

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ КОНСЕРВАЦИИ

О. В. Тринеева, А. И. Сливкин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 25.02.2016 г.

**Аннотация.** Плоды облепихи содержат достаточное количество каротиноидов, что позволяет отнести их к весьма ценным каротиноидсодержащим лекарственным источникам. Плоды облепихи крушиновидной как свежие, так и высушенные, традиционно стандартизируются по содержанию суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации для последующего включения в проекты фармакопейных статей для ГФ Российской Федерации.

**Ключевые слова:** каротиноиды, плоды облепихи крушиновидной свежие и высушенные, валидация.

**Abstract.** Fruits of sea buckthorn contain a sufficient amount of carotenoids that can be attributed to their highly valuable source of carotenoid-containing medicines. Sea buckthorn fruits both fresh and dried, conventionally standardized content of carotenoids in the amount based on  $\beta$ -carotene. Development and validated method for the quantitative determination of the amount of carotenoids in terms of  $\beta$ -carotene in the fruit of sea buckthorn different methods of conservation for inclusion in the draft articles for the pharmacopoeia GF of Russian Federation.

**Keywords:** carotenoids, sea buckthorn fruit fresh and dried, validation.

Плоды облепихи крушиновидной как свежие, так и высушенные, традиционно стандартизируются по содержанию суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин [1]. Контроль над суммарным содержанием каротиноидов принято осуществлять с помощью спектрофотометрии [2,3], так как данные соединения имеют электронные спектры поглощения с максимумами при 422-428, 444-450, 472-484 нм. Расчет содержания данных биологически активных веществ (БАВ) в плодах при этом, согласно различной нормативной документации (НД), осуществляется по-разному. Может применяться как способ расчета по значению удельного показателя поглощения стандартного образца  $\beta$ -каротина [2], так и способ, основанный на сравнении оптической плотности испытуемо-

го извлечения с оптической плотностью раствора бихромата калия определенной концентрации [4]. Кроме того, методика пробоподготовки извлечения из плодов также отличается разнообразием от используемого экстрагента до температурного режима и других технологических параметров экстракции каротиноидов из исследуемого лекарственного растительного сырья (ЛРС). Так как в отечественных Государственных фармакопеях (ГФ) статей на плоды облепихи крушиновидной не обнаружено, возникает очевидная необходимость разработки проектов фармакопейных статей (ФС) на данный вид сырья, в том числе различных способов консервации.

Цель работы – разработка и валидация методик количественного определения суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин в плодах облепихи крушиновидной свежих и высушенных для

последующего включения их в проекты ФС для ГФ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлись плоды растения рода *Hipporhaë*s, собранные в 2013, 2014 и 2015 гг на территории Воронежской области согласно правилам заготовки ЛРС в свежем, высушенном и замороженном виде. Сушку плодов производили при  $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  до остаточной влажности не более 20%. Замораживание и хранение осуществляли в условиях морозильной камеры при  $t = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 9 месяцев.

Спектры поглощения извлечений из высушенных и свежих плодов облепихи крушиновидной в диапазоне длин волн 400-500 нм имеют максимум оптической плотности в 95% этаноле при  $448 \pm 2\text{ нм}$  (рис. 1).

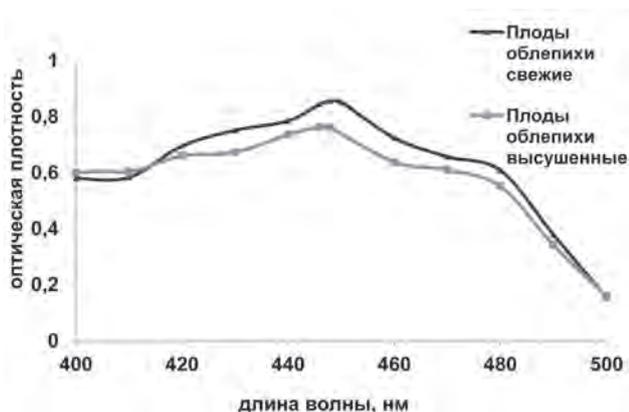


Рис. 1. Вид спектров поглощения извлечений из плодов облепихи крушиновидной в диапазоне длин волн 400-500 нм

Анализ данных литературы показывает, что каротиноиды растворимы в спирте различных концентраций, ацетоне, гексане, хлороформе и других органических растворителях [2-4]. Поэтому для извлечения суммы каротиноидов из плодов облепихи нами были использованы водно-спиртовые смеси в различных соотношениях и хлороформ, согласно рекомендациям литературы. В таблице 1 представлены данные по влиянию состава экстрагента на степень извлечения каротиноидов (в пересчёте на  $\beta$ -каротин) из плодов облепихи.

Как видно из данных табл. 1 лучшим экстрагентом для выделения каротиноидов из плодов облепихи как свежих, так и высушенных является 95% этанол. При исследовании влияния полярности экстрагента на выход каротиноидов (рис. 2) установлено, что с увеличением полярности до 5,5 единиц происходит повышение экстраги-

руемости каротиноидов. Дальнейшее увеличение полярности экстрагента нецелесообразно, ввиду снижения содержания каротиноидов в извлечении (рис. 2).

Экспериментальным путем установлено, что

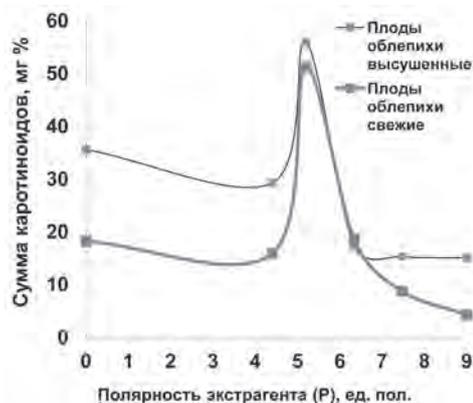


Рис. 2. Влияние полярности экстрагента на выход каротиноидов

для извлечения суммы каротиноидов из ЛРС, оптимальным соотношением является 1:50 и 1:100 для высушенных и свежих плодов соответственно (табл. 2), а наилучшее время экстракции, за которое будет извлекаться максимальное количество данных БАВ, составляет 60 и 90 минут (рис. 3).

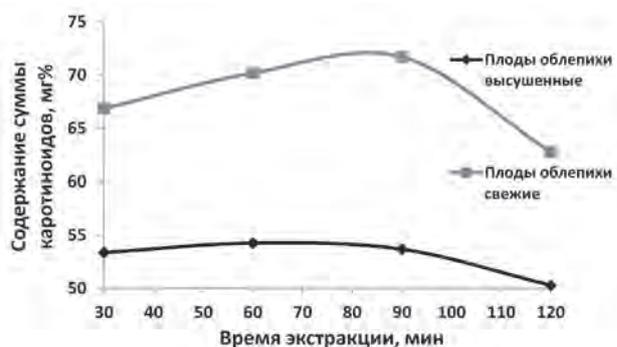


Рис. 3. Влияние времени экстракции на выход каротиноидов в извлечение

При исследовании влияния кратности экстракции на выход суммы каротиноидов в извлечение из ЛРС облепихи крушиновидной установлено, что, вне зависимости от способа консервации, повышение кратности не приводит к увеличению данного показателя (рис. 4), оставаясь на постоянном уровне.

Количественное определение суммы каротиноидов в плодах. Около 2 г (точная навеска) измельченного высушенного сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 1 мм, или около 1 г (точная навеска) измельченного свежего сырья

Таблица 1

Влияние экстрагента на извлечение каротиноидов из плодов облепихи

№ п/п	Экстрагент	Содержание каротиноидов, мг%	
		Высушенные плоды	Свежие плоды
1	70% этанол	17.3056±0.6989	18.6579±0.6997
2	95% этанол	55.5479±2.2612	51.1893±1.9196
3	40% этанол	15.9742 ±0.5990	8.7809±0.3293
4	хлороформ	29.3023±1.1837	15.8852±0.5957
5	Вода	15.0815±0.6092	4.2843±0.1607
6	гексан	35.5935±1.4380	18.2274±0.7163

Таблица 2

Влияние соотношения сырья и экстрагента на извлечение каротиноидов из плодов облепихи крушиновидной

№ п/п	Соотношение сырья и экстрагента	Содержание суммы каротиноидов, мг%	
		Высушенные плоды	Свежие плоды
1	1:20	40.3567±1.5134	44.2601±1.6598
2	1:30	53.3519±2.1554	51.1893±1.9196
3	1:50	60.9829±2.4637	54.6968±2.0511
4	1:70	59.8528±2.4181	60.6393±2.2740
5	1:100	54.1365±2.1871	66.8581±2.5072
6	1:120	52.0976±2.1047	64.7439±2.4279

помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 95% этилового спирта и взвешивают с погрешностью ±0.01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 или 90 мин соответственно, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок.

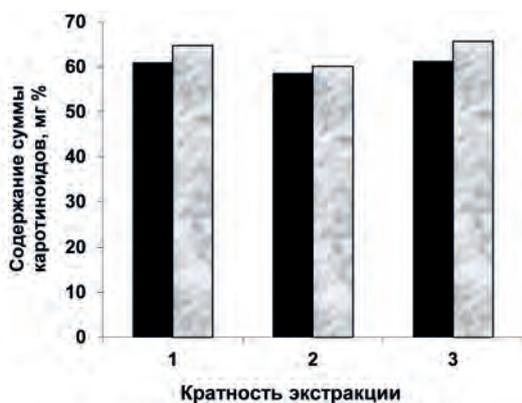


Рис. 4. Влияние кратности экстракции на выход каротиноидов в извлечение

Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 95% этиловым спиртом. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). 5 мл раствора А, полученного из высушенного сырья, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки 95% этиловым спиртом

(раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора А (для свежего сырья) или Б (для высушенного сырья) измеряют на спектрофотометре при длине волны 448±2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения является 95% этанол. Содержание суммы каротиноидов в мг% (X) в пересчете на β-каротин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формулам 1 или 2 (для высушенного и свежего сырья соответственно):

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1000}{m \cdot 2500 \cdot 5 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot 2500 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot 2500 \cdot (100 - W)}, \quad (2)$$

где А — оптическая плотность испытуемого раствора; m — масса сырья, г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

По разработанной нами методике была проведена количественная оценка содержания каротиноидов в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации. Результаты статистической обработки результатов представлены в таблице 3.

Валидационную оценку методики осуществляли согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 5725 и рекомендациям Международной конференции по гармонизации ICH Q2(R1) по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел обнаружения, внутри- и межлабораторная воспроизводимость, повторяемость. Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин в образцах ЛРС высушенного состави-

Метрологическая характеристика метода анализа ( $P = 95\%$ ;  $n = 6$ )

f	$\bar{x}_{\text{ср}}$	$S^2$	S	$Sx_{\text{ср}}$	t(P,t)	$\Delta x$	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
Свежие плоды									
5	57.713	4.2637	2.0649	0.8428	2.57	5.3067	2.1660	9.20	3.75
Высушенные плоды									
5	57.976	0.1684	0.4104	0.1675	2.75	1.0548	0.4305	1.82	0.74

до  $57.9760 \pm 0.4305$  мг%; свежего –  $57.7130 \pm 2.1660$  мг% (принятое опорное значение).

Специфичность считается доказанной, если ни растворитель, используемый при пробоподготовке, ни реактивы, ни компоненты плацебо не искажают результат. В данном случае методика специфична (рис. 5).

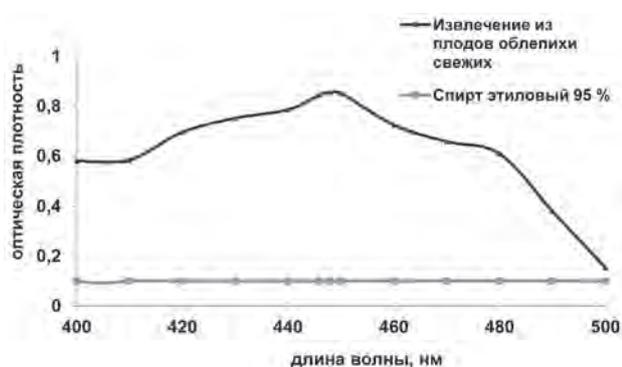


Рис. 5. Определение специфичности СФ-методики количественного определения суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин в плодах облепихи крушиновидной

Линейность определяли на восьми уровнях концентраций. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме: 1 уровень: аликвота раствора А 1.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (20.0%); 2 уровень: аликвота раствора А 2.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (40.0%); 3 уровень: аликвота раствора А 3.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (60.0%); 4 уровень: аликвота раствора А 5.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (100.0%); 5 уровень: аликвота раствора А 7.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (140.0%); 6 уровень: аликвота раствора А 8.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (160.0%); 7 уровень: аликвота раствора А 10.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (200.0%); 8 уровень: аликвота раствора А 12.0 мл – объем раствора Б 25.0 мл (240.0%). По полученным данным строили график зависимости оптической плотности раствора Б от концентрации в нем каротиноидов и рассчитывали уравнение регрессии (рис. 6). Другие характеристики линейности (наклон прямой, отрезок на оси ординат) приведены в табл. 4.

Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Межлабораторную воспроизводимость методики определяли в разных лабораториях, разными операторами с использованием различного оборудования. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения (RSD, %), который не превышал 6.52%, что свидетельствует о соответствии разработанной методики по параметру сходимости.

Экспериментально полученные результаты определения содержания суммы каротиноидов в плодах облепихи были сравнены с известными литературными данными (табл. 5) [3].

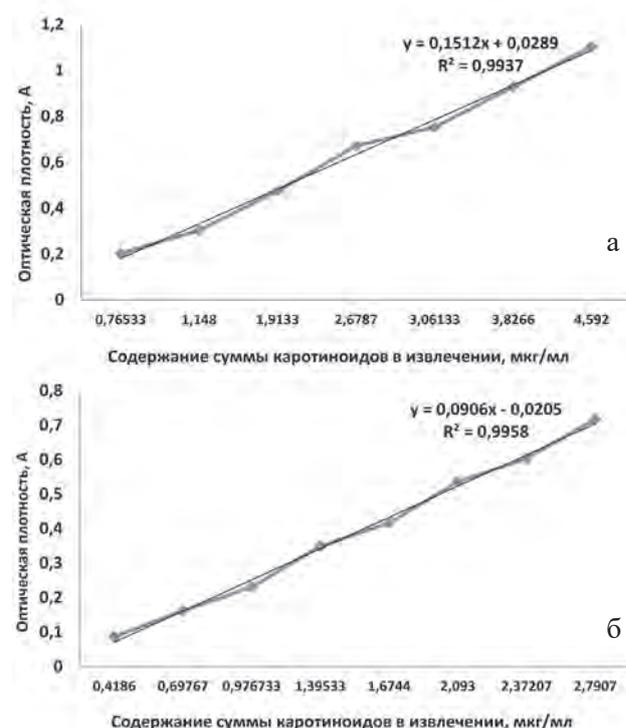


Рис. 6. Вид зависимости оптической плотности раствора от концентрации каротиноидов (а – высушенные плоды; б – свежие плоды)

Таблица 4

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин в плодах облепихи крушиновидной свежих и высушенных

Характеристика	Статистические характеристики			Результаты		
Высушенные плоды						
Линейность	Уравнение прямой			y=0.1512x+0.0289		
	Наклон (a)			0.1512		
	Отрезок на оси ординат b			0.0289		
	Коэффициент корреляции			0.9937		
	Диапазон линейности (мкг в 1 мл извлечения)			0.7653 – 4.5920		
Предел определения, мкг/мл	Количество мкг каротиноидов в 1 мл извлечения			0.38267		
Повторяемость	проба	Hitachi U-1900 (Япония)		СФ-2000 (Россия)		
		Оптическая плотность	Содержание БАВ, мг%	Оптическая плотность	Содержание БАВ, мг%	
	1	0.4760	57.6932	0.4583	55.5479	
	2	0.4760	57.6932	0.4566	55.3418	
	3	0.4750	57.5720	0.4542	55.0510	
	4	0.4800	58.1780	0.4573	55.4267	
	5	0.4840	58.6628	0.4504	54.5904	
	6	0.4790	58.0568	0.4437	53.7783	
			Наименьшее значение, мг%		53.7783	
			57.5720			
			Наибольшее значение, мг%		55.5479	
			58.6628			
			Среднее значение, мг%		54.9560	
			57.9760			
			Доверительный интервал (P=95%), мг%		54.9560±0.7038	
			57.9760±0.04305			
		Средняя ошибка определения, %		1.28		
		0.74				
		Коэффициент вариации, %		1.22		
		0.71				
Свежие плоды						
Линейность	Уравнение прямой			y=0.0906x-0.0205		
	Наклон (a)			0.0906		
	Отрезок на оси ординат b			0.0205		
	Коэффициент корреляции			0.9958		
	Диапазон линейности (мкг в 1 мл извлечения)			0.4186 – 2.7907		
Предел определения, мкг/мл	Количество мкг каротиноидов в 1 мл извлечения			0.279066		
Повторяемость	проба	Hitachi U-1900 (Япония)		СФ-2000 (Россия)		
		Оптическая плотность	Содержание БАВ, мг%	Оптическая плотность	Содержание БАВ, мг%	
	1	0.3610	59.7259	0.3844	63.5973	
	2	0,3410	56.4170	0.3713	61.4300	
	3	0,3380	55.9206	0.3769	62.3565	
	4	0,3410	56.4170	0.3334	55.1596	
	5	0,3440	56.9133	0.3330	55.0934	
	6	0,3680	60.8840	0.3421	56.5990	

Таблица 4 (Продолжение)

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин в плодах облепихи крушиновидной свежих и высушенных

Характеристика	Статистические характеристики	Результаты
Повторяемость	Наименьшее значение, мг%	
	55.9206	55.0934
	Наибольшее значение, мг%	
	60.8840	63.5973
	Среднее значение, мг%	
	57.7130	59.0393
	Доверительный интервал (P=95%), мг%	
	57.7130±2.1660	59.0393±4.0375
	Средняя ошибка определения, %	
	3.75	6.84
Коэффициент вариации, %		
3.58	6.52	

Таблица 5

Содержание каротиноидов в некоторых видах растительного сырья

№ п/п	Наименование ЛРС	Содержание суммы каротиноидов, мг%
1	Корневища с корнями девясила иволистного	1.31
2	Трава девясила иволистного	7.01
3	Плоды облепихи крушиновидной свежие (НД)	Не менее 10
4	Плоды шиповника	34.98
5	Листья крапивы коноплевой	50.06
6	Плоды облепихи свежие*	<b>57.7130±2.1660</b>
7	Плоды облепихи высушенные*	57.9760±0.4305
8	Облепиховое масло	Не менее 180

\* - экспериментальные данные

Таблица 6

Содержание каротиноидов в плодах облепихи крушиновидной (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Плоды облепихи	Сумма каротиноидов, мг%
1	Свежие плоды	51.19±1.92
2	Замороженные плоды через 3 мес.	35.68±1.44
3	Замороженные плоды через 6 мес.	33.18±1.34
4	Замороженные плоды через 9 мес.	24.30±0.98

Данные таблицы 5 показывают, что плоды облепихи содержат достаточное количество каротиноидов, что позволяет отнести их к весьма ценным каротиноидсодержащим лекарственным источникам. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности стандартизации плодов облепихи крушиновидной по содержанию БАВ данной группы.

Проведена также оценка содержания суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин в свежих и замороженных плодах через 3, 6 и 9 месяцев хранения. Из данных таблицы 6 следует, что процесс заморозки приводит к постепенному снижению

содержания каротиноидов в исследуемом ЛРС. При длительном контакте с кислородом воздуха происходит снижение содержания суммы каротиноидов, обусловленное присутствием в структуре  $\beta$ -каротина термо- и фотолабильной системы сопряженных двойных связей.

Тем не менее, даже при хранении в условиях заморозки до 9 мес., остаточное количество данных БАВ свидетельствует о соответствии плодов требованиям НД и возможности продления сроков хранения замороженных плодов в бочках до 9 месяцев.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования подтверждают валидность предлагаемой методики и позволяют рекомендовать ее для стандартизации плодов облепихи крушиновидной различных способов консервации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богачева, Н.Г. Стандартизация лекарственного растительного сырья облепихи крушиновидной / Н.Г. Богачева, Н.П. Кокушкина, Т.А. Сокольская // Фармация. — № 1. — 2001. — С. 27-29.
2. Разработка методики количественного определения суммы каротиноидов в плодах облепихи методом спектрофотометрии в видимой области / О.В. Тринеева, И.И. Сафонова, А.И. Сливкин, Е.Ф. Сафонова // Тезисы доклада 5-ой Всероссийской с международным участием на-

учно-методической конференции «Фармобразование 2013», Часть II. — Воронеж, 16-18 апреля 2013. — С. 492-495.

3. Чечета, О.В. Определение каротиноидов в плодах шиповника (*Rosa sp.*) / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии — 2012, — №11 — С. 19-23.

4. Определение суммы каротиноидов в растительных маслах и масляных экстрактах / О.В. Рыбакова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, Г.А. Оголь // Тезисы доклада 3-ей Всероссийской Научно-методической конференции «Фармобразование-2007», Часть первая. — Воронеж, 2007. — С. 306 – 308.

5. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. Т. 2. — Минск, 2007. — С. 387-389.

*Воронежский государственный университет  
Тринеева О. В., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии  
E-mail: trineevaov@mail.ru*

*Сливкин А. И., д.фарм.н., проф., зав. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии  
Тел.: 255-47-76  
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Voronezh State University  
Trineeva O. V., candidate of pharmaceutical sciences, associate professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology  
E-mail: trineevaov@mail.ru*

*Slivkin A. Y., Full Professor, PhD, Dsci, Head of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department  
Ph.: 255-47-76  
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*