

М. В. Гаврилин, О. М. Маркова, Т. Т. Лихота, Е. А. Измайлова

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В МАСЛЕ ИЗ ПЛОДОВ КАЛИНЫ

ГОУ ВПО Пятигорская государственная фармацевтическая академия

В связи с перспективностью использования масла из плодов калины в качестве лекарственного средства проведены исследования по оптимизации методик определения суммы каротиноидов и α -токоферола в масле. Для определения суммы каротиноидов выбран метод спектрофотометрии, линейная зависимость оптической плотности от концентрации находится в области 1 – 6 мкг/мл. Содержание суммы каротиноидов составляет 60 – 200 мг%. Для определения содержания α -токоферола использован метод ВЭЖХ, после предварительного омыления. Установлено, что содержание α -токоферола в масле составляет 150 – 310 мг%.

Масло из плодов калины в настоящее время рассматривается как новое лекарственное средство или биологически активная добавка к пище (в зависимости от дозировки), хорошие перспективы масло калины имеет в дерматокосметологии. Биологическая ценность масла определяется широким набором биологически активных компонентов, среди которых каротиноиды, витамин Е, фосфолипиды. Из непредельных углеводов следует отметить сквален. В витаминном комплексе масла калины можно выделить α -токоферол, содержание которого достигает 0,5 % и более.

В связи с перспективностью применения масла калины в медицинской практике целесообразно разработать методику определения α -токоферола с использованием метода ВЭЖХ, а также оптимизировать методику определения суммы каротиноидов методом спектрофотометрии.

Предварительно были экспериментально апробированы методы определения, описанные в литературе [1, 2]. Все предложенные способы анализа основаны на предварительном омылении масла водным или спиртовым раствором калия гидроксида. Нами однако было экспериментально установлено, что при использовании водного раствора калия гидроксида (вне зависимости от концентрации) полного омыления масла не происходит. В нормативной документации на препарат “тыквеол” для омыления навески масла около 2,5 г рекомендуется использовать 50 мл спиртового раствора калия гидроксида с концентрацией 200 г/л. Затем для экстракции неомыляемой фракции и соответственно α -токоферола используется эфир диэтиловый. Для предотвращения окисления витамина Е рекомендуется добавлять кислоту аскорбиновую.

Экспериментальная проверка методики показала, что в случае применения эфира диэтилового в указанных в НД количествах полного разделения слоев не происхо-

дит, лишь увеличение порций эфира до 100 мл приводит к разделению слоев, но и в этом случае следует избегать интенсивного перемешивания содержимого делительной воронки. Экспериментально было установлено, что использование этилацетата (порции по 50 мл) позволяет значительно сократить время на разделение слоев. Наиболее быстро можно проводить экстракцию, применяя в качестве экстрагента гексан. С использованием этих растворителей было проведено количественное определение α -токоферола в одном образце масла, полученного на ЗАО “Алтайвитамины” путем экстракции фреоном-22. Для анализа полученные извлечения промывали водой до нейтральной реакции по универсальному индикатору, затем упаривали при температуре 60 °С до остатка в 5 – 7 мл, раствор которого в спирте этиловом количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, а затем им же доводили до метки. После перемешивания 5 мкл данного раствора хроматографировали на жидкостном хроматографе Милихром-5 с колонкой 2 × 80 или Милихром А-02, заполненной нуклеосил С-18. В качестве подвижной фазы использовали 90 % этанол, длина волны детектирования составляла 292 нм (хроматограммы представлены на рисунке).

Как следует из представленных результатов (табл. 1), экстракция гексаном не позволяет провести полное извлечение α -токоферола из омыленного раствора. Значительно более эффективным представляется использование эфира или этилацетата. Однако в этих случаях наблюдался значительный разброс результатов. В ходе выполнения исследований было высказано предположение, что неполная экстракция обусловлена тем, что из спирто-водного раствора не происходит полного перехода в более неполярную фазу α -токоферола. Поэтому целесообраз-

Т а б л и ц а 1
Результаты количественного определения α -токоферола в масле калины, мг %

№	Эфир диэтиловый	Этилацетат	Гексан
1	119,01	121,62	71,63
2	109,06	127,93	71,84
3	99,5	109,42	72,95

Т а б л и ц а 2
Результаты количественного определения α -токоферола (мг/%)

№ серии	Найдено, мг%	Метрологические характеристики
040303	214,03	$\bar{X} = 215,22$ мг/% $S_x = 0,8042$ $\Delta\bar{X} = 2,0668$ $\varepsilon\% = \pm 0,96$ %
	218,02	
	215,97	
	216,21	
	212,32	
	214,78	

Таблица 3
Результаты количественного определения α -токоферола (мг/%) в масле калины (серия 040303)

Навеска масла калины, г	Найдено α -токоферола, мг%
1,6443	217,2
1,5212	220,4
1,8052	214,0
2,6340	215,2
2,5812	215,8
2,6884	218,0
5,0315	213,5
4,8996	216,8
4,8056	220,6

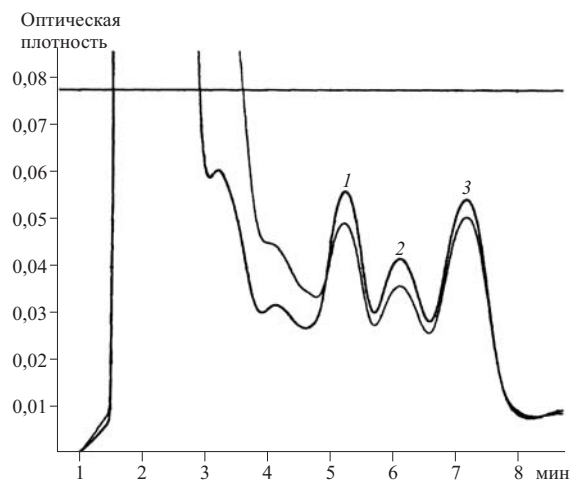
ным можно считать удаление спирта из омыленного раствора. С этой целью смесь после омыления переносили в фарфоровую чашку, колбу дополнительно промывали 20 мл этилацетата, затем полученные растворы объединяли и упаривали на водяной бане при температуре 80 °С до остатка 5 – 10 мл. После этого без охлаждения к остатку добавляли 100 мл воды, перемешивали и переносили в делительную воронку и после охлаждения экстрагировали 3 порциями этилацетата по 20 мл. Объединенные извлечения промывали водой до нейтральной реакции по универсальному индикатору. Объем полученного извлечения составлял 40 – 45 мл. Приготовленный таким образом раствор переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки спиртом этиловым, что позволило получить гомогенный раствор и исключить необходимость обработки раствора безводным натрием сульфатом. Пробу данного раствора в количестве 5 мкл хроматографировали при описанных выше условиях, полученные результаты представлены в табл. 2.

Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает $\pm 1,0\%$ (табл. 2). Отсутствие систематической ошибки анализа подтверждено опытами с добавками СО α -токоферола ацетата (табл. 3).

При проведении исследований было установлено, что добавление кислоты аскорбиновой не оказывает влияние на стабильность суммы токоферолов, так как при кипячении кислоты аскорбиновой в среде спиртового раствора калия гидроксида происходит ее полное разрушение в течение 1 – 2 мин. В связи с этим для предотвращения разрушения токоферолов было признано целесообразным добавление 0,5 г бутилокситолуола.

Таблица 4
Результаты количественного ВЭЖХ определения α -токоферола в масле калины (серия 040303) методом добавок

Добавлено α -токоферола к 100 г масла, мг	Должно быть найдено с добавкой, мг%	Найдено α -токоферола, мг%	Абсолютное отклонение, мг%	Относительное отклонение, %
–	215,22	215,22		
32,05	247,27	247,90	+0,63	0,25
66,20	281,42	280,01	–1,41	0,50
94,24	309,46	306,58	–2,88	0,93
123,3	338,52	335,52	–3,00	0,89
161,2	376,42	377,21	+0,72	0,20



Хроматограмма неомыляемой фракции масла калины. Пик 1 — γ -токоферол; 2 — β -токоферол; 3 — α -токоферол

Параллельно в этих же условиях проводили омыление и экстракцию эфиром диэтиловым навески СО α -токоферола ацетата и устанавливали область концентраций при которых наблюдается линейная зависимость между площадью пика и его количеством. Как следует из полученных данных, линейность калибровочного графика соблюдается для количества α -токоферола от 2 до 8 мкг.

Для расчета содержания α -токоферола в масле использовали метод абсолютной калибровки. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Для оценки правильности методики проводили определение α -токоферола на 3 уровнях концентраций в пределе аналитической области. Параллельно выполняли анализ спектрофотометрическим методом. Полученные результаты представлены в табл. 4.

Результаты определения с использованием предлагаемой методики в 5 сериях масла калины, выработанного из сырья других партий, показали, что содержание α -токоферола составляет от 150,1 до 310,2 мг%.

В разработанных условиях эффективность колонки, рассчитанная по пику α -токоферола, должна быть не менее 800 теоретических тарелок, коэффициент разделения основного пика от ближайшего к нему должен быть не менее 1,1.

Количественное определение суммы каротиноидов целесообразно проводить спектрофотометрическим методом по собственному поглощению каротиноидов в видимой области спектра (λ_{\max} 451 нм) с использованием удельного показателя поглощения β -каротина.

Сопряженные двойные связи каротиноидов, содержащие атомы с неподеленной парой электронов, имеют си-

Таблица 5
Результаты количественного определения суммы каротиноидов (мг/%) в масле калины

№ серии	Найдено, мг%	Метрологические характеристики
010102	162,2	$\bar{X} = 160,1$ мг%
	157,6	$S_X = 1,978$
	160,0	$S_{\bar{X}} = 0,808$
	158,2	$\Delta\bar{X} = 2,1$
	160,0	$\varepsilon = \pm 1,30\%$
	162,4	

Таблица 6
Результаты количественного определения суммы каротиноидов (мг/%) в масле калины (серия 010102)

Навеска масла калины, г	Найдено каротиноидов, мг%
0,02235	157,2
0,02900	159,0
0,0258	160,4
0,0574	158,2
0,0510	161,0
0,05195	161,1
0,11975	162,5
0,1390	161,8
0,1448	162,6

льное поглощение в видимой области спектра и менее выраженный максимум поглощения в УФ-области. Интенсивность и положение соответствующих максимумов зависит от длины цепи сопряжения: чем цепь длиннее, тем при большей длине волны происходит поглощение света и тем выше интенсивность поглощения. Спектральные характеристики бета-каротина и ликопина связаны с влиянием растворителей. В растворах за счет межмолекулярных взаимодействий происходит изменение в состоянии электронов молекул. Это приводит к смещению полос поглощения в разных растворителях. Для бета-каротина основные максимумы поглощения в гексане находятся при длинах волн 450 ± 2 и 478 ± 2 нм, в циклогексане — при 453 и 481 нм, в хлороформе — при 466 и 497 нм. Ликопин имеет три максимума поглощения в гексане — при 446, 474 и 506 нм. Ряд авторов [3] установили, что с увеличением полярности растворителя наблюдается bathochromный сдвиг максимумов поглощения и некоторое уменьшение экстинкции.

Для проведения количественного определения суммы каротиноидов в качестве растворителя был выбран гексан, так как каротиноиды в нем легко растворимы. Кроме того, из данных литературы известно, что наилучшая разрешенность спектров поглощения и наиболее высокие значения коэффициента удельного поглощения отмечены в гексане (при длине волны 451 нм он составляет 2590).

Построение калибровочного графика СО β -каротина проводили по методике: около 0,05 г (точная навеска) СО β -каротина (ФС 42-3867-99) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл гексана и доводили объем раствора тем же растворителем до метки (раствор А). 5 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора тем же

Таблица 7
Результаты количественного определения суммы каротиноидов в масле калины (серия 010102) методом добавок

Добавлено β -каротина, мг на 100 г масла	Должно быть суммы каротиноидов с добавкой, мг%	Найдено суммы каротиноидов с добавкой, мг%	Абсолютное отклонение, мг%	Относительное отклонение, %
—	159,2	159,2		
36,4	195,6	197,5	+1,9	0,97
72,8	232,4	230,6	-1,8	0,77
109,2	268,4	270,4	+2,0	0,75
145,6	304,8	307,6	+2,8	0,92
182,0	341,2	344,3	+3,1	0,91

растворителем до метки (раствор Б). В мерные колбы вместимостью 100 мл вносили по 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл раствора Б и доводили объем раствора гексаном до метки (растворы В).

Измеряли оптическую плотность растворов В на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 451 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали гексан.

Установлено, что в интервале оптимальных для работы значений оптической плотности соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации β -каротина.

Результаты количественного определения суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин в масле калины представлены в табл. 5. Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает $\pm 1,30$ %. Для оценки правильности методики проводили определение каротиноидов на 3 уровнях концентраций в пределе аналитической области. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Отсутствие систематической ошибки подтверждено опытами с добавками СО β -каротина (табл. 7).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Н. Скурихин, С. В. Шабаев, *Методы анализа витаминов А, Е, D и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства*, Справ. изд. Химия, Москва (1996).
2. Л. В. Прохорова, Н. П. Антонова, В. В. Шелестова и др., *Разработка унифицированных методик анализа и стандартизации лекарственных препаратов на основе "Тыквеола"*, *Материалы VI Международного съезда*, Санкт-Петербург (2002), сс. 291 – 294.
3. В. В. Шелестова, *Дис. канд. фарм. наук.*, Москва (2002).

Поступила 28.02.05

OPTIMIZATION OF THE PROCEDURE OF VITAMIN DETERMINATION IN VIBURNUM OIL

M. V. Gavrillin, O. M. Markova, T. T. Likhota, and E. A. Izmailova

Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Russia

In connection with good prospects for the use of viburnum oil in medical practice, a method for the determination of α -tocopherol and total carotenoid content in this preparation has been developed and the optimum analytical conditions have been established. The total content of carotenoids is determined by spectrophotometry, which is linear in a range of concentrations from 1 to 6 $\mu\text{g/ml}$. The content of carotenoids in viburnum oil varies within 60 to 200 $\text{mg}\%$. The content of α -tocopherol is determined by HPLC after preliminary saponification. The content of α -tocopherol in the oil reaches 150 – 310 $\text{mg}\%$.