



УДК: 581.542

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ТРАВЕ
ХОНДРИЛЛЫ СИТНИКОВИДНОЙ**

**ELABORATION AND VALIDATION OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF
THE SUM OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS
IN A HERB OF CHONDRILLA JUNCEA**

**В.Н. Бубенчикова¹, В.Н. Левченко²
V.N. Bubenchikova¹, V.N. Levchenko²**

¹Курский государственный медицинский университет
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3

²Центр обеспечения медицинской техникой и имуществом
Министерства обороны Российской Федерации
Московская область, г. Мытищи, ул. Щорса, 1а

¹Kursk State Medical University
305041, Kursk, Karl Marx str., 3

²Center provide medical equipment and property of the Ministry of Defense
of the Russian Federation,
Moscow region, Mytitschi, st. Shchors, 1a

e-mail: fg.ksmu@mail.ru

e-mail: Vitalya 167@rambler.ru

Ключевые слова. Ключевые слова: хондрилла ситниковидная, гидроксикоричные кислоты, спектрофотометрическое определение, валидация.

Key words: chondrilla juncea, hydroxycinnamic acids, spectrophotometric determination, validation.

Резюме. Разработана методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот, основанная на экстракции суммы кислот и их последующем спектрофотометрировании. Подобраны оптимальные условия экстракции: степень измельчения сырья – 1 мм, экстрагент – спирт этиловый 50%, время экстракции 45 минут, экстракции до наступления равновесия. Спектрофотометрическое определение вели при длине волны 328 нм, расчет содержания проводили в пересчете на хлорогеновую кислоту по ее удельному показателю поглощения. Содержание суммы гидроксикоричных кислот в траве хондриллы ситниковидной колеблется от 2.80% до 3.79%. Разработанная методика валидации по показателям линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности.

Summary. A quantitative determination method of a sum of hydroxycinnamic acids is worked out and based on extraction of acids and following spectrophotometry. The optimal conditions for extraction are: a grinding size is 1 mm, an extragent is ethyl alcohol 50%, an extraction time is 45 minutes, an extraction lasts before the equilibrium. A spectrophotometric determination is held under the wave-length equal 328 nm, a calculation of a content was based on the specific absorption of chlorogenic acid. A content of a sum of hydroxycinnamic acids in a herb of Chondrilla juncea vibrates from 2.80% to 3.79%. A developed method of validation in terms of linearity, repeatability, reproducibility and accuracy.

Введение

В литературе имеются данные о том, что хондрилла ситниковидная проявляет антиоксидантную активность, она ингибирует активность ксантинооксидазы [Растительные ресурсы России, 2012]. Антиоксидантная активность растения по видимому обусловлена в том числе и фенольными соединениями, содержащимися в ней, известными своей антиоксидантной активностью [Алексеева и др., 2012]. Среди фенольных соединений хондрилла ситниковидная содержит значительное количество гидроксикоричных кислот, в числе которых и хлорогеновая кислота [Бубенчикова В.Н. и др., 2014]. Содержанием хлорогеновой кислоты обусловлена антиоксидантная активность кофе, плодов растений [Дейнека В.И. и др., 2008]. Помимо этого, хлорогеновая кислота обладает антивирусной, антибактериальной активностью, оказывает гепатопротекторное, гипогликемическое и другие виды действия [Левицкий А.П. и др., 2010].



В связи с вышесказанным целесообразным является проведение стандартизации сырья хондриллы ситниковидной по содержанию гидроксикоричных кислот, как одной из групп действующих веществ хондриллы ситниковидной.

Цель работы

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот и проведение ее валидации.

Материалы и методы

Объектом исследования была выбрана трава хондриллы ситниковидной, заготовленная на территории Курской и Белгородской областях в 2013-2014 годах в период цветения растения.

Для количественного определения гидроксикоричных кислот нами использован метод прямой спектрофотометрии [Брыкалов А.В. и др., 2008; Ларькина М.С., 2008].

Результаты исследований обрабатывали статистически с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel».

Валидацию проводили по показателям: линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности методики [Евдокимова О.В., 2008; Гаврилин М.В., Сенченко С.П., 2009].

Результаты и обсуждение

При разработке методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот нами был изучен спектр поглощения спирто-водного извлечения из травы хондриллы ситниковидной. Максимум поглощения исследуемого извлечения находится при длине волны 325-330 нм и совпадает с максимумом поглощения гидроксикоричных кислот, что позволяет сделать вывод о том, что характер кривой поглощения спирто-водного извлечения из травы хондриллы ситниковидной определяется в основном гидроксикоричными кислотами и позволяет использовать длину волны $\lambda=328$ нм для спектрофотометрического определения суммы гидроксикоричных кислот. Проведенное нами ранее исследование фенольных соединений методом ВЭЖХ показало, что основной среди гидроксикоричных кислот является хлорогеновая кислота [Бубенчикова В.Н. и др., 2014]. Максимум ее поглощения находится при длине волны 328 нм.

Расчет содержания суммы гидроксикоричных кислот вели в пересчете на хлорогеновую кислоту по ее удельному показателю поглощения, который равен 504. Далее при разработке методики использовали значение оптических плотностей полученных извлечений при длине волны 328 нм.

При разработке методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот изучены следующие условия: измельченность сырья, экстрагент, время экстрагирования. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1
Table

Влияние условий экстракции на извлечение суммы гидроксикоричных кислот из травы хондриллы ситниковидной
Effect of extraction conditions on the recovery of the amount of hydroxycinnamic acids from herbs Chondrilla juncea L.

Условия экстракции	Содержание суммы гидроксикоричных кислот, %
Степень измельченности сырья, мм	
1	3.20±0.05
2	2.91±0.06
3	2.08±0.04
Экстрагент: спирт этиловый, %	
30	2.58±0.06
50	3.11±0.05
70	3.18±0.06
96	1.24±0.04
Время экстракции, мин (спирт этиловый 50%, соотношение сырьё: экстракт – 1:100)	
30	2.90±0.07
45	3.17±0.06
60	3.16±0.05



Из приведенных данных следует, что оптимальными являются степень измельчения сырья 1 мм, экстрагент - спирт этиловый 50%, 70%, время экстракции 45 минут; экстракция до наступления равновесия. Описанные выше условия позволили разработать методику количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот.

Методика количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот.

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1мм. Около 1.0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 200 мл, взвешивали с погрешностью ± 0.01 , заливали 100 мл спирта этилового 50%. Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику и экстрагировали на кипящей водяной бане в течение 45 минут. После охлаждения колбу взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 50%, извлечения фильтровали через бумажный фильтр и отбрасывали первые 10 мл фильтрата. 0.5 мл полученного извлечения переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили объем спиртом этиловым 50% до метки. Измеряли оптическую плотность приготовленного раствора при длине волны 328 нм.

В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 50%.

Содержание суммы гидрооксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту вычисляли по следующей формуле с использованием удельного показателя поглощения хлорогеновой кислоты:

$$X = \frac{D \times A \times B}{1\% \times E \times 1\text{см} \times a \times b}$$

где:

D – оптическая плотность исследуемого извлечения;

A – объем мерной колбы, используемой для сбора извлечения, мл;

B – объем мерной колбы, используемой для разведения и анализа, мл;

b – объем извлечения, взятый для разведения и анализа, мл;

1%

E 1см. - удельный показатель поглощения кислоты хлорогеновой при $\lambda=328$ нм, равный 504;

a – навеска сырья, г.

Результаты количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот приведены в таблице 2.

Таблица 2

Table 2

**Содержание суммы гидрооксикоричных кислот в траве
хондриллы ситниковидной (n=5, P=95%)
The content of the amount of hydroxycinnamic acids in the herbs
Chondrilla juncea L. (n=5, P=95%)**

№ п/п	Место сбора сырья, год сбора	Метрологическая характеристика методики				
		X, %	S ₂	S	Δx	Еотп, %
1	Курская обл., Курский р-н 2013 г.	3.17	0.00286	0.05348	0.14	4.42
2	Курская обл., Курский р-н 2014 г.	2.80	0.00108	0.03286	0.08	2.86
3	Белгородская обл., 2014 г.	3.79	0.00350	0.0593	0.15	3.96

Из данных таблицы 2 видно, что содержание суммы гидрооксикоричных кислот в траве хондриллы ситниковидной колеблется от 2.80% до 3.79%.

Валидацию разработанной методики проводили по следующим показателям: линейности, повторяемости, воспроизводимости, правильности.

Для проверки линейности брали 5 навесок сырья, массой 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 г (точные навески), и готовили из них извлечения по разработанной нами методике.

На рисунке 1 представлена зависимость значения оптической плотности полученных извлечений от массы в навески сырья. Коэффициент корреляции, который является главным критерием приемлемости линейности, составил 0.999935, что близко к единице. Значит, наши результаты можно описать прямой, т.е. в пределах диапазона «масса навески 1.0 – 2.5 г» - оптическая плотность полученных извлечений прямо пропорциональна концентрации



хлорогеновой кислоты в пробе. В результате установлено, что в пределах измеряемых концентраций зависимость оптической плотности от концентрации носит линейный характер.

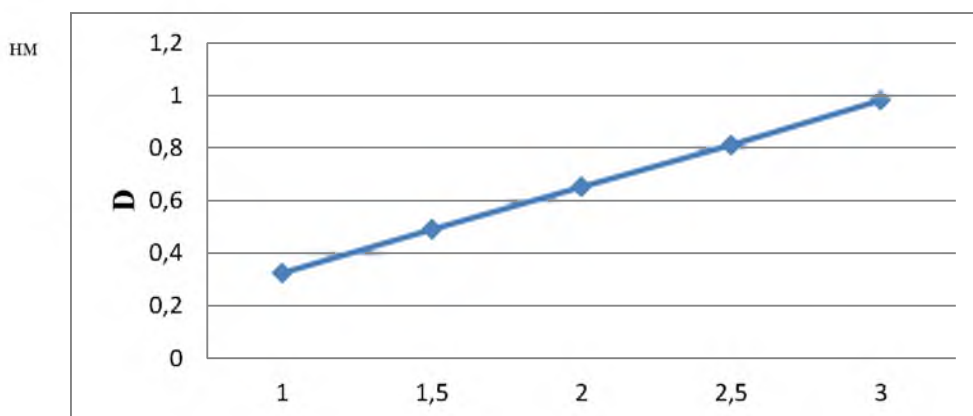


Рис. 1. Зависимость оптической плотности исследуемых извлечений из травы хондриллы ситниковидной от массы навески

Fig.1. The dependence of absorbency of investigated extracts from the herb of Chondrilla juncea on shot mass

При установлении повторяемости проводили 6 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (S) и относительного стандартного отклонения (S отн) (табл. 3). Относительное стандартное отклонение составило 3.79% (не более 10%), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 3
Table 3

Определение повторяемости разработанной методики
Determination of the repeatability the developed method

№п/п	Содержание суммы гидроксикоричных кислот, %	Метрологические характеристики
1	3.21	$x_{cp}=3.17$
2	3.15	$Sx^2=0.00228$
3	3.17	$Sx_{cp}=0.04775$
4	3.14	$\Delta x=0.12$
5	3.11	$E_{отн}=3.79$
6	3.24	$x_{cp} \pm \Delta x_{cp}=3.17 \pm 0.12$

Воспроизводимость определяли 2 аналитика на 3 образцах в 3 повторностях (табл. 4).

Критерий приемлемости выражается величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15%. В результате проведенных исследований было установлено, что относительное стандартное отклонение не превышает 4.42%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях воспроизводимости.

Правильность оценивали путем добавления к исследуемому извлечению стандартного раствора кислоты хлорогеновой с использованием 10 определений на 2 концентрациях, охватывающих требуемый диапазон.

Таблица 4
Table 4

Определение воспроизводимости разработанной методики
Determination of the reproducibility of the developed method

Повторность	Аналитик	Содержание суммы фенольных соединений в траве хондриллы ситниковидной, %		
		Образец №1	Образец №2	Образец №3
1	2	3	4	5
1	1	3.22	2.76	3.74



2	1	3.15	2.81	3.80
3	1	3.17	2.85	3.83
4	2	3.13	2.78	3.86
5	2	3.10	2.82	3.70
6	2	3.24	2.78	3.81
Среднее значение		3.17	2.80	3.79
Относительное стандартное отклонение, (RSD%)		4.42	2.86	3.96

Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, его средняя величина должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. В разработанной методике процент восстановления находится в пределах от 98.08% до 103.16% (табл. 4). Его средняя величина составляет 99.42%. Относительная ошибка с 95% вероятностью не превышает 4.28%.

Таблица 5
Table 5

Определение правильности методики (эксперимент с добавками)
Determination of the correct method (experiment with additives)

№ п/п	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту розмариновую	Добавлено СО кислоты розмарино-вой, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %	Статистические характеристики
1	0.162	0.5	0.312	0.306	98.08	$X_{\text{среднее}} = 99.42$ $S_x^2 = 2.37568$ $S_x = 1.54132$ $\Delta X = 4.28$ $E_{\text{отн}} = 4.30$ $X_{\text{ср}} \pm \Delta X = 99.42 \pm 4.28$
2	0.162	0.15	0.312	0.316	101.28	
3	0.162	0.15	0.312	0.310	99.36	
4	0.162	0.15	0.312	0.305	97.76	
5	0.162	0.15	0.312	0.314	100.64	
6	0.162	0.25	0.412	0.421	102.18	
7	0.162	0.25	0.412	0.408	99.03	
8	0.162	0.25	0.412	0.425	103.16	
9	0.162	0.25	0.412	0.410	99.51	
10	0.162	0.25	0.412	0.413	100.24	
Среднее значение выхода 99.42%						

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что разработанная нами методика легко воспроизводима, линейна, правильна.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую в траве хондриллы ситниковидной (*Chondrilla juncea* L.). Установлены оптимальные параметры экстракции: сырье с диаметром частиц 1 мм, экстрагент – 50% спирт этиловый, время экстракции – 45 минут, экстракция до наступления равновесия.

2. Разработанная методика валидирована по показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность. Содержание суммы гидроксикоричных кислот колеблется от 2.80% до 3.79%.

Литература

Алексеева Л.И., Тетерюк Л.В., Быструшкин А.Г., Булышева М.Л. 2012. Фенольные соединения и антиоксидантная активность Уральских представителей рода *Thymus* (Lamiaceae). Растительные ресурсы, т. 48 (1): 105-113.

Брыкалов А.В., Головкина Е.М., Белик Е.В., Бостанова Ф.А. 2008. Исследование физиологически активных соединений в препарате из эхинацеи пурпурной. Химия растительного сырья, 3: 89-91.

Бубенчикова В.Н., Левченко В.Н., Верховилова Н.В. 2014. Изучение состава фенольных соединений хондриллы ситниковидной методом ВЭЖХ. Ученые записки Орловского государственного университета, 7 (63): 187-188.



Буданцев А.Л. 2012 . Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 5. Семейства Asteraceae (Compositae), ч. 1. СПб.- М., Изд-во Товарищество научных изданий КМК, 318.

Гаврилин М.В., Сенченко С.П. 2009. Валидация аналитических методик: методические указания для аспирантов и студентов. Пятигорск: ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава. С, 40.

Дейнека В.И., Хлебников В.А., Сорокопудов В.Н., Анисимович И.П. 2008. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Berberidaceae. Химия растительного сырья, 1: 57-61.

Евдокимова О.В. 2008. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы. Фармация, 7: 14-17.

Ларькина М.С. 2008. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого. Химия растительного сырья, 3: 71-74.

Левицкий А.П., Вертикова Е.К., Селиванская И.А. 2010. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология. Мікробіологія і біотехнологія, 2: 6-20.

Literature

Alekseeva L.I., Teteryuk L.V., Bystrushkin A.G., Bulysheva M.L. 2012. Fenol'nye soedinenija i antioksidantnaja aktivnost' Ural'skih predstavitelej roda Thymus (Lamiaceae). [Phenolic compounds and antioxidant activity of the Ural of the genus Thymus (Lamiaceae)]. Rastitel'nye resursy, t. 48 (1): 105-113. (in Russian).

Brykalov A.V., Golovkin E.M., Belik E.V., Bostanov F.A. 2008. Issledovanie fiziologicheski aktivnyh soedinenij v preparate iz jehinacei purpurnoj. [The study of physiologically active compounds in the preparation of Echinacea purpurea.]. Himija rastitel'nogo syr'ja, 3: 89-91. (in Russian).

Bubenchikova V.N., Levchenko V.N., Verholomova N.V. 2014. Izuchenie sostava fenol'nyh soedinenij hondrilly sitnikovidnoj metodom VEZhH. [Studying the composition of phenolic compounds hondrilly juncaginaceae HPLC.]. Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta, 7 (63): 187-188. (in Russian).

Budantsev A.L. 2012. Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastushhie cvetkovye rastenija, ih komponentnyj sostav i biologicheskaja aktivnost'. T. 5. Semejstva Asteraceae (Compositae), [Plant Resources of Russia: Wild flowering plants, their composition and biological activity. T. 5 - Family Asteraceae (Compositae)], part 1, St. Petersburg-Moscow, Tovarišhestvo nauchnyh izdanij KMK, 318. (in Russian).

Gavrilin M.V., Senchenko S.P. 2009. Validacija analiticheskikh metodik: metodicheskie ukazanija dlja aspirantov i studentov. [Validation of analytical methods: guidelines for graduate and undergraduate students]. Pyatigorsk: GOU VPO Pjatigorskaja GFA Roszdrava, 40. (in Russian).

Deineka V.I., Khlebnikov V.A., Sorokopudov V.N., Anisimovich I.P. 2008. Hlorogenovaja kislota plodov i list'ev nekotoryh rastenij semejstva Berberidaceae [Chlorogenic acid fruits and leaves of some plants in the family Berberidaceae]. Himija rastitel'nogo syr'ja, 1: 57-61. (in Russian).

Evdokimova O.V. 2008. Validacija metodiki kolichestvennogo opredelenija summy flavonoidov v stolbikah s ryl'cami kukuruzy. [Validation of methods of quantitative determination of total flavonoids in the bars with the stigmas of maize.]. Farmacija, 7: 14-17. (in Russian).

Larkina M.S. 2008. Izuchenie dinamiki nakoplenija fenolkarbonovyh kislot v nadzemnoj chasti vasil'ka sherohovatogo [Studying the dynamics of accumulation of phenol carbonic acids in the aerial part of cornflower rough]. Himija rastitel'nogo syr'ja, 3: 71-74. (in Russian).

Levitsky A.P., Vertikova E.K., Selivanskaya I.A. 2010. Hlorogenovaja kislota: biohimija i fiziologija. [Chlorogenic acid biochemistry and physiology.]. Mikrobiologija i biotehnologija, 2: 6-20. (in Ukrainian).