

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

О.В. Тринева^{1*}, канд. фарм. наук, **А.И. Сливкин**¹, докт. фарм. наук, профессор, **И.А. Самылина**², член-корр. РАН, докт. фарм. наук, профессор, **М.А. Казьмина**¹

¹Воронежский государственный университет;
394006, Воронеж, Университетская площадь, 1

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;
119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2

E-mail: trineevaov@mail.ru

Плоды облепихи крушиновидной – ценный источник биологически активных веществ. В плодах облепихи присутствуют антоцианы, содержание которых не нормируется. Разработана и валидирована методика количественного определения содержания суммы антоцианов в плодах облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид. Установлено, что содержание антоцианов в плодах при высушивании значительно снижается и составляет менее 30% от свежего сырья.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, *Hippophae rhamnoides* L., плоды, содержание, спектрофотометрия, валидация.

Растительное сырье – уникальный поставщик биологически активных веществ (БАВ) различной химической природы, обладающих богатым спектром фармакологической активности. Растительное сырье широко применяется в медицине, фармации, парфюмерии и пищевой промышленности. Активно вовлекать и рационально использовать растительные ресурсы в практических целях в медицине – актуальная задача современности [1–3].

Одним из источников БАВ являются плоды облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L., сем. лоховых – *Elaeagnaceae*). В настоящее время промышленная переработка этого ценного сырья в основном ориентирована на получение облепихового масла, характеризующегося высокой фармакологической активностью. Технология производства облепихового масла характеризуется образованием значительных объемов побочной продукции.

Одной из групп БАВ плодов облепихи являются антоцианы (АЦ) – гликозилированные производные 2-фенилбензопирилия, известные выраженными антиоксидантными, вазопротективными, антикоагулянтными и противоопухолевыми свойствами [4]. На основании способности АЦ существо-

вать в виде различно окрашенных форм разработан один из наиболее известных методов количественного определения АЦ – рН-дифференциальный метод [5, 6]. Европейская фармакопея и ГФ СССР XI изд. для анализа АЦ рекомендуют метод прямой спектрофотометрии. Разработана методика определения АЦ, предусматривающая измерение оптической плотности анализируемого раствора в спирте, содержащем 0,5% аммиака, на фоне раствора сравнения [4].

Содержание АЦ в плодах облепихи крушиновидной не нормируется. Кроме того, отсутствуют данные о влиянии различных способов консервации плодов на стабильность БАВ.

Цель работы – разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения суммы АЦ в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации.

Экспериментальная часть

Объект исследования – свежие и высушенные плоды дикорастущей облепихи крушиновидной, собранные в Воронежской области в период полного созревания. Сушку плодов производили при температуре 60°C до остаточной влажности не более 20%. Для экстракции АЦ из ЛРС в литературе рекомендованы различные экстрагенты [7–10].

Экстрагенты, рекомендованные для выделения антоцианов из растительного сырья:

- подкисленные спирто-водные растворы различной концентрации;
- спирто-водные растворы различной концентрации;
- вода очищенная;

- разведенная кислота хлористоводородная;
- 0,1 М водный раствор кислоты хлористоводородной;

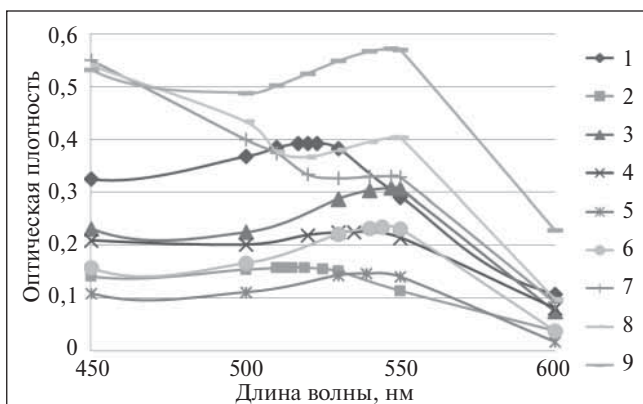


Рис. 1. Спектры поглощения извлечений из плодов облепихи крушиновидной: 1 – разведенная кислота хлористоводородная; 2 – 1% водный раствор кислоты хлористоводородной; 3 – 70% подкисленный спирт; 4 – 40% подкисленный спирт; 5 – 50% подкисленный спирт; 6 – 60% подкисленный спирт; 7 – 95% подкисленный спирт; 8 – 90% подкисленный спирт; 9 – 80% подкисленный спирт

- 1% водный раствор кислоты хлористоводородной;
- 10% водный раствор кислоты муравьиной.

При использовании в качестве экстрагентов воды очищенной, спирто-водных растворов различной концентрации, 10% водного раствора кислоты муравьиной и 0,1 М водного раствора кислоты хлористоводородной в спектре извлечений из плодов облепихи отсутствовал максимум в диапазоне 510–550 нм, характерный для АЦ. Использование подкисленных кислотой хлористоводородной экстрагентов давало положительный результат: в исследуемой области спектра появлялся специфический максимум (рис. 1), свидетельствующий о наличии в плодах восстановленных форм – лейкоантоцианов, бесцветных предшественников АЦ, присутствующих во многих растениях, переходящих под действием хлористоводородной кислоты в АЦ даже в отсутствии кислорода. Этот максимум хорошо выражен, находится в области спектра, где имеют поглощение только окрашенные соединения и может рассматриваться как специфичный, принадлежащий присутствующим в извлечении веществам антоциановой природы, а значит, пригодный для их качественного и количественного определения в плодах облепихи крушиновидной.

Для установления полноты экстракции АЦ из плодов облепихи крушиновидной изучали влияние соотношения сырья и экстрагента, температуры и кратности экстракции, а также оптимального времени экстракции. Показано, что максимальное извлечение АЦ достигается при соотношении сырья и экстрагента 1:100 (табл. 1).

В ходе эксперимента было установлено, что повышение кратности экстракции сопровождалось снижением выхода АЦ из сырья в извлечение по сравнению с однократной экстракцией (рис. 2). По-видимому, это связано со снижением времени контакта сырья с растворителем. Экстракцию следует проводить при температуре кипения водяной бани, что сопровождается полным переходом лейкоантоцианов в АЦ. Экстракция при температурных режимах 20 ± 2 и 8 ± 2 °С приводила к получению извлечений, не имеющих максимума в интервале 500–600 нм. Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 180 мин (рис. 3). Полярность экстрагента существенно влияла на выход АЦ из исследуемого сырья (табл. 2). На основании полученных данных оптимальным экстрагентом можно считать 80% этанол, подкисленный HCl [11].

Методика количественного определения суммы АЦ в свежих плодах. Около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 80% подкисленного спирта. Колбу присоединяют к об-

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ СЫРЬЯ И ЭКСТРАГЕНТА НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ АЦ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

№	Соотношение сырья и экстрагента	Содержание АЦ, %
1	1:10	0,271±0,027
2	1:30	0,6335±0,064
3	1:50	1,081±0,108
4	1:100	1,709±0,171
5	1:125	1,582±0,158
6	1:150	1,567±0,157

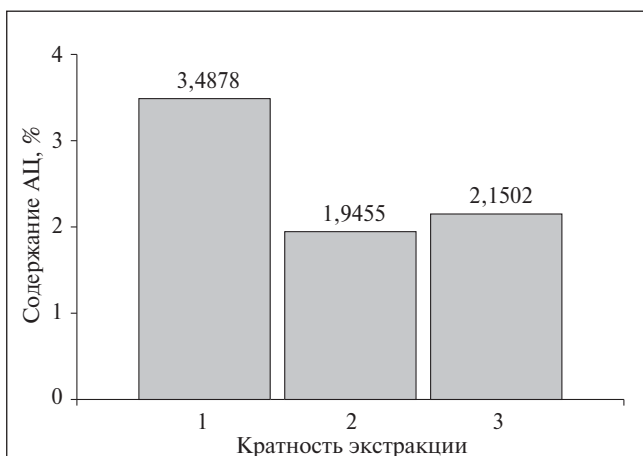


Рис. 2. Влияние кратности экстракции на выход антоцианов в извлечение

ратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 3 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым быстро охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Если требуется, доводят объем раствора до метки экстрагентом и перемешивают. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 548 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно использованного экстрагента. Содержание суммы АЦ в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 100}{m \cdot (100 - W)},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения цианидин-3-о-глюкозида, равный 100 при 548 ± 2 нм; m — масса сырья, г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Методика количественного определения суммы АЦ в высушенных плодах. Около 5,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 80% подкисленного спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 3 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым быстро охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, в мерную колбу вместимостью 100 мл. При необходимости доводят объем раствора до метки экстрагентом и перемешивают (раствор А). 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки экстрагентом (раствор Б). Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 548 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно использованного экстрагента. Содержание суммы АЦ в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 50 \cdot 25}{m \cdot (100 - W)}.$$

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что средняя ошибка с доверительной вероятностью 95% не превышала 5%, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики (табл. 3).

Чтобы предлагаемая аналитическая методика заняла достойное место в системе обеспечения качества, необходимо проведение про-

цедуры ее валидации. Так как валидация методик количественного определения БАВ для ЛРС, особенно — свежего, с высоким содержанием влаги, сопряжена со значительными трудностями, при проведении валидационных исследований были использованы высушенные плоды облепихи крушиновидной. Установлены такие характеристики разработанной методики, как предел определения, линейность и воспроизводимость. Содержание АЦ в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид в образцах ЛРС составило $0,477 \pm 0,016\%$ (принятое опорное значение).

Линейность определяли на 8 уровнях концентраций. Растворы готовили путем увеличения алик-

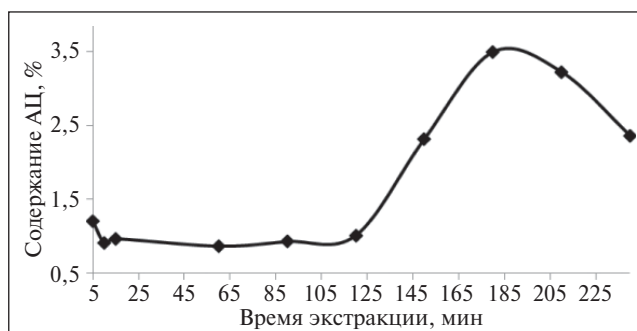


Рис. 3. Влияние времени экстракции на содержание антоцианов в извлечении

Таблица 2

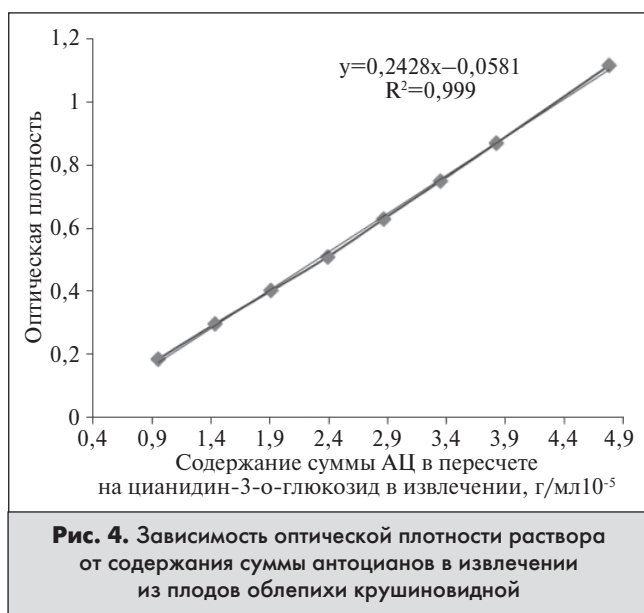
ВЛИЯНИЕ ПОЛЯРНОСТИ ЭКСТРАГЕНТА НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ АЦ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

№	Экстрагент	P по Снайтеру	Содержание АЦ, %
1	Подкисленный 40% спирто-водный раствор	7,48	0,316
2	Подкисленный 50% спирто-водный раствор	7,10	0,218
3	Подкисленный 60% спирто-водный раствор	6,72	0,336
4	Подкисленный 70% спирто-водный раствор	6,34	0,424
5	Подкисленный 80% спирто-водный раствор	5,96	1,765
6	Подкисленный 90% спирто-водный раствор	5,58	0,571
7	Подкисленный 96% спирто-водный раствор	5,20	0,489

Таблица 3

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА АНАЛИЗА (p=95%; n=9)

$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	$S_r, \%$	t(P,t)	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$	$\varepsilon, \%$
0,4773	0,0004327	0,0208	0,00693	4,36	2,36	0,04910	0,01636	3,43	10,28



воты по следующей схеме: аликвота раствора А от 0,50 до 5,0 мл – объем раствора Б 25,0 мл (от 25,0 до 250,0%). Критерий приемлемости – коэффициент корреляции не менее 0,999 (рис. 4). Другие характеристики линейности (наклон прямой, отрезок на оси ординат) приведены в табл. 4. Воспроизводимость методики определяли в условиях, при которых 6 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. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95%, вычисленные значения RSD – 4,36% и относительного доверительного интервала среднего значения – 2,08% не превышают критериев приемлемости – 5%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (см. табл. 4).

Таблица 4

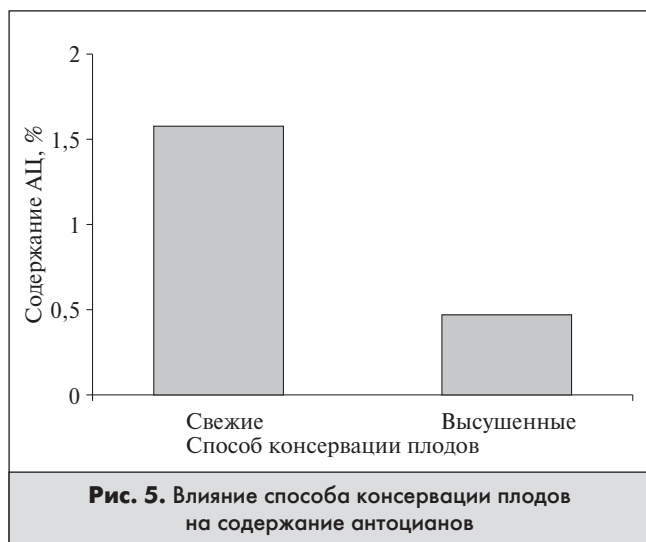
ВАЛИДАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ АЦ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

Характеристика	Статистические характеристики		Результаты
Линейность	Уравнение прямой		$y=0,2428x-0,0581$
	Наклон (а)		0,2428
	Отрезок на оси ординат b		0,0581
	Коэффициент корреляции		0,999
	Диапазон линейности (грамм АЦ в 1 мл извлечения)		$0,9562 - 4,7812 \cdot 10^{-5}$
Повторяемость	Проба	Оптическая плотность	Содержание АЦ, %
	1	0,402	0,491
	2	0,404	0,493
	3	0,394	0,481
	4	0,385	0,470
	5	0,383	0,467
	6	0,371	0,453
	7	0,363	0,443
	8	0,416	0,508
	9	0,402	0,491
	Наименьшее значение, %		0,443
	Наибольшее значение, %		0,508
	Среднее значение, %		0,477
Доверительный интервал (p=95%), %		$0,477 \pm 0,016$ $0,461 - 0,494$	
Стандартное отклонение, %		2,08	
Коэффициент вариации, %		4,36	
Предел определения, г/мл	Количество грамм АЦ в 1 мл извлечения		$0,4781 \cdot 10^{-5}$

С целью выбора оптимальных условий хранения плодов облепихи и исследования стабильности АЦ проводили количественное определение в свежих и высушенных плодах. Установлено, что содержание АЦ при высушивании значительно снижается, что связано с окислительными процессами при длительном контакте сырья с кислородом воздуха при воздействии повышенных температур (рис. 5). Количество АЦ в высушенных плодах составляло менее 30% от свежего сырья.

Выводы

1. Разработана методика спектрофотометрического определения содержания суммы антоцианов в плодах облепихи крушиновидной в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид.
2. Установлены валидационные характеристики разработанной методики (предел определения, линейность и воспроизводимость). Показано, что методика валидна и пригодна для стандартизации сырья.
3. Определено содержание антоцианов в свежих и высушенных плодах облепихи.



ЛИТЕРАТУРА

1. Золотарева А.М. Основы ресурсосберегающей технологии переработки биомассы *Hippophae rhamnoides* L. Автореф. докт. техн. наук. Улан-Удэ, 2004. 32.
2. Золотарева А.М., Чиркина Т.Ф., Гончикова С.Д., Карпенко Л.Д. Химический состав облепихового шрота. Изв. вузов. Пищевая технология, 1994; 1–2: 24–26.

3. Карпова Е.А. Изменчивость биохимического состава плодов облепихи крушиновидной при интродукции в лесостепь Западной Сибири. Автореф. канд. техн. наук. Новосибирск, 1999; 25.
4. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Куркина А.В., Егорова А.В. Разработка методики определения антоцианов в лекарственном растительном сырье. Фармация, 2014; 4: 17–20.
5. ГОСТ Р 53773-2010. Продукция соковая. Методы определения антоцианов.
6. Sabir S.M., Magsood H., Hayat Imran et al. Elemental and nutritional analysis of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*) Berries of Pakistani Origin. J. Med. Food, 2005; 8 (4): 518–522.
7. Андреева В.Ю., Калинкина Г.И., Коломиец Н.Э., Исайкина Н.В. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной. Фармация, 2013; 3: 19–21.
8. Брежнева Т.А., Логвинова Е.Е., Сливкин А.И., Тарабрина В.Н. Спектральные характеристики антоциановых соединений плодов рябины черноплодной. Вестник ВГУ. Сер. Химия, Биология. Фармация, 2013; 2: 76–179.
9. Ломова Т.С. Новые решения в хроматографическом и фотометрическом анализе антоциановых пигментов из растительного сырья. Автореф. канд. хим. наук. Воронеж, 2007; 23.
10. Рязанова Т.К. Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной. Фундаментальные исследования, 2013; 8: 1136–1140.
11. Тринева О.В., Казьмина М.А., Сливкин А.И. Исследование спектральных характеристик антоциановых соединений плодов облепихи крушиновидной. Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология. Фармация, 2014; 3: 118–122.

Поступила 5 февраля 2015 г.

DETERMINATION OF A PROCEDURE FOR QUANTIFICATION OF ANTHOCYANS IN SEA BUCKTHORN (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES*) FRUITS

O.V. Trineeva¹, PhD; Professor A.I. Slivkin¹, PhD; Professor I.A. Samylina², PhD; M.A. Kazmina¹

¹Voronezh State University; 1, Universtitetskaya Square, Voronezh 394006, Russia

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

SUMMARY

Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruits are a valuable source of biologically active substances. Anthocyanins, the content of which is not standardized, are present in the sea buckthorn fruits. The authors developed and validated a procedure for the spectrophotometric quantification of the sum of anthocyanins in the sea buckthorn fruits, calculated with reference to cyanidin-3-O-glucoside. Optimal conditions for the extraction of anthocyanins from the sea buckthorn fruits were determined. The impact of a raw material/reagent ratio, the temperature and frequency of extraction and polarity of a reagent, as well as the impact of the optimal time of extraction of anthocyanins to yield were studied. The content of anthocyanins in the fruits on drying was established to considerably decrease and amount to less than 30% of the fresh raw material. The validation characteristics of the developed procedure were identified, according to which the latter was valid and suitable for standardization.

Key words: sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides* L., fruits, contents, spectrometry, validation.

REFERENCES

1. Zolotareva A.M. Basics resource-saving technology of biomass *Hippophae rhamnoides* L. Author. Doctor. tehn. n. Ulan-Ude, 2004; 32 (in Russian).
2. Zolotareva A.M., Chirkina T.F., Gonchikova S.D., Karpenko L.D. The chemical composition of sea buckthorn meal. Math. universities. Food technology, 1994; 1–2: 24–26 (in Russian).
3. Karpova E.A. Variability of the biochemical composition of fruits of sea buckthorn with the introduction of forest-steppe of Western Siberia. Author. cand. tehn. n. Novosibirsk, 1999; 25 (in Russian).
4. Kurkin V.A., Ryzanov T.K., Kurkina A.V., Egorov A.V. Development of methods for determining anthocyanin in medicinal herbs. Farmatsiya, 2014; 4: 17–20 (in Russian).
5. State standard 53773-2010. Products juices. Methods for determination of anthocyanins (in Russian).
6. Sabir S.M., Magsood H., Hayat Imran et al. Elemental and nutritional analysis of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *Turkestanica*) Berries of Pakistani Origin. J. Med. Food., 2005; 8 (4): 518–522.
7. Andreeva V.Yu., Kalinkina G.I., Kolomiec N.E., Isaykina N.V. Method of determination of anthocyanins in the fruit chokeberry Aronia. Farmatsiya, 2013; 3: 19–21 (in Russian).
8. Brezhneva T.A., Logvinova E.E., Slivkin A.I., Tarabrina V.N. Spectral characteristics of anthocyanin compounds black chokeberry fruits. Herald of the Voronezh State University, Ser. Chemistry, Biology, Farmatsiya, 2013; 2: 176–179 (in Russian).
9. Lomova T.S. New solutions in chromatographic and photometric analysis of anthocyanin pigments from plants. Author. cand. chem. sciences. Voronezh, 2007; 23 (in Russian).
10. Ryzanov T.K. Farmakognostichesky research fruits and shoots bilberry. Basic Research, 2013; 8: 1136–1140 (in Russian) (in Russian).
11. Trineeva O.V., Kazmina M.A., Slivkin A.I. Investigation of the spectral characteristics of anthocyanin-compounds sea buckthorn fruit-prominent. Herald of the Voronezh State University, Series: Chemistry, Biology, Farmatsiya, 2014; 3: 118–122 (in Russian).