

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФЕНОЛОГЛИКОЗИДОВ В ЛИСТЬЯХ ХАМЕДАФНЫ**

А. С. Горькова, Н. С. Фурса

Ярославский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 11.02.2015 г.

Аннотация. Разработана методика количественного определения фенологликозидов в листьях хамедафны прицветничковой методом прямой спектрофотометрии. Выбраны оптимальные условия пробоподготовки в зависимости от концентрации экстрагента, степени измельчения сырья, времени и кратности экстракций, соотношения сырья и экстрагента. Проведена валидация методики по правильности, воспроизводимости, повторяемости и линейности.

Ключевые слова: арбутин, количественное определение, УФ-спектрофотометрия, листья, хамедафна прицветничковая.

Abstract. The technique of quantitative determination of phenolic glycosides in *Chamaedaphne calyculata* leaves by direct spectrophotometry was elaborated and its validation was carried out. The optimal conditions for sample preparation depending on extractant concentration, raw material fineness, time and frequency of extractions, raw material and extractant ratio were chosen. Validation of the technique by its accuracy, repeatability, reproducibility and linearity was carried out.

Key words: arbutin, quantitative determination, UV-spectrophotometry, leaves, *Chamaedaphne calyculata*.

Фенологликозиды, среди которых доминирует арбутин, - типичные метаболиты многих видов семейства вересковые (*Ericaceae* Juss.), в частности толокнянки, вереска, рододендронов, черники, голубики – объектов углубленных фитохимических исследований [1, 2, 3]. Ресурсы официнальных видов истощены. Вместе с тем другие вересковые, несмотря на большие запасы, как арбутинсодержащие растения изучены в недостаточной мере и не находят применения в научной медицине. Примером такого растения является хамедафна прицветничковая (*Chamaedaphne calyculata* (L.), применяющаяся в народной медицине в качестве мочегонного и антисептического средства [4]. О содержании фармакологически активных веществ в различных органах растения, в том числе листьев, сведений недостаточно.

Цель исследования – разработать методику количественного определения фенологликозидов в листьях хамедафны прицветничковой и провести ее валидацию.

**ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для разработки методики количественного определения фенологликозидов использовали воздушно-сухие листья хамедафны прицветничковой, собранные в окрестностях п. Некрасовское Ярославской области в фазу плодоношения в 2012 году. Спектрофотометрические исследования выполнены на приборе СФ-56 в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн 270-390 нм. Статистическую обработку результатов осуществляли по общепринятой методике [5]. Валидация проведена по линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности методики [6].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении качественных реакций и хроматографических исследований ТСХ нами отмечено, что основным фенологликозидом листьев хамедафны прицветничковой является арбутин. В связи с чем нами предприняты исследования по разработке методики количественного определения фенологликозидов в листьях растения в пересчете на арбутин методом прямой спектрофотометрии.

В ходе эксперимента нами изучены условия экстракции фенологликозидов из листьев хамедафны в зависимости от экстрагента, степени измельченности сырья, времени экстрагирования, соотношения сырья и экстрагента. Результаты исследований изложены ниже.

При выборе оптимальной концентрации экстрагента использовали этанол следующих концентраций: 40%, 70%, и 96%. Около 0.5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали при умеренном кипении на водяной бане в течение 30 минут. Извлечение охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Операцию проводили еще дважды с 30 мл и 20 мл этилового спирта. Извлечение доводили до метки этанолом соответствующей концентрации (раствор А). 5 мл раствора А помещали в колонку с алюминия оксидом и элюировали 15 мл этанола. Элюат собирали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем до метки этанолом и перемешивали (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 285 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый, пропущенный через колонку с алюминия оксидом. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Содержание фенологликозидов (в пересчете на арбутин) рассчитывали по формуле:

$$X, \% = \frac{D \times 100 \times 25 \times K}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 5 \times a \times (100 - W)} \times 100\%, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора; 100 и 25 – объем мерных колб, используе-

мых для анализа, мл; K – коэффициент неполного элюирования, равный 1.14025. $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения арбутина при 285 нм, равный 72.23; 5 – объем извлечения, взятый для анализа, мл; а – навеска сырья, г. W – влажность сырья, равна 13.5%.

Хроматографическую колонку приготавливали следующим образом: 2.0 г алюминия оксида нейтрального для хроматографии (L 40/250), фирмы Lachema (Чехия), промытого водой очищенной до нейтральной реакции, помещали в стеклянную колонку диаметром 1.5 см и высотой 25 см и промывали 10 мл этанола соответствующей концентрации.

Таблица 1

Содержание фенологликозидов в листьях хамедафны в зависимости от концентрации спирта этилового

Концентрация спирта, %	40	70	96
Содержание фенологликозидов, %	5.09±0.0125	5.39±0.0163	2.20±0.0096

Наибольший выход фенологликозидов нами отмечен при использовании спирта этилового 70%.

При определении оптимальной степени дисперсности листа хамедафны измельчали, просеивали через сита, брали навески с размерами частиц менее 1 мм, 1 мм, 2 мм, 3 мм и 5 мм. Далее поступали так, как указано выше. Результаты исследований представлены в таблице 2.

В ходе исследований обнаружено, что больше всего фенологликозидов извлекалось при использовании сырья с диаметром частиц менее 1 мм.

Результаты исследований по выявлению оптимальных условий влияния времени и количества экстракций на выход фенологликозидов отражены в таблице 3.

Результаты определений показали, что наибольшая концентрация фенологликозидов наблюдалась при трехкратной экстракции по 15 мин.

При исследовании влияния оптимального соотношения сырья и экстрагента на выход фенологликозидов использовали следующие соотношения: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 (табл. 4).

В ходе эксперимента установлено, что оптимальными параметрами для количественного

Таблица 2

Содержание фенологликозидов в листьях хамедафны в зависимости от степени измельчения

Размер частиц	<1 мм	1 мм	2 мм	3 мм	5 мм
Содержание фенологликозидов, %	6.44 ± 0.0243	5.68 ± 0.0167	5.50 ± 0.0118	5.26 ± 0.0127	4.97 ± 0.0121

определения суммы фенологликозидов в листьях хамедафны оказались следующие: экстрагент – 70% спирт этиловый, степень измельченности сырья менее 1 мм, трехкратная экстракция по 15 минут и соотношение сырья и экстрагента 1:100.

Таблица 3

Выход фенологликозидов в листьях хамедафны в зависимости от оптимальных условий экстрагирования

№ опыта	Количество экстракций	Время одного экстрагирования, мин	Содержание фенологликозидов, %
1	1	15	5.63±0.0345
2	2	15	6.28±0.0254
3	3	15	8.87±0.0097
4	1	30	5.29±0.0156
5	2	30	6.30±0.0163
6	3	30	6.22±0.0183

Таблица 4

Выход фенологликозидов в листьях хамедафны в зависимости от соотношения сырья и экстрагента

Соотношение	Содержание фенологликозидов, %
1:10	3.46±0.0258
1:25	4.75±0.0189
1:50	6.23±0.0652
1:100	7.02±0.0548

Для выявления недостатков методики на всех стадиях разработки была проведена ее валидация, что позволяет значительно снизить вероятность ошибок [6].

Повторяемость методики определяли на шести образцах, при получении результатов измерений одним методом, с использованием од-

ного спектрофотометра, в пределах короткого промежутка времени. Статистическая обработка полученных данных (табл. 5), показала, что они достоверны при доверительной вероятности 99%, вычисленное значение величины относительного стандартного отклонения (RSD) – 3.07% не превышало критериев приемлемости – 5%, что доказывало прецензионность методики в условиях повторяемости.

Воспроизводимость методики проведена на 3 образцах в 3-х повторностях (табл. 6).

Из результатов определений следует, что меры прецензионности данной методики не превышали критериев приемлемости, что указывало на ее удовлетворительную воспроизводимость.

Правильность методики (исключение систематических ошибок) устанавливали на идентичных образцах с добавлением известного количества РСО арбутина, в трехкратной повторности 3-х образцов, на 3-х уровнях концентраций (табл. 7).

Из приведенных данных видно, что относительное стандартное отклонение оценки правильности методики равно 4.02%, что являлось свидетельством отсутствия систематической ошибки разработанной нами методики.

Для проверки линейности избраны следующие 5 экспериментальных точек: взвешивали отдельные навески массой 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 и 1.25 г (точные навески) и готовили из них извлечения соответствующих концентраций (табл. 8).

Для подтверждения линейности методики получена градуировочная зависимость, представленная на рис. 1.

Таблица 5

Результаты оценки повторяемости методики

№ образца		1	2	3	4	5	6	
Содержание фенологликозидов, %		7.65	7.44	7.73	8.14	7.63	7.85	
f	\bar{X}	S ²	S	ΔX	$\overline{\Delta X}$	t(99%, 5)	$\bar{\epsilon}_{\%}$	RSD, %
5	7.74	0.0565	0.0970	0.9578	0.3910	4.03	5.05	3.07

Таблица 6

Результаты оценки воспроизводимости методики

Повторность	Содержание суммы фенологликозидов в пересчете на арбутин в листьях хамедафны, %		
	Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	7.64	8.01	7.78
2	7.56	8.14	7.73
3	7.75	7.96	7.87
\bar{X}	7.65	8.02	7.79
RSD, %	0.88	1.19	0.91

Результаты определения правильности методики

№ образца	Содержание суммы феноло-гликозидов в пробе, г	Добавлено РСО арбутина, г	Содержание		Открываемость, %
			ожидаемое, г	полученное, г	
1	0.0151	0.010	0.0251	0.0241	96.02
	0.0151	0.020	0.0351	0.0355	101.14
	0.0151	0.030	0.0451	0.0431	95.57
2	0.0169	0.010	0.0269	0.0253	94.05
	0.0169	0.020	0.0369	0.0382	103.52
	0.0169	0.030	0.0469	0.0473	100.85
3	0.0166	0.010	0.0266	0.0282	106.02
	0.0166	0.020	0.0366	0.0372	101.64
	0.0166	0.030	0.0466	0.0455	97.64

Метрологическая характеристика: $\bar{x}=99.61\%$, RSD=4.02%

Таблица 8

Результаты определения линейности методики

№ образца	Навеска, г	Оптическая плотность, D
1	0.2440	0.2045
2	0.4890	0.3909
3	0.7312	0.6206
4	0.9832	0.8780
5	1.2514	1.0473

Коэффициент корреляции, который является главным критерием приемлемости линейности, составил 0.997, т.е. близкий к единице, что свидетельствовало о линейной зависимости значения оптической плотности от содержания действующих веществ.

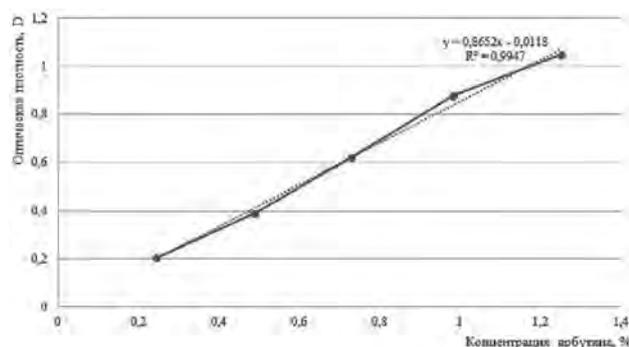


Рис. 1. Градуировочная зависимость для определения фенологликозидов в листьях хамедафны методом прямой спектрофотометрии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика количественного определения суммы фенологликозидов с

Ярославский государственный медицинский университет

Горькова А. С., заочный аспирант, старший

использованием метода прямой спектрофотометрии в листьях хамедафны прицветничковой в пересчете на арбутин и проведена ее валидация по повторяемости, воспроизводимости, правильности и линейности. Результаты определений позволяют заключить, что предлагаемая методика является высокочувствительной, правильной и воспроизводимой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазепина Л.С. Сравнительное фармакогностическое изучение грушанки круглолистной, зимолоубки зонтичной, толокнянки обыкновенной: автореф. дисс...канд. фармац. наук. / Л.С. Мазепина — М., 2011. — 24 с.
2. Онегин С.В. Фармакогностическое изучение вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.): дис. ... канд. фармац. наук / С.В. Онегин — Ярославль, 2008. — 116 с.
3. Таланов А.А. Фармакогностическое изучение голубики болотной (*Vaccinium uliginosum* (L.)): дис. ... канд. фармац. наук / А.А. Таланов — Ярославль, 2013. — 176 с.
4. Мазнев Н.И. Высокоэффективные лекарственные растения. Большая энциклопедия / Н.И. Мазнев. — М.: Эксмо, 2012. — 608 с.
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е изд-е. — М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. — 704 с.
6. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1); Официальные документы // Фармация. — 2008. — №4. — С. 7-10.

Yaroslavl State Medical University

Gorkova A. S. — post-graduated student, Dept. of pharmacognosy and pharmaceutical technology

Разработка и валидация методики

лаборант кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии

E-mail: gorkova.alexandrea@gmail.com

Тел.: (4852)72-82-97

E-mail: gorkova.alexandrea@gmail.com

Ph.: (4852)72-82-97;

Фурса Н. С., профессор, докт. фармац. наук, заведующий кафедрой фармакогнозии и фармацевтической технологии

E-mail: fursans@rambler.ru

Тел.: (4852)72-66-03;

Fursa N. S., professor, Doctor of Pharmacy, manager by the chair of pharmacognosy and pharmaceutical technology

E-mail: fursans@rambler.ru

Ph.: (4852)72-66-03