

УДК 615.015.11.07.322:582.918:577.127.4

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИСТЬЕВ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ»

**Г.М. ЛАТЫПОВА<sup>1</sup>**  
**В.Н. БУБЕНЧИКОВА<sup>2</sup>**  
**З.Р. РОМАНОВА<sup>1</sup>**  
**Д.Ф. ГАЛИМОВА<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Башкирский государственный  
медицинский университет

<sup>2</sup> Курский государственный  
медицинский университет

e-mail: primula17@rambler.ru

Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета весеннего, основанная на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом.

Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости, специфичности, линейности.

Ключевые слова: листья первоцвета весеннего, методика количественного определения аскорбиновой кислоты.

Листья первоцвета весеннего (лекарственного) (*Primula veris* L., или *P. officinalis* (L.) Hill.), семейства первоцветных (*Primulaceae*) разрешены к применению в качестве поливитаминного пищевого растительного сырья [4]. Существующая отечественная нормативная документация (НД) на листья первоцвета весеннего (ГОСТ 3166-76) оценивает качество сырья по содержанию аскорбиновой кислоты и числовых показателей: влажности, массовой доли общей золы, массовой доли других частей растения и посторонних примесей [2]. ГОСТ 3166-76 предусматривает количественное определение аскорбиновой кислоты титриметрическим методом с использованием 0,001 н раствора 2,6-дихлофенолиндофенолята натрия в кислой среде. Данная методика затрудняет определение аскорбиновой кислоты в связи со сложностью фиксирования точки перехода окраски титранта из-за собственного окрашивания водного извлечения из сырья. Поэтому для количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета весеннего нами разработана спектрофотометрическая методика, основанная на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом, который показал близкие результаты определения в сравнении с титриметрическим методом [3, 5, 6].

**Экспериментальная часть.** Для разработки методики использовали листья первоцвета весеннего, заготовленные в Курской, Белгородской областях России и в некоторых районах республики Башкортостан.

Определение оптимальных условий экстракции кислоты аскорбиновой из листьев первоцвета проводили на одном образце сырья.

При разработке методики изучены и определены оптимальные условия экстракции аскорбиновой кислоты из листьев первоцвета: степень измельчения сырья – 1 мм, экстрагент – 40% спирт этиловый, нагревание на кипящей водяной бане – 30 мин., соотношение сырье-экстрагент – 1:100. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышала 4,48 %.

**Методика количественного определения кислоты аскорбиновой.** Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 40% раствора спирта этилового, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на водяной бане в течение 30 мин. Экстракцию 40% спиртом этиловым повторяли еще два раза по 50 мл в течение 30 мин каждый раз. Полученные извлечения объединяли, фильтровали через бумажный фильтр (раствор А). В колбу вместимостью 50 мл помещали 20 мл



раствора А, прибавляли 20 мл 96% спирта этилового, перемешивали и через 10 мин фильтровали через бумажный фильтр (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мл раствора Б и доводили объем раствора до метки, перемешивали (раствор В).

В три колбы вместимостью по 50 мл помещали: в первую 10 мл раствора В, во вторую 10 мл раствора рабочего стандартного образца (РСО) кислоты аскорбиновой и в третью 10 мл воды. В каждую колбу прибавляли по 10 мл раствора натрия фосфорномолибдата, нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 мин и быстро охлаждали под струей холодной воды. Оптическую плотность испытуемого раствора (колба 1) и раствора РСО кислоты аскорбиновой (колба 2) измеряли на спектрофотометре при длине волны 730 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор из третьей колбы.

Содержание кислоты аскорбиновой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 150 \cdot 40 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 20 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора стандартного образца (РСО) кислоты аскорбиновой; m – масса сырья в граммах; m<sub>0</sub> – масса РСО кислоты аскорбиновой в граммах; W – влажность сырья в процентах.

**Приготовление раствора РСО кислоты аскорбиновой.** В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали около 0,05 г (точная навеска) кислоты аскорбиновой (ФС 42-2668-95), высушенной до постоянной массы при температуре от 100° до 105° С, растворяли в 30 мл воды, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 1). Срок годности раствора 1–3 суток.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5 мл раствора 1, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 2). Раствор использовали свежеприготовленным.

**Приготовление раствора натрия фосфорномолибдата.** В мерную колбу вместимостью 200 мл помещали 0,05 г натрия фосфата двузамещенного (ГОСТ 4172-76), растворяли в 100 мл воды, прибавляли 10 мл кислоты серной концентрированной, 50 мл воды и 0,8 г аммония молибдата. Объем раствора доводили водой до метки и тщательно перемешивали. Срок годности раствора – 3 месяца.

Таблица 1

### Результаты анализа модельных смесей с РСО кислоты аскорбиновой

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси (кислота аскорбиновая), мг	Экспериментально найденное значение (кислота аскорбиновая)	
		абсолютная величина, мг	процент восстановления, %
1	9,00	9,08	100,89
2	9,00	9,16	101,78
3	9,00	8,94	99,33
4	12,00	11,8	98,33
5	12,00	11,89	99,08
6	12,00	11,91	99,25
7	15,00	14,86	99,07
8	15,00	15,07	100,47
9	15,00	14,81	98,73
Средний процент восстановления для 3 концентраций в трех повторностях			99,66



Валидацию методики проводили методом математической статистики по показателям: правильность, прецизионность, специфичность [1].

Правильность методики устанавливали на модельных смесях с РСО кислоты аскорбиновой. Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием кислоты аскорбиновой в % к исходной концентрации 75, 100, 125. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации (табл. 1).

Полученный средний процент восстановления для трех концентраций в трех повторностях составил 99,66, что соответствует критериям приемлемости (100±2%).

Таблица 2

**Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)**

Содержание кислоты аскорбиновой в аликвоте, мкг	Добавлено РСО кислоты аскорбиновой, мкг	Ожидаемое содержание, мкг	Полученное содержание, мкг	Ошибка, %	
				абс., мкг	отн., %
421,47	50	471,47	475,12	+ 3,65	0,77
421,47	50	471,47	473,90	+ 2,43	0,52
421,47	50	471,47	466,87	-4,60	0,98
421,47	100	521,47	518,67	+2,80	0,54
421,47	100	521,47	529,19	+7,72	1,48
421,47	100	521,47	530,56	+9,09	1,74
421,47	150	571,47	563,18	-8,29	1,45
421,47	150	571,47	582,19	+10,72	1,88
421,47	150	571,47	560,89	-10,58	1,85

Достоверность методики определения подтверждена опытами с добавками РСО кислоты аскорбиновой. Испытание проводилось на одном образце листьев первоцвета весеннего в 3 концентрациях с добавками РСО кислоты аскорбиновой в трех повторностях (табл. 2).

Таблица 3

**Результаты количественного определения кислоты аскорбиновой в разные дни**

Образец №	Содержание кислоты аскорбиновой, %	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %
1-й день			
1	2,54		
2	2,58		
3	2,47		
4	2,49		
5	2,55		
6	2,59		
среднее	2,54	0,04806	1,89
2-й день			
1	2,57		
2	2,63		
3	2,61		
4	2,55		
5	2,52		
6	2,65		
среднее	2,59	0,04494	1,74



Относительная ошибка опытов с добавками находилась в пределах случайной ошибки предложенных методик, что свидетельствует об отсутствии ошибки систематической.

Испытания прецизионности (сходимости) проводились в разные дни одним и тем же специалистом на одном образце сырья листьев первоцвета весеннего в шести повторностях с использованием спектрофотометра «СФ-46» (табл. 3).

Относительное стандартное отклонение RSD не превысило 2 %.

Воспроизводимость методики количественного определения проводилась на одном образце листьев первоцвета весеннего в двух лабораториях на приборах «СФ-46» и «СФ-26» в шести повторностях (табл. 4).

Таблица 4

**Результаты количественного определения  
кислоты аскорбиновой в разных лабораториях**

Истинное значение определяемой величины			
образец №	содержание кислоты аскорбиновой, %	стандартное отклонение S	относительное стандартное отклонение RSD, %
Лаборатория № 1			
1	2,61		
2	2,65		
3	2,58		
4	2,59		
5	2,64		
6	2,71		
среднее	2,63	0,04775	1,82
Лаборатория № 2			
1	2,72		
2	2,69		
3	2,76		
4	2,70		
5	2,67		
6	2,79		
среднее	2,72	0,04538	1,67

Относительное стандартное отклонение RSD не превысило 3 %.

Специфичность определялась визуально – отсутствие отклика при отсутствии анализируемого вещества. При прибавлении дистиллированной воды (вместо раствора кислоты аскорбиновой) к раствору натрия фосфорномолибдата и нагревании на кипящей водяной бане в течение 10 мин синего окрашивания не наблюдалось.

Линейность методики исследовали в диапазоне концентраций PCO кислоты аскорбиновой от 80 до 120% от теоретического содержания кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего (табл. 5, рис.).

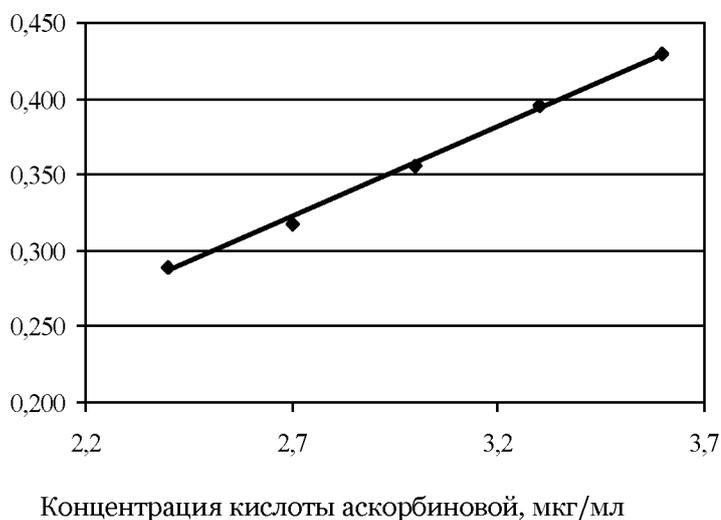
Установлено, что требования к параметрам линейной зависимости выполняются, т.е. линейность методики определяется в диапазоне концентраций от 80 до 120% от теоретического содержания кислоты аскорбиновой. Коэффициент корреляции составляет 0,99889.

Таблица 5

**Результаты определения линейности валидируемой методики**

Оптическая плотность, D	Концентрация кислоты аскорбиновой, мкг/мл	Коэффициент корреляции	y = b·x + a	
			b	a
0,289	2,4	0,99889	0,107	0,0292
0,318	2,7			
0,356	3,0			
0,395	3,3			
0,429	3,6			

**D**



*Рис.* Линейная зависимость оптической плотности раствора от концентрации кислоты аскорбиновой ( D – оптическая плотность)

С помощью данной методики было проанализировано 5 партий сырья по 5 образцов в каждой (табл. 6).

Таблица 6

**Метрологическая характеристика метода количественного определения кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего**

№ п/п	n	x ср.	S <sup>2</sup>	S	P, %	t (P,f)	Δx	E отн., %
1	5	2,12	0,00115	0,034	95	2,78	0,095	4,48
2	5	3,64	0,0005	0,022	95	2,78	0,061	1,67
3	5	2,54	0,00093	0,0305	95	2,78	0,084	3,36
4	5	2,03	0,00088	0,0296	95	2,78	0,082	4,04
5	5	2,09	0,00102	0,0319	95	2,78	0,089	4,26



Данные количественного определения показали, что в листьях первоцвета весеннего содержание аскорбиновой кислоты колеблется от 1,80 до 3,65%.

Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 4,48%.

В результате проведенных исследований стабильности листьев первоцвета весеннего при хранении (в течение 3 лет) рекомендуем установить норму содержания аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета не менее 0,5% [5].

Полученные результаты включены в проект ФС «Первоцвета листья».

#### **Выводы.**

1. Разработана методика количественного определения кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего.

2. Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости, специфичности, линейности.

#### **Литература**

1. Аладышева, Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляева, В.В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9-14.
2. ГОСТ 3166-76. Листья первоцвета весеннего. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт. – Взамен ГОСТ 3166-46; Введ. 01.07.1977. – М., 1977. – С. 51-53.
3. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.
4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Раеoniaceae – Thimelaeaceae / отв. ред. П.Д. Соколов. – Л. : Наука, 1986. – С. 175-176.
5. Романова, З.Р. Фармакогностическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного : дис. ... канд. фарм. наук / З.Р. Романова. – Курск, 2010. – 138 с.
6. ТУ 9161-037-46865780-03. БАД таблетки «Виратон», рег. уд. 77.99.02.916.Б.000641.0803.

## **STANDARTIZATION OF PRIMULA OFFICINALIS LEAVES ACCORDING TO THE INDICATOR «ASCORBIC ACID CONTENT»**

**G.M. LATYPOVA**<sup>1</sup>

**V.N. BUBENCHIKOVA**<sup>2</sup>

**Z.R. ROMANOVA**<sup>1</sup>

**D.F. GALIMOVA**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Bashkir State Medical University, Ufa*

<sup>2</sup> *Kursk State Medical University*

*e-mail: primula17@rambler.ru*

Spectrophotometric technique for quantitative determination of ascorbic acid in the leaves of *Primula officinalis* based on the colour reaction of ascorbic acid with phosphoro-molybdenum complex has been developed. Validation of the technique according to such indications as correctness, similarity, reproducibility linearity, specificity has been performed.

Key words: leaves of *Primula officinalis*, the technique for quantitative determination of ascorbic acid.