,0782	0,0771	98,59
Среднее значение выхода 99,63%					

В результате проведенного исследования установили, что содержание суммы гидроксикоричных кислот в изучаемом растении колеблется от 1,98±0,09% до 6,90±0,25%. Предложенная методика пригодна для стандартизации травы растений рода галинзога по содержанию суммы гидроксикоричных кислот.



Выводы.

Разработана методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую в траве *Galinsoga parviflora*. Установлены оптимальные параметры экстракции: сырье с диаметром частиц не более 0,5 мм, экстрагент – 70% спирт этиловый, время экстракции – 30 минут. Разработанная методика валидирована по показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность.

Литература

1. Сафонова, И.А. Изучение фенольных соединений листьев пузыреплодника калинолистного (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim) методом ВЭЖХ / И.А. Сафонова, В.Я. Яцюк, А.В. Кузьмина // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2009. – №4. – С. 128-133.
2. Бубенчикова В.Н. Изучение состава фенольных соединений галинзоги мелкоцветковой методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова, С.А. Боева // Научно-практический журнал «Традиционная медицина». – 2012. – № 5. – С. 189-191.
3. Левицкий, А.П. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология / А.П. Левицкий, Е.К. Вертикова, И.А. Селиванская // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – №2. – С. 6-20.
4. Ларькина, М.С. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого / М.С. Ларькина // Химия растительного сырья. – 2008. – №3. – С. 71-74.
5. Гаврилин М.В., Сенченко С.П. Валидация аналитических методик: методические указания для аспирантов и студентов. – Пятигорск: ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава, 2009. – 40 с.
6. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1) // Фармация. – 2008. – №4. – С. 3-10.
7. Евдокимова О.В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы / О.В. Евдокимова // Фармация. – 2008. – №7. – С. 14-17.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS IN THE GRASS *GALINSOGA PARVIFLORA*

V.N. BUBENCHIKOVA ¹⁾
S.A. BOEVA ²⁾

¹⁾ *Kursk State Medical University*

²⁾ *Voronezh State Medical Academy of the N.N.Burdenko*

e-mail: fg.ksmu@mail.ru

The article presents the data on the development of methods of quantitative determination of the amount of hydroxycinnamyl acids in the grass *Galinsoga parviflora* family Asteraceae (Compositae), which is used in folk medicine as a healing, haemostatic, hypotensive means. Filmed electronic spectrum of water-alcohol extraction of herbs *Galinsoga parviflora*. Optimal parameters of extraction for the quantitative determination of the amount of hydroxycinnamyl acids in the studied plant raw material: the dispersion of raw materials, nature extractant, time of extraction. Held validation of methods developed by the following characteristics: linearity, repeatability, reproducibility, accuracy.

Key words: *Galinsoga parviflora*, Compositae, hydroxycinnamic acids, chlorogenic acid, extraction, validation.