

УДК 615.453.21

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ АНАЛИЗА КОМПОНЕНТОВ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ БЕТУЛИНА И ТИМОЛА
В МАСЛЕ СЕМЯН ТЫКВЫ CUCURBITA PEPO****Воробьева О.А., Мельникова Н.Б.***Нижегородская Медицинская Академия, Нижний Новгород, e-mail: melnikovanb@gmail.com*

Разработаны и валидированы методики количественного определения бетулина и каротиноидов, токоферолов и β -ситостерола в фитокомпозиции бетулина и тимол в масле семян тыквы: Разработана пробоподготовка для ВЭЖХ-анализа масла семян тыквы и фитокомпозиции на его основе, включающая омыление, введение в щелочной раствор смеси аскорбиновой кислоты и тимол при их массовом соотношении 2.5:1. Содержание бетулина было определено обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ-ВЭЖХ) с использованием методики «введено-найден» (по модельным смесям) в изократическом режиме (диодно-матричный детектор, $\lambda = 210$ нм; подвижная фаза ацетонитрил:вода (90:10)). Методика удовлетворяет требованиям по правильности, линейности, сходимости, робастности, и характеризуется пределом обнаружения (равном 0.0075 ± 0.0017 мг/мл), пределом количественного определения (равном 0.0500 ± 0.0011 мг/мл). Определено суммарное содержание каротиноидов—48.3 мкг%, спектрофотометрическим методом после адсорбционной очистки от других пигментов и компонентов масла семян тыквы. Методика валидирована по показателям правильности, линейности, сходимости. С использованием ОФ-ВЭЖХ с диодно-матричным детектором методом «введено-найден» (методика добавок) рассчитано содержание α -токоферола — 7.50 мг% и γ -токоферола — 5.77 мг% ($\lambda = 284$ нм; подвижная фаза метанол:ацетонитрил:дихлорметан (50:44:6)) и β -ситостерола — 105 мг% ($\lambda = 210$ нм; подвижная фаза ацетонитрил:этанол 96% (85:15)). Методики характеризуются как правильные, удовлетворяют требованиям линейности, сходимости, робастности, и имеют предел обнаружения (равный 0.15 ± 0.01 мг/л для α и γ -токоферолов; 0.0075 ± 0.0002 мг/мл для β -ситостерола), предел количественного определения (равный 1.00 ± 0.02 мг/л для α и γ -токоферолов; 0.050 ± 0.003 мг/мл для β -ситостерола).

Ключевые слова: бетулин, масло семян тыквы, токолы, каротиноиды, фитостеролы, валидация**DEVELOPMENT AND METHODS VALIDATION
OF THE COMPONENTS OF BETULIN AND THYMOL PHARMACEUTICAL
COMPOSITION IN PUMPKIN SEED OIL CUCURBITA PEPO****Vorobyeva O.A., Melnikova N.B.***Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, e-mail: melnikovanb@gmail.com*

Methods validation of betulin, carotenoids, tocopherols and β -sitosterol assays of betulin and thymol phytocomposition in pumpkin seed oil have been developed. The pretreatment of pumpkin seed oil containing composition before RP-HPLC analysis has been proposed. It involves the saponification after the addition of ascorbic acid and thymol in 2.5 ratio (mass.%) into alkaline solution. The betulin content was determined by using RP-HPLC method with model mixtures «added-found» in isocratic mode (diode array detector, $\lambda = 210$ nm; mobile phase acetonitrile: water (90:10)). The method satisfies the requirements by the accuracy, linearity, robustness, and it is characterized by a detection limit (LOD = 0.0075 ± 0.0017 mg/mL), the limit of quantification (LOQ = 0.0500 ± 0.0011 mg/mL). The total carotenoid content determined by spectrophotometry after the purification from pigments and other ingredients of pumpkin seed oil was equal to 48.3 mg%. The content of α - and γ -tocopherols determined by RP-HPLC-chromatography using diode-array detector ($\lambda = 284$ nm, mobile phase methanol: acetonitrile: dichloromethane (50: 44: 6) by the «added-found» methods) was estimated as 7.50 mg% and 5.77 mg% and β -sitosterol content was equal to 105 mg% ($\lambda = 210$ nm; mobile phase acetonitrile: ethanol 96% (85/15)). The methods satisfy the requirements by the accuracy, linearity, robustness, and they are characterized by the limit of detection (LOD = 0.15 ± 0.01 mg/mL for α - and γ -tocopherols; 0.0075 ± 0.0002 mg/mL for β -sitosterol), the limit of quantification (LOQ = 1.00 ± 0.02 mg/mL for α - and γ -tocopherols; 0.050 ± 0.003 mg/mL for β -sitosterol).

Keywords: betulin, pumpkin seed oil, tocopherols, carotenoids, phytosterols, method validation

По данным ВОЗ, более 20% населения Земли страдает кожными заболеваниями. При лечении такого рода заболеваний наряду с общей терапией широко используются лекарственные средства наружного применения. В зависимости от рода заболевания, приемлемыми являются различные лекарственные формы: от примочек до мазей. Правильно подобранный состав лекарственного средства действует на течение заболевания в ряде случаев более интенсивно, чем основное действующее вещество.

С другой стороны, зачастую, какой-либо из компонентов — вспомогательных веществ или основы, может не просто обесценить действие лекарственного вещества, но и усугубляет проявление болезни.

Лекарственные формы на основе жирных масел представляют особый интерес для дерматологии в связи с богатым химическим составом. В настоящей работе рассматривается фитокомпозиция на основе масла семян тыквы *Cucurbita Pepo*. Биологически активные вещества в составе масла

благоприятным образом влияют на течение дерматологических заболеваний: необходимый баланс жирных кислот, а также высокое содержание токолов, каротиноидов и фитостеролов в тыквенном масле делают его перспективным компонентом в составе сложных фармацевтических композиций. Для усиления противовоспалительного действия в состав фитокомпозиции нами предложено вводить бетулин – пентациклический тритерпеноид, основной компонент бересты березы. По химической структуре бетулин близок к глюкокортикоидам, но в отличие от них не проявляет известных побочных эффектов и не вызывает привыкания. Высокая противовоспалительная активность соединения, а также его репаративные свойства, подтвержденные в ряде работ [1, 2, 3], обосновывают актуальность его введения в разрабатываемую композицию. С целью стабилизации композиции, в ее состав предложено вводить вещество, имеющее высокий антиоксидантный потенциал. В качестве такого соединения был использован тимол – монотерпеновый фенол, основной компонент эфирных масел тимьяна ползучего и душицы обыкновенной. Кроме антиоксидантного действия (защита токолов и каротиноидов в составе масла семян тыквы), тимол в данной композиции является соразтворяющим агентом для бетулина, вероятно, образуя с ним комплексы включения.

Предложенная фармацевтическая композиция имела следующий состав (масс. %): бетулин – 2.1, тимол – 6.4, масло семян тыквы (МСТ) – до 100.0 и может быть введена в состав сложных лекарственных форм.

Количественное определение ингредиентов в фитокомпозиции является крайне трудной аналитической задачей, поскольку МСТ имеет многокомпонентный состав, быстро окисляется, а проведение анализа как растительных масел, так и активных действующих веществ в композиции сопряжено со значительными сложностями. Для таких масел, как МСТ, основную трудность представляет собой пробоподготовка, которую обычно осуществляют омылением водными или спиртовыми растворами щелочей. В процессе омыления в жестких условиях (высокая температура смеси в течение продолжительного времени) возможны не только окисление, но и деструкция ценных биологически активных веществ, вследствие чего требуется защита компонентов от нежелательных процессов. В международном протоколе анализа Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001 для жирных масел в качестве такой защиты используется аскорбиновая кислота. Однако, в случае

анализа ряда масел, в том числе МСТ, введение аскорбиновой кислоты не позволяет обеспечить стабильность композиции.

С другой стороны, количественное определение компонентов (более 20 в МСТ), несмотря на многочисленные публикации [4, 5, 7, 10] также являются нерешенной задачей, и в настоящее время отсутствуют унифицированные методики анализа наиболее ценных компонентов в МСТ.

Цель данной работы – разработка и валидация методик количественного определения компонентов, оказывающих основное влияние на воспалительный процесс, по суммарному содержанию каротиноидов, токоферолов и β -ситостерола, и бетулина в фитокомпозиции бетулина и тимола в масле семян тыквы.

Материалы и методы исследования

Материалы и реактивы. (\pm) α -токоферол (Supelco, 47783), рац- β -токоферол (50 мг/мл в гексане, Supelco, 46401-U), γ -токоферол (Supelco, 47785), δ -токоферол (Supelco, 47784), β -каротин (Sigma, 22040), β -ситостерол 95%, масло семян тыквы (ФСП 42-8110-06), бетулин 98% (Sigma, 473-98-3), ацетонитрил для хроматографии сорт 0 (ТУ 2636-040-44493179-00), гидроксид калия марки х.ч. (ГОСТ 24363-80), азот, оксид магния марки х.ч. (ГОСТ 4526-75), аскорбиновая кислота марки х.ч. (ГОСТ 4815-76), тимол марки х.ч. (ТУ 6-09-3736-79), этанол марки о.с.ч., гексан марки х.ч., метанол марки о.с.ч., дихлорметан марки о.с.ч., вода очищенная, полученная на установке «Elix-3» фирмы «MILLIPORE», удельное сопротивление менее 0,2 мСм.

Анализ электронных спектров был выполнен на UV-vis спектрофотометре Specord S100 Bioline (Analytic Jena, Германия), толщина кварцевой кюветы 10 мм. Измеряли оптическую плотность в интервале длин волн 330 – 800 нм стандартных растворов и испытуемого раствора трижды. Гексановый экстракт предварительно пропускали через колонку, заполненную оксидом магния. Использовали гексан в качестве раствора сравнения. Для построения калибровочной кривой измеряли оптическую плотность на длине волны $\lambda_{\max} = 424$ нм от базовой линии, вычисляя значения средней оптической плотности.

Суммарное содержание каротиноидов (в мг) на 100 г композиции (мг %) рассчитывали по формуле:

$$m, \text{ мг} = \frac{(A_{\text{набл.}} - b) \cdot V (\text{мл})}{E_{1\text{см}}^{1\%}} \cdot C^{\circ} (\text{мг/мл})$$

где $A_{\text{набл.}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора композиции в гексане; b – поправка оптической плотности по отношению к базовой линии; V – анализируемый объем раствора, мл; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный коэффициент экстинкции; C° – концентрация 1% раствора, равная 10 мг/мл.

ВЭЖХ-анализ бетулина, токоферолов и β -ситостерола проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе марки Shimadzu LC-10 Avp в обращенно-фазовом режиме, колонка Discovery C18 (250×4.6 mm, 5 μ m) с диодно-матричным УФ-детектором. Условия хроматографирования **бетулина**: подвижная фаза ацетонитрил—вода 90:10 (v/v)

в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 40 °С, объем инъекции 20 μ Л, детектирование при длинах волн 206 и 210 нм, время анализа 20 мин. *Условия хроматографирования токоферолов:* подвижная фаза метанол-ацетонитрил-дихлорметан 50:44:6 (v/v) в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 30 °С, объем инъекции 20 μ Л, детектирование при длине волны 284 нм, время анализа 30 мин. *Условия хроматографирования β -ситостерола:* подвижная фаза спирт этиловый 96%-ацетонитрил 15:85 (v/v) в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 40 °С, объем инъекции 20 μ Л, детектирование при длине волны 210 нм, время анализа 30 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

UV-Vis – анализ количественного содержания каротиноидов в композиции.

На рис.1 представлена типичная картина электронного спектра гексанового раствора композиции. В спектре наблюдались основные полосы с максимумами поглощения 424 и 434 нм. Каротиноиды, поглощающие в этой области спектра, преимущественно представлены каротиноидами β -ряда, а именно, β -криптоксантином,

Приготовление стандартных растворов из стандартов

Стандарт исходный	C ₀ ,%	C, стандартных растворов
МСТ	100	0.01; 0.02; 0.03 г\мл
α -токоферол	100	1.02; 4.08; 10.20; 51.00 мг\л
γ -токоферол	0.005	1.0; 4.0; 10.0; 50.0 мг\л
β -ситостерол	95	0.052; 0.078; 0.260 мг\мл
бетулин	98	0.063; 0.125; 0.250; 0.500; 1.000 мг\мл

Приготовление модельных смесей 1, 2, 3: 0.1 г (точная навеска) бетулина помещали в ступку, перетирали с добавлением 1 мл спирта этилового 96%, добавляли 0.5 г тимола, 0.2 г аскорбиновой кислоты, при перемешивании вводили 0.5; 1.0 и 2.0 г МСТ. Смесь перетирали пестиком до однородной суспензии. Перед анализом на наличие токоферолов и фитостеролов смесь омыляли согласно приведенной ниже методике.

Приготовление модельных смесей 4, 5, 6 выполняли аналогично процедуре приготовления модельных смесей 1,2,3, используя 0.05 г; 0.1 г; 0.15 г (точной навески) бетулина. Состав смеси: 0.5 г тимола; 0.2 г аскорбиновой кислоты; 2.0 г МСТ. Перед анализом на наличие токоферолов и фитостеролов смесь омыляли согласно приведенной ниже методике.

Методика пробоподготовки образцов для анализа токоферолов и фитостеролов:

Модельную смесь растворяют в 50 мл спирта этилового 96%, добавляют 30 мл 60 масс. % водного раствора КОН и выдерживают образец в течение 30 мин на водяной бане при 70 °С, периодически перемешивая. После указанного времени к смеси, разделившейся на 2 фазы (нижняя – розоватая, верхняя – желтая), после охлаждения добавляют 100 мл воды очищенной (смесь становится гомогенной) и экстрагируют полученный раствор двумя порциями гексана по 100 мл, взбалтывая фазы каждый раз в течение 1 минуты. Полученное гексановое извлечение обрабатывают 100 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты, а затем дважды водой порциями по 100 мл, после чего осушают полученный раствор безводным Na₂SO₄. Гексан удаляют в токе азота до остаточного объема 15 мл и полученный раствор пропускают через колонку с MgO диаметром 1.5 см, высотой 5 см для очистки от каротиноидов. Колонку промывают двумя порциями гексана по 25 мл и полученный гексановый раствор отгоняют в токе азота досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл элюента.

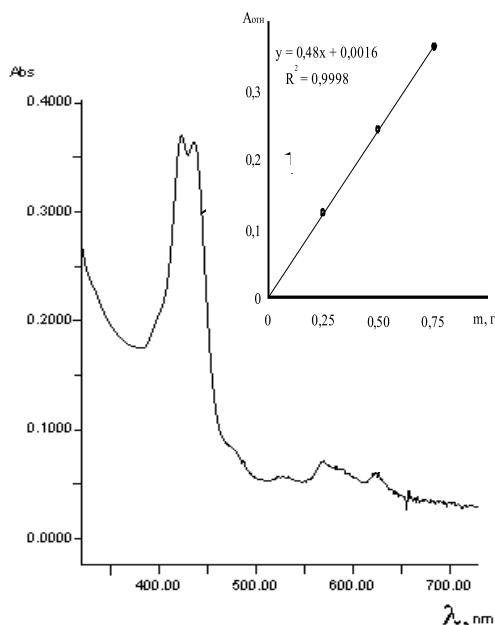
Статистическую обработку проводили по программе Statistica 7.0 (p < 0.05).

зеаксантином и виолаксантином [6]. Как правило, каротиноиды образуются путем перехода гидроксильированных каротиноидов в эпокисоединения (виолаксантин), или возможным дальнейшим окислением и отщеплением эпокси группы [8]. Кроме того, в присутствии аскорбиновой кислоты на свету возможно фотовосстановление каротиноидов (образование атероксантина и зеаксантина). Анализ интенсивности поглощения в области 424 и 434 нм, в которой поглощают все каротиноиды, позволяет количественно оценить суммарное содержание каротиноидов в МСТ.

Для удаления следов хлорофилловых соединений, поглощающих в области 550-650 нм, нами проводилась адсорбционная очистка гексанового раствора с использованием колонки, заполненной адсорбентом основного характера. Показано, что наиболее полная очистка достигается при использовании оксида магния.

Калибровочные графики зависимостей интенсивностей поглощения А при 424 и 434 нм от концентрации МСТ имеют линейный характер. На рис. 1 (б) представлена зависимость А = f(m) по $\lambda = 424$ нм, соответствующая уравнению $y = 0.4800x + 0.0016$ ($R^2 = 0.9998$), на основании которой рассчитан $E_{1\%}^{1\text{см}}$ равный 2515.

Суммарное содержание каротиноидов (в мг) на 100 г МСТ, рассчитанное по формуле 1, равно 0.0483 ± 0.0013 мг % (48.3 мкг %). Валидационные характеристики по показателям линейности, сходимости, правильности представлены в табл. 1, 2.



Масса МСТ, г	Оптическая плотность А (424 нм)
0.25	0.1216
0.50	0.2416
0.75	0.3616

Рис. 1. Электронные спектры гексановых растворов каротиноидов – раствор композиции в гексане; врезка – зависимость $A = f(m_{\text{МСТ}})$

Таблица 1

Определение сходимости методики количественного определения суммы каротиноидов в композиции по модельным смесям

Показатели	Повторность								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сумма каротиноидов, мкг %	24.0	24.3	23.8	47.9	48.1	47.5	96.4	95.6	95.8
$X_{\text{ср.}}$	24.01			47.80			95.93		
RSD, %	1.06			0.64			0.44		

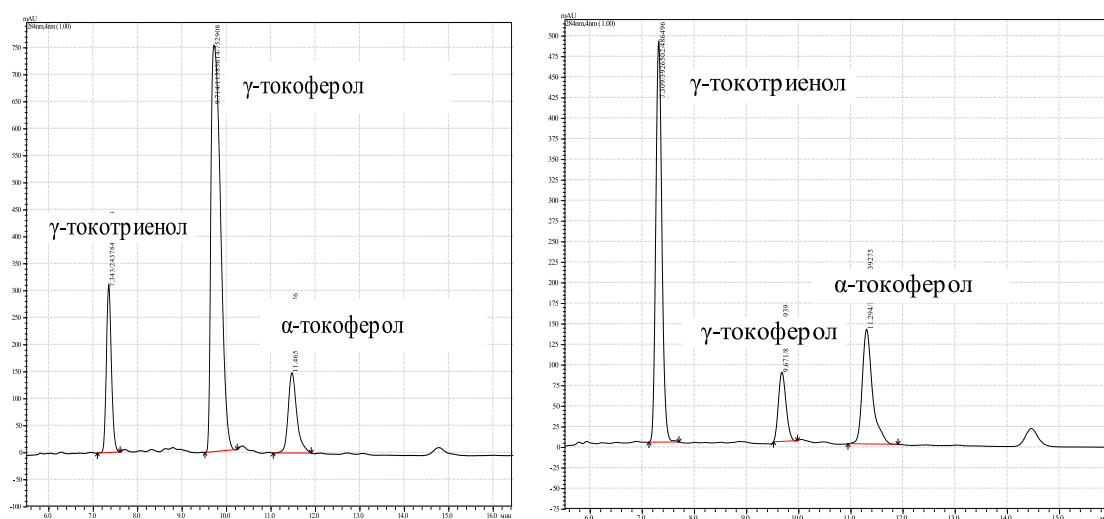
Таблица 2

Результаты установления правильности методики количественного определения каротиноидов в МСТ методом добавок

С каротиноидов, мкг %	Добавлено СО каротина, мкг %	Расчитано, мкг %	Найдено, мкг %	Выход, (Открываемость) %
24	10	34	32.3	95.0
24	10	34	31.8	93.5
24	10	34	33.4	98.2
48	20	68	67.8	99,7
48	20	68	65.3	96,0
48	20	68	66.4	97.7
96	30	126	125.7	99.8
96	30	126	126.1	100.1
96	30	126	126.5	100.4
$X_{\text{ср.}} = 97.81\%$				

Определение *линейности* проводили на 3 уровнях концентраций от ожидаемого содержания суммы каротиноидов в композиции. Критерием приемлемости и линейности

методики является коэффициент корреляции, величина которого $R^2 = 0.9998$, следовательно, в анализируемой области концентраций методика является линейной (рис. 1).



а) время омыления 30 мин

б) время омыления 1 час

Токоол	$\tau_{уд.}$, мин	Площадь		$S_{\gamma-T} / S_{\alpha-T}$	
		30 мин	1 час	30 мин	1 час
α -Т	11.47	2010626	1892732	6:1	1:1.5
γ -Т	9.71	11383614	846250		

Рис. 2. ВЭЖ-хроматограммы композиции с различным временем омыления: а) 30 мин и б) 1 час. Элюент – 44:50:6, v/v (ацетонитрил:метанол:дихлорметан), скорость потока 1.0 мл/мин, УФ-детектор (284 нм), 30 °С

Сходимость методики определяли в 3 повторностях. Критерий приемлемости, выражаемый через величину относительного стандартного отклонения (RSD, %), составляющей 0.71 % (табл. 1), удовлетворяет требованиям методики по параметру сходимости.

Правильность методики устанавливали методом добавок «введено-найденно» путем измерения количественного содержания суммы каротиноидов в растворах при добавлении определенного количества стандарта к исследуемому раствору. Отношение количества введенного β, β -каротина к найденному ($X_{ср}$) в % соответствовало 97,81 %, что характеризует разработанную методику как правильную (табл. 2).

ОФ-ВЭЖХ- анализ содержания токоферолов и β -ситостерола в фитокомпозиции. Нами показано, что введение аскорбиновой кислоты в омыляемую смесь в рекомендуемых Международным протоколом концентрациях, не обеспечивает стабильности системы: приводит к частичному окислению токоферолов, каротиноидов и деструкции β -ситостерола, что выражалось в невоспроизводимости результатов по коли-

чественному определению. В качестве антиоксиданта, препятствующего разрушению компонентов МСТ, для проведения пробоподготовки нами предложено использовать тимол. Выбор тимола обусловлен тем, что, как показано в работе Venu, S., 2013, тимол способен в паре с аскорбиновой кислотой проявлять свойства сильного восстановителя, регенерируя окисленную аскорбиновую кислоту [9]. В дальнейшем все эксперименты при пробоподготовке проводились в присутствии смеси тимола и аскорбиновой кислоты при их массовом соотношении 2.5:1 (25 % концентрации тимола по отношению к фитокомпозиции). На рис. 2 приведены ВЭЖ-хроматограммы токолов в композиции после омыления жировой фракции в течение 30 и 60 минут в присутствии смеси тимола и аскорбиновой кислоты.

Данные рис. 2 показывают большое влияние времени омыления на состав токолов в композиции. При омылении в течение 30 минут токолы представлены основными тремя компонентами: α -токоферолом (α -Т) ($\tau = 11.47$ мин), γ -токоферолом (γ -Т) ($\tau = 9.71$ мин) и γ -токотриенолом (γ -ТТ)

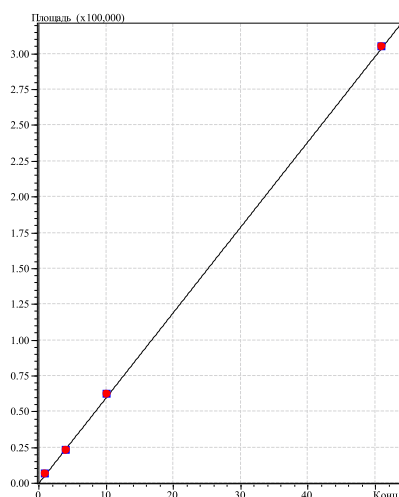
($\tau = 7.34$ мин). Соотнесение пиков α - и γ -Т было выполнено с использованием их стандартных образцов, а время выхода γ -Т в анализируемых условиях отнесено в соответствии с литературными данными, где анализ проводился в сопоставимых условиях [10]. Показано, что после 30-минутного омыления площадь пика γ -Т в 6 раз выше, чем α -Т, а площадь пика γ -ТТ существенно больше, чем у α -Т (рис. 2, б). После длительного омыления (60 минут), вероятно, происходит частичный переход γ -Т в γ -ТТ и концентрация γ -Т резко уменьшается, при этом соотношение площади пика γ -Т к α -Т составляет 1:1.5.

Учитывая этот факт, в дальнейшем омыление проводили в течение 30 минут.

Количественное содержание α - и γ -Т в фитокомпозиции, выполняли с использованием калибровочного графика по стандартам α - и γ -Т (рис. 3). Рассчитанная концентрация α - и γ -Т равна 7.50 мг% и 5.77 мг%, соответственно.

Определение *линейности* проводили на 4 уровнях концентраций от ожидаемого содержания α - и γ -Т в фитокомпозиции, аналогично определению каротиноидов (рис. 3). Уравнения линейной регрессии и значения коэффициентов корреляции характеризуют приемлемость данной методики по показателю линейности.

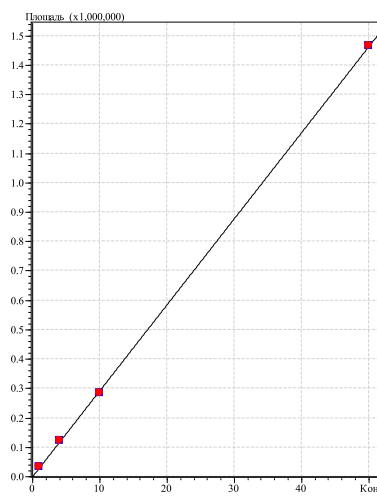
Методика соответствует критерию *сходимости* по величине RSD, %, равному 1.68% для α -Т и 3.84% для γ -Т (табл. 3).



$C_{\alpha-T}$, МГ/Л

а)

$$Y = aX + b, \text{ где } a = 5969.58, b = 0.0, \\ R^2 = 0.9999506, r = 0.9999753$$



$C_{\gamma-T}$, МГ/Л

б)

$$Y = aX + b, \text{ где } a = 29267.57, b = 0.0, \\ R^2 = 0.9999097, r = 0.9999548$$

Рис. 3. Калибровочные графики зависимости площади пика токолов от концентрации по хроматограммам образцов фитокомпозиции после гидролиза; внешними стандартами выступали СО токолов а) α -Т; б) γ -Т

Таблица 3

Определение сходимости методики количественного определения токоферолов в фитокомпозиции на примере модельных смесей

Показатели	Повторность								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_{\alpha-T}$ МГ%	4.5	4.7	4.6	7.3	7.6	7.5	12.3	12.5	12.4
$C_{\gamma-T}$ МГ%	2.9	2.7	3.1	5.8	5.9	5.6	11.3	11.7	11.5
$X_{\text{ср } \alpha-T}$ МГ%	4.60			7.48			12.4		
$X_{\text{ср } \gamma-T}$ МГ%	2.90			5.77			11.5		
RSD $_{\alpha-T}$ %	2.17			2.05			0.81		
RSD $_{\gamma-T}$ %	6.9			2.88			1.73		

Таблица 4

Результаты установления правильности методики количественного определения α -токоферола в фитокомпозиции методом добавок

$C_{\text{исх.}}$, мг %		Добавлено C_0 , мг %		Найдено, мг %		Выход (Открываемость) α -Т, %	Выход (Открываемость) γ -Т, %
α -Т	γ -Т	α -Т	γ -Т	α -Т	γ -Т		
4.5	2.9	10		14.2	12.7	97.93	98.45
4.5	2.9	10		14.3	12.6	98.64	97.67
4.5	2.9	10		14.3	12.9	98.64	100.0
7.5	5.8	20		27.3	25.5	99.30	98.84
7.5	5.8	20		26.4	25.3	96.00	98.06
7.5	5.8	20		27.2	25.9	98.91	100.39
12.5	11.6	30		42.3	41.4	99.53	99.52
12.5	11.6	30		42.6	41.1	100.24	98.80
12.5	11.6	30		42.3	41.8	99.53	100.48

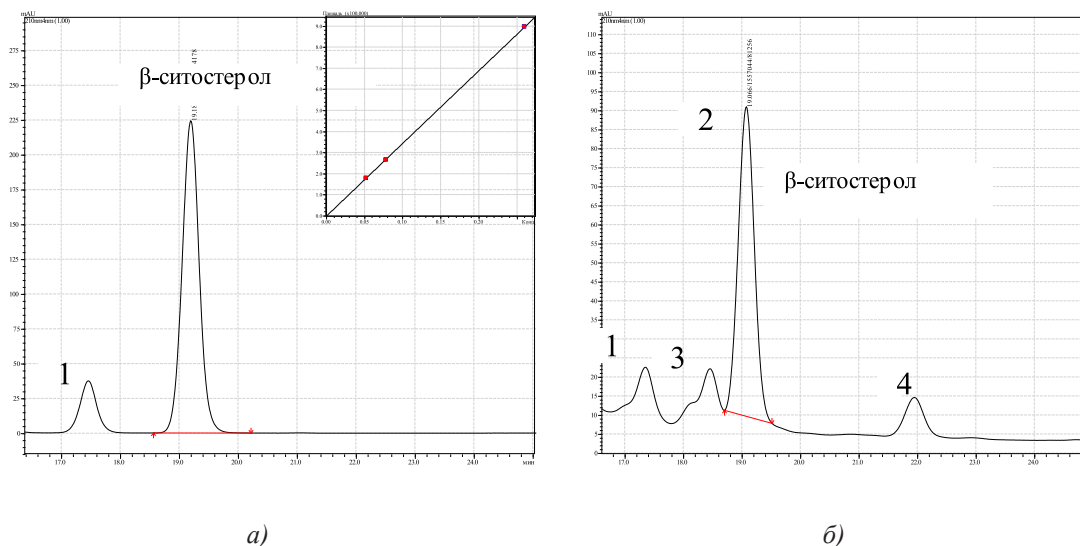


Рис. 4. ВЭЖ-хроматограмма: а) 2 – β -ситостерол; на врезке представлена калибровочная зависимость $A = f(C_{\beta\text{-см.}})$; 1 – примесь brassicasterола; б) МСТ; 1 – примесь brassicasterола; 2 – β -ситостерол; 3 – кампестерол, 4 – β -D- β -глюкопиранозидная форма ситостерола

Правильность методики устанавливали методом добавок «введено-найденно» путем измерения количественного содержания α - и γ -токоферолов в растворах при добавлении определенного количества стандартов к исследуемому раствору. Отношение количества введенного токола к найденному ($X_{\text{ср}}$) в % соответствовало 98.75% (α -Т) и 99.13% (γ -Т), что характеризует разработанную методику как правильную (табл. 4).

На практике были определены **пределы обнаружения**, как соотношение сигнал/шум, равное 3/2, и **предел количественного определения**, как соотношение сигнал/шум 10/1.

Методика имеет предел обнаружения равный 0.0015 ± 0.0002 г/мл, предел количественного определения равный 0.010 ± 0.002 г/мл.

Для анализа β -ситостерола в фитокомпозиции на основе МСТ был предложен другой режим ОФ-ВЭЖХ-анализа. Выбор режима проводился с учетом подбора элюента, температуры и длины волны детектирования, используя стандарт β -ситостерола и наличия основных минорных компонентов МСТ – кампестерола и стигмастерола.

В качестве элюента была выбрана смесь растворителей – ацетонитрил: спирт этиловый 96% (85:15), температура колонки – 40 °С, длина волны 210 нм.

На рис. 4 приведена типичная ВЭЖ-хроматограмма композиции после пробоподготовки.

Показано, что количественное содержание β -ситостерола в фитокомпозиции, определенное по калибровочному графику стан-

дарта β -ситостерола равно 150 ± 10 мг%. Известно, что в большинстве пищевых растительных маслах относительный процент содержания β -ситостерола лежит в интервале 50-70% от общего количества фитостеролов, что соответствует концентрации β -ситостерола от 100 до 400 мкг%.

Линейность определена при 3 концентрациях β -ситостерола. Уравнение линейной регрессии имеет вид: $y = 3449375x$. Значение коэффициента корреляции составило 0.999.

Сходимость методики оценивали по величине относительного стандартного отклонения RSD%, которое составляло 3.56%. **Правильность** методики устанавливали путем измерения количественного содержания β -ситостерола в растворах, полученных путем добавления определенного количества стандарта к исследуемому раствору. $X_{\text{ср}}$ находился в пределах от 95,5 до 101,4%, его средняя величина составила 97,65%. Таким образом, методика определения β -ситостерола удовлетворяет требованиям по линейности, сходимости, правильности.

На практике были определены **пределы обнаружения**, как соотношение сигнал/шум, равное 3/2, и **предел количественного определения**, как соотношение сигнал/шум 10/1.

Методика имеет предел обнаружения равный 0.0075 ± 0.0002 г/мл, предел количественного определения равный 0.050 ± 0.003 г/мл.

Определение бетулина в фитокомпозиции. В качестве элюента была выбрана смесь растворителей – ацетонитрил: вода (90:10), температура колонки – 40°C , длина волны 210 нм.

На рис. 5 приведена типичная ВЭЖ-хроматограмма бетулина.

Показано, что количественное содержание бетулина в исследуемой фитокомпозиции, определенное по калибровочному графику стандарта бетулина, равно 2.13 ± 0.32 г/100 г

Линейность определена при 5 концентрациях бетулина. Уравнение линейной регрессии имеет вид: $y = 6867462x$. Значение коэффициента корреляции составило 0.9993. **Сходимость** методики оценивали по величине RSD%, которая составляла 2.8%. **Правильность** методики устанавливали путем измерения количественного содержания бетулина в растворах, полученных путем добавления определенного количества стандарта к исследуемому раствору. $X_{\text{ср}}$ находилось в пределах от 96.15 до 101.42%, его средняя величина составила 98.31%.

На практике были определены **пределы обнаружения**, как соотношение сигнал/шум, равное 3/2, и **предел количественного определения**, как соотношение сигнал/шум 10/1.

Методика имеет предел обнаружения равный 0.0075 ± 0.0017 г/мл, предел количественного определения равный 0.0500 ± 0.0011 г/мл.

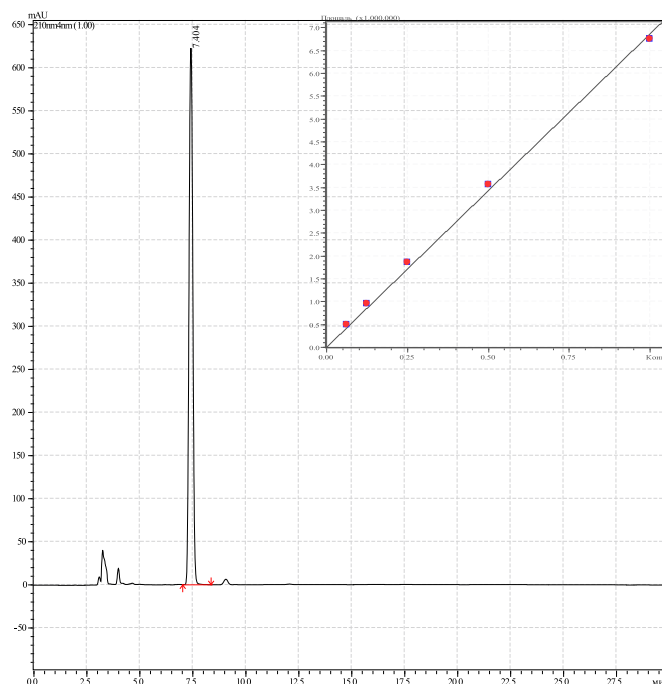


Рис. 5. ВЭЖ-хроматограмма бетулина. На врезке представлена калибровочная зависимость $A = f(C_{\text{бетулина}}) - \hat{Y} = aX + b$, где $a = 6867462$, $b = 0.0$, $R^2 = 0.9992550$, $r = 0.9996274$

Выводы

Разработаны и валидированы методики количественного определения бетулина и каротиноидов, токоферолов и β -ситостерола в фитокомпозиции бетулина и тимола в масле семян тыквы. Методики ВЭЖХ-анализа токоферолов, β -ситостерола и бетулина удовлетворяют требованиям по правильности, линейности, сходимости, робастности и характеризуются пределом обнаружения (равном 0.15 ± 0.01 мг/л для α и γ -токоферолов; 0.0075 ± 0.0002 мг/мл для β -ситостерола), пределом количественного определения (равном 1.00 ± 0.02 мг/л для α и γ -токоферолов; 0.050 ± 0.003 мг/мл для β -ситостерола). Пробоподготовка предполагает омыление 60% водным раствором КОН в присутствии аскорбиновой кислоты и тимола, взятого в 2,5-кратном избытке по отношению к аскорбиновой кислоте. Методика количественного определения суммарного содержания каротиноидов с использованием спектрофотометрии предполагает первичную очистку гексанового экстракта фитокомпозиции от сопутствующих компонентов с помощью адсорбционной колонки, заполненной оксидом магния. Методика характеризуется правильностью, линейностью и сходимостью.

Список литературы

1. Кислицин А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение. Состав, применение. Обзор. // Химия древесины. – 1994. – № 3. – С. 3–28.
2. Сергеев Д.В., Прошин С.Н., Дьячук Г.И. Ранозаживляющие и противоожоговые свойства бетулин содержащих мазей // Медико-биологические и социально-биологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2011. – № 2. – С. 76–79.
3. Сергеев Д.В. Репаративные эффекты бетулина // Профилактическая медицина: мат. конф. (СПб,СЗГМУим. И.И. Мечникова, 2011г.). – СПб, 2011. – С. 280–281.
4. Azevedo-Meleiro C., Rodriguez-Amaya D. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo* // J. Agric. Food Chem. – 2007. Vol.10. №55. – P. 4027–4033.
5. Fruhwirth G.O., Hermetter A. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2007. Vol.11. № 109. – P. 1128–1140.
6. Howitt C.A., Pogson B.J. Carotenoid accumulation and function in seeds // Plant, Cell and Environment. – 2006. – № 29. – P. 435–445.
7. Kreck M., Kurbel P., et al. Identification and quantification of carotenoids in pumpkin cultivars (*Cucurbita maxima* L.) and juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection // Journal of Applied Botany and Food Quality. – 2006. – № 80. – P. 93–99.
8. Rodriguez-Amaya D. A guide to carotenoid analysis in foods: International Life Science Institute Press. – Washington, DC, 1999.
9. Venu, S. Oxidation Reactions of Thymol: A Pulse Radiolysis and Theoretical Study // J. Phys. Chem. – 2013. Vol. 2. № 117. – P. 291–299.
10. Whitaker J. Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc. – NJ, 2001. – P. 1191.