

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА СОКА МЯКОТИ ТЫКВЫ ПО КАЧЕСТВЕННОМУ И КОЛИЧЕСТВЕННОМУ СОДЕРЖАНИЮ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ, НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ВИТАМИНА В₂ – РИБОФЛАВИНА

ЛАНДИНА Людмила Николаевна

аспирант кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский
государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
г. Пятигорск, Россия

Качественно аскорбиновая кислота определяется с помощью метода тонкослойной хроматографии, количественно-титриметрически, при окислении ее раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до дегидроаскорбиновой кислоты с обесцвечиванием реактива. Никотиновая кислота определяется качественным анализом, подтверждающим факт наличия кислоты никотиновой в сухом экстракте сока мякоти тыквы. Были использованы две методики анализа: цветная реакция с бихроматом калия и тонкослойная хроматография. Рибофлавин определяется методом флюоресценции и ТСХ.

Ключевые слова: гидрофильная фракция, тонкослойная хроматография, флюоресценция, спектрофотометрия, титриметрия.

Методы анализа некоторых биологически активных веществ, содержащихся в растительном сырье – мякоти тыквы. Аскорбиновая кислота (витамин С) представляет собой γ -лактон-2,3-дегидро- α -гулоновую кислоту. Учитывая ее особое значение в лечении и профилактике различных заболеваний, а также то, что многие вещества фитокомплексов способны вступать во взаимодействие как с аскорбиновой кислотой, так и с реагентами, используемыми для ее определения, предлагается большое количество разнообразных методов анализа аскорбиновой кислоты, содержащейся в ЛРС, поливитаминных препаратах, пищевых продуктах [16, 8, 17]. Классификация методов:

I. Методы, основанные на окислительно-восстановительных свойствах аскорбиновой кислоты (химические-титриметрические).

Базируются на способности аскорбиновой кислоты, окисляясь, количественно восстанавливать ряд соединений: 2,6-дихлорфенолиндофенол, йод, метиловый голубой, хлорную ртуть, N-бромсукцинимид, окисное железо, другие соединения.

II. Методы, основанные на количественном образовании окрашенных продуктов ре-

акции:

– определение аскорбиновой кислоты с диазотированным 4-метокси-2-нитроанилином. Чувствительность – 0,5 мкг/мл.

– определение аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот с 2, 4-динитрофенилгидразином.

III. Флюорометрический метод.

Дегидроаскорбиновая кислота (но не восстановленная форма), конденсируясь с О-фенилендиамином, образует флюоресцирующее соединение – хиноксамин, обладающее максимальной флюоресценцией при длине волны возбуждающего света 350 нм. Флюоресценция излучаемого света находится в области 430 нм. Чувствительность реакции – 0,1 мкг/мл.

IV. Полярографический метод.

Основан на окислении аскорбиновой кислоты на ртутном капельном электроде.

V. Хроматография.

Используется в том случае, когда исследуемые объекты подвергались высушиванию, длительному нагреванию или когда они содержат большое количество сахаров и других мешающих анализу веществ.

В качестве растворителей наиболее часто используют следующие системы: бутанол –

уксусная кислота – вода (40:10:50), бутанол – этанол – боратный буфер (40:30:30), изопропанол – вода (70:30) + 2% раствор щавелевой кислоты, изопропанол – насыщенный раствор аммиака – вода (70:10:20), ацетонитрил – вода – ацетон – уксусная кислота (80:15:5:1,2).

Для проявления пятен на хроматограмме используются: 2,6-дихлорфенолиндофенол, аммиачный раствор нитрата серебра, пары йода. Пятна также различаются при облучении в УФ-свете.

Обнаружение и количественное определение никотиновой кислоты (β -пиридинкарбоновая кислота) в составе фитокомплекса или поливитаминной смеси представляет большие трудности, т.к. мешающими соединениями являются распространенные в этих объектах аскорбиновая кислота, лактат железа, рибофлавин.

Поэтому для определения подлинности наиболее часто применяются методы тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии [11; 15; 14]. ИК- и УФ-спектрофотометрические методы предлагаются для определения подлинности никотиновой кислоты в фармакопейной статье [19].

Также для определения никотиновой кислоты в составе поливитаминных объектов был предложен метод производной спектрофотометрии, основанный на математическом анализе полученных результатов [5; 12].

Интересными, но трудоемкими являются методы количественного определения никотиновой кислоты в технических водах с помощью ионообменной хроматографии и йодометрического титрования [7], но они не приемлемы для анализа поливитаминных объектов.

Наиболее распространенными методами количественного анализа никотиновой кислоты в поливитаминных объектах являются инструментальные – спектрофотометрия [1; 2; 3; 4]. Они основаны на общих реакциях пиридинового ядра. Под действием расщепляющего реагента раскрывается пиридиновое ядро с образованием глютаконового альдегида. Последний, конденсируясь с первичными и вторичными ароматическими аминами образует полиметиновый краситель,

чаще всего желто-оранжевого цвета. Особенностью метода является то, что перед спектрофотометрическим анализом необходимо адсорбционно-хроматографическое разделение поливитаминной смеси.

Из всех известных методов наиболее эффективным комплексным является газожидкостная хроматография (ГЖХ), позволяющая одновременно определить никотиновую кислоту в объекте как качественно, так и количественно [9].

Совсем недавно было предложено использование ионоселективных электродов для анализа лекарственных средств, содержащих никотиновую кислоту [13].

Важной характеристикой, позволяющей обнаружить витамин В₂-рибофлавин в водных растворах и экстрактах объекта, является желто-зеленая флюоресценция, свойственная только рибофлавинолу, но не продуктам его разложения – люмихрому и люмифлавинолу. Поэтому был предложен флуорометрический метод анализа рибофлавина [6].

Качественно обнаружить рибофлавин возможно также методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Силуфол» в системе растворителей ледяная уксусная кислота – ацетон – метанол – бензол (5:5:20:70), наблюдая пятна в ультрафиолетовом свете.

Для растворов нескольких лекарственных препаратов, содержащих рибофлавин, возможно применение спектрофотометрических и фотометрических методов анализа.

Согласно современным исследованиям, качественно определить витамин В₂-рибофлавин в составе нативного фитокомплекса возможно, используя реакцию восстановления рибофлавина водородом, выделяющимся при реакции цинка и соляной кислоты [10].

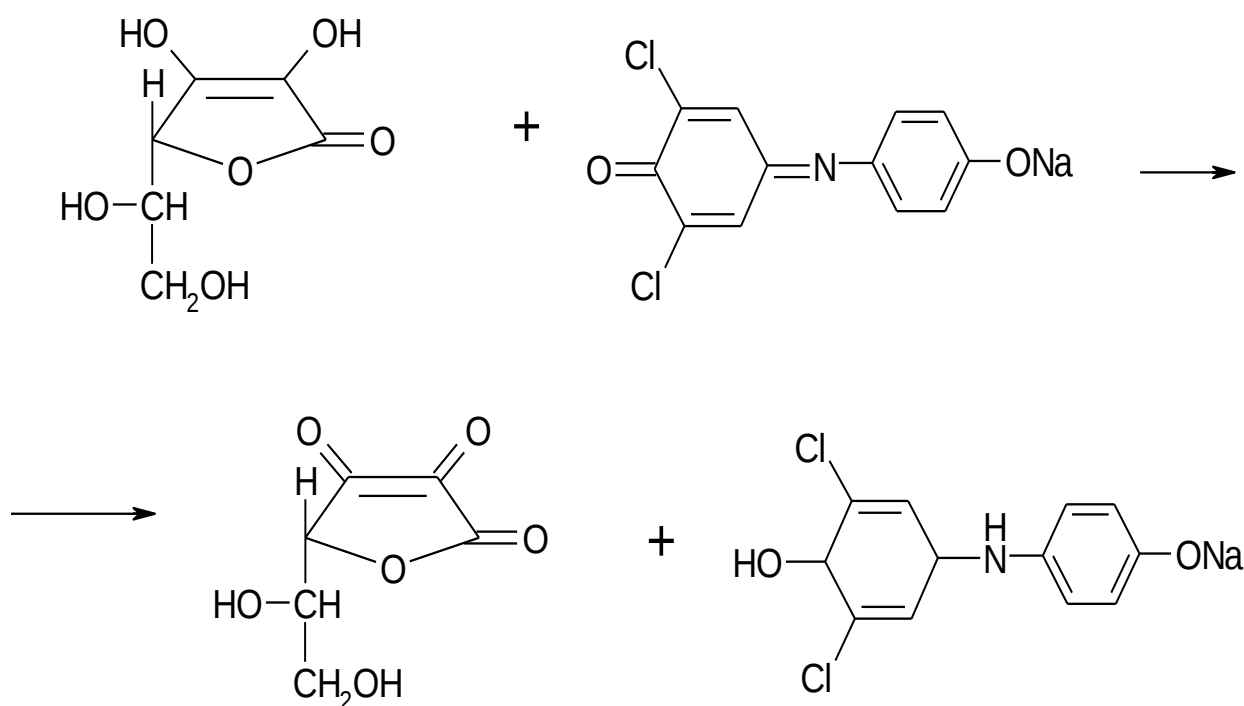
Количественное определение рибофлавина можно провести методом капиллярного электрофореза [18].

Стандартизация полученного сухого экстракта сока мякоти тыквы. Качественное определение аскорбиновой кислоты. Имеется несколько методов определения. Мы выбрали хроматографический метод (ТСХ). 0,05 г экстракта растворяли в 5 мл воды очищенной – получали раствор исследуемого образца.

В качестве раствора сравнения (свидетеля) использовали 1% раствор аскорбиновой кислоты. На хроматографическую пластинку «Силуфол» капилляром наносили исследуемый раствор и РСО. Пластинку помещали в хроматографическую камеру с системой растворителей этилацетат – ледяная уксусная кислота (80:20) и выдерживали до пробега растворителя примерно 13 см. Пятна аскорбиновой кислоты смотрели в УФ- свете. Пятна находились на одинаковом расстоянии от линии старта. Значение R_f составило 0,45. При отсутствии УФ- облучателя пластинку можно

обработать (опрыскать) 0,001н. Раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. В этом случае аскорбиновая кислота проявится в виде белого пятна на розовом фоне.

Определение количественного содержания аскорбиновой кислоты. Установление данного показателя мы проводили по методике определения количественного содержания кислоты аскорбиновой в плодах шиповника. Метод заключается в окислении аскорбиновой кислоты раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до дегидроаскорбиновой кислоты с обесцвечиванием реактива.



Около 10 г экстракта (точная навеска) растирали в ступке с 300 мл дистиллированной воды. После 10 минут настаивания и фильтрации 1 мл извлечения переносили в колбу вместимостью 100 мл, добавляли 1 мл 2% раствора хлористоводородной кислоты и 13 мл воды. Затем титровали 0,01М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30-60 с.

Расчет содержания кислоты аскорбиновой проводили по формуле:

$$X_{\%} = \frac{V \cdot 0.000088 \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

V – объем титранта, пошедшего на титрование, мл;

0,000088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия 0,01М, мл;

m – масса экстракта, взятого для анализа, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Обработанные данные представлены в таблице.

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ СОКА МЯКОТИ ТЫКВЫ

N	X _i , %	$\bar{X}$	X _i - $\bar{X}$	(X _i - $\bar{X}$) ²	S	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$\bar{\varepsilon}$, %
1	0,477	0,476	0,001	1,0·10 ⁻⁶	0,005	P=0,95 0,48±0,01	2,1
2	0,482		0,006	3,6·10 ⁻⁶			
3	0,473		-0,003	9,0·10 ⁻⁵			
4	0,470		-0,006	3,6·10 ⁻⁵			
5	0,481		0,005	2,5·10 ⁻⁵			
6	0,475		-0,001	1,0·10 ⁻⁶			

Обозначение результатов статистической обработки в таблицах следующие (включая промежуточные вычисления):

X_i – результат одного определения;

n – число определений;

f – число степеней свободы f=n-1;

$\bar{X}$ – среднее значение $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$

P – доверительная вероятность 0,95;

t (P, f) – критерий Стьюдента, при данных значениях равный 3,18;

S – стандартное отклонение

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{f}}$$

S² – величина дисперсии – мера воспроизводимости результатов

$$S^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{f}}$$

S _{$\bar{X}$} – стандартное отклонение среднего

результата $S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$

$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$ – граничные значения доверительного интервала среднего результата

$$\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = \bar{X} \pm \frac{t(p, f) \cdot S}{\sqrt{n}}$$

$\bar{\varepsilon}$ – относительная погрешность среднего

результата $\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100\%$

Результаты исследований показали, что в

сухом экстракте сока мякоти тыквы содержится аскорбиновая кислота в количестве 0,48±0,01%.

Определение никотиновой кислоты.

Количественное определение никотиновой кислоты представляется сложным в данных условиях – для этого необходима соответствующая аппаратура, т.к. наиболее эффективным методом является газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) [9]. Мы ограничились качественным анализом, подтверждающим факт наличия кислоты никотиновой в сухом экстракте сока мякоти тыквы, а следовательно и в самой мякоти.

Мы испытали две методики анализа: цветную реакцию и тонкослойную хроматографию (ТСХ).

Так как определению никотиновой кислоты в составе комплексов мешают аскорбиновая кислота, лактат железа и рибофлавин, то в присутствии указанных веществ мы произвели следующую реакцию. К испытуемой смеси (раствору 0,05 г экстракта в 5 мл воды) прибавили 2 капли 5% раствора бихромата калия, 5 капель 3% раствора перекиси водорода в ацетоне (1 мл пергидроля смешали с 9 мл ацетона), 1,5 мл хлороформа и тщательно встряхивали. К полученной смеси добавляли безводный сульфат натрия и обезвоженный раствор переносили в другую пробирку. Хлороформ при этом приобрел сине – лиловый оттенок.

Для качественного анализа кислоты никотиновой в составе экстракта сока мякоти тыквы методом ТСХ мы использовали следующую систему растворителей: ацетон – бензол – 25%-й раствор аммиака – спирт этиловый 95%

в соотношении 45:35:10:10 [11]. На пластинку «Силуфол» наносили испытуемый раствор и свидетель – 1% раствор никотиновой кислоты. Пластинку помещали в хроматографическую камеру на некоторое время. Пятна смотрели в УФ- свете. R_f составил 0,92.

Качественное определение витамина В₂ – рибофлавина. При растворении сухого экстракта сока мякоти тыквы в воде отмечалось желто-зеленое флюоресцирование раствора, усиливающееся при разбавлении, что дало основание предполагать наличие в анализируемом объекте рибофлавина.

Качественное определение проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

На пластинку «Силуфол» наносили водный раствор экстракта и свидетель – 1% раствор рибофлавина. В качестве системы растворителей использовали смесь: ледяная уксусная кислота – ацетон – спирт этиловый 95% – бензол (5:5:20:70). Пятна наблюдали в УФ- свете. R_f составил 0,75, что явно свидетельствует о наличии рибофлавина в исследуемом объекте.

Наиболее же точным способом качественного и количественного анализа рибофлавина в составе фитокомплексов и поливитаминной смеси служит флуорометрический метод, аппаратным обеспечением которого является флуориметр марки ЭФ-3МА [6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев А.М., Бейсенбеков С.А. Определение никотиновой кислоты и ее производных в промышленных препаратах // Химико-фармацевтический журнал. – 1971. – № 6. – С. 55-59.
2. Алиев А.М., Бейсенбеков С.А., Ахмедова Ф.М. Фотометрическое определение никотиновой кислоты в лекарственных препаратах // Фармация. – 1986. – № 5. – С. 58-59.
3. Алиев А.М., Салимов М.А. Определение цветной реакции никотиновой кислоты методом инфракрасной спектроскопии // Аптечное дело. – 1964. – № 3. – С. 36-42.
4. Бейсенбеков А.С., Алиев А.М. Фотометрическое определение никотиновой кислоты в лекарственных формах // Фармация. – 1983. – № 2. – С. 61-62.
5. Беликов В.Г., Вергейчик Е.Н. Идентификация фармацевтических препаратов в лекарственных формах с помощью производной спектрофотометрии // Совершенствование методов контроля качества лекарств / ВНИИ фармации. – Москва, 1980. – Т. 18. – С. 9-13.
6. Беликов В.Г., Степанюк С.Н. Выбор эффективного метода анализа рибофлавина и изучение его стабильности // Фармация. – 1988. – Т. 37. – № 2. – С. 39-41.
7. Белоусова Г.М., Прохоренко М.Д., Альтишулер Г.Н. Определение никотиновой кислоты в технических растворах // Химико-фармацевтический журнал. – 1970. – № 2. – С. 51-52.
8. Жданов Д.А., Куркин В.А., Браславский В.Б., Агапов А.И. Актуальные аспекты контроля качества и стандартизации плодов шиповника // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – № 3. – Том 10. – С. 167-175.
9. Завражняя Т.А. Использование метода ГЖХ для определения никотиновой кислоты // Фармация. – 1989. – № 1 – С. 36-38.
10. Козупова О.Н. Качественные исследования химического состава семян льна (*Linum Usitatissimum* L.) // Научный журнал молодых ученых. – 2018. – № 2(11). – С. 7-11.
11. Котова Н.И., Ксенофонтова Е.В., Гераськина С.С. Разработка методики качественного и количественного анализа сложных порошков противосудорожного действия // Материалы V Всероссийского съезда фармацевтов. Тезисы докладов. 15-16 сент. 1987г. – Ярославль, 1987. – С. 275-276.
12. Максименко Т.И., Беликов В.Г., Грязнова Е.А. Использование хроматографии в тонких слоях сорбента для анализа многокомпонентных лекарственных форм, содержащих дифенин // Фармация. – 1982. – № 2. – С. 5-56.
13. Мантров Г.И., Феофанова М.А., Рясенский С.С. Ионоселективный электрод для определения никотиновой кислоты в фармацевтических препаратах // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2019. – № 2. – С. 113-118.

14. Мокишина Н.Я. Раздельное определение никотиновой кислоты и ароматических аминокислот // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – № 9. – Т. 73. – С. 22-24.
15. Синёва Т.Д., Молдавер Б.Л., Бриль А.С. Идентификация ингредиентов поливитаминных таблеток «Декамевит» хроматографированием на пластинках «Силуфол» // Совершенствование методов контроля качества лекарств / ВНИИ фармации. – М., 1980. – Т.18 – С. 137-143.
16. Степанова Е.Н., Григорьева М.П. Методы определения аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах. Обзор литературы // Вопросы питания. – 1971. – № 1. – С. 56-64.
17. Татвидзе М.Л., Кунаташвили Н.Н. Исследование некоторых биологически активных веществ сухих листьев крапивы двудомной // THEORETICAL&APPLIED SCIENCE. – 2018. – № 6(62). – С. 157-161.
18. Тринеева О.В., Рудая М.А., Сливкин А.И. Определение в лекарственном растительном сырье витаминов группы В (на примере плодов Облепихи крушиновидной и листьев Крапивы двудомной) // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 3. – С. 131-134.
19. Фарматека / Приложение. – 1996. – № 6. – С. 4-5.

STANDARDIZATION OF HYDROPHILIC FRACTION OF PUMPKIN PULP JUICE DRY EXTRACT BY QUALITATIVE AND QUANTITATIVE CONTENT OF ASCORBIC ACID, NICOTINIC ACID AND VITAMIN B2 – RIBOFLAVIN

LANDINA Lyudmila Nikolaevna

Postgraduate student of the Department of Pharmacology with a course in Clinical Pharmacology
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute a branch of the Volgograd State Medical University
of the Ministry of Health of the Russian Federation
Pyatigorsk, Russia

Qualitatively, ascorbic acid is determined using the method of thin-layer chromatography, quantitatively titrimetrically, when it is oxidized with a solution of sodium 2,6-dichlorophenolindophenolate to dehydroascorbic acid with discoloration of the reagent. Nicotinic acid is determined by a qualitative analysis confirming the presence of nicotinic acid in the dry extract of pumpkin pulp juice. Two methods of analysis were used: color reaction with potassium dichromate and thin layer chromatography. Riboflavin is determined by fluorescence and TLC.

Key words: hydrophilic fraction, thin layer chromatography, fluorescence, spectrophotometry, titrimetry.
