

УДК: 582.711.71:581.47:547.973-024.17]:543.422.3

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ АНТОЦИАНОВ В ПЛОДАХ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

**В.Ю. Андреева, Н.В. Исайкина**

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России  
 Московский тракт, 2/7, Томск, Россия, 634050  
 эл. почта: vilival@yandex.ru

Плоды аронии черноплодной (рябины черноплодной) являются официальным лекарственным сырьем. Свежие плоды, сок аронии и таблетки оказывают адаптогенное, спазмолитическое, гипотензивное, диуретическое, желчегонное, антиатеросклеротическое, С- и Р-витаминное действие. Для стандартизации сырья нами ранее был предложен метод количественного определения суммы антоцианов в плодах аронии черноплодной сухих методом прямой спектрофотометрии в видимой области при длине волны  $544 \pm 2$  нм в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид. В соответствии с нормативными документами, регламентирующими процессы валидации новых аналитических методов, для аттестации методики количественного определения суммы антоцианов необходимо было провести определение следующих параметров: прецизионность (повторяемость) и воспроизводимость (лабораторная и межлабораторная), правильность и линейность. Статистическая обработка полученных результатов в условиях повторяемости, показала, что они достоверны при доверительной вероятности 95%, вычисленные значения величины относительного стандартного отклонения (RSD) — 0,005% и относительного доверительного интервала среднего значения — 0,52% не превышают критериев приемлемости — 5%. Воспроизводимость методики также является удовлетворительной, так как меры прецизионности для данного метода измерений не превышают критериев приемлемости как для внутрилабораторной прецизионности  $1,50\% < 10\%$ , так и для межлабораторной прецизионности  $8,06\% < 15\%$ . В ходе определения линейности установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации суммы антоцианов. Коэффициент корреляции близок к единице  $-0,978$ , что свидетельствует о сильной линейной зависимости значения оптической плотности от содержания действующих веществ. Правильность методики устанавливали на идентичных образцах плодов аронии черноплодной с добавлением известного количества стандартного образца цианидин-3-О-глюкозида. В разработанной методике процент восстановления находился в пределах от 98,20% до 102,63%, его средняя величина составила 100,33%, что находится в пределах  $100 \pm 5\%$ . Таким образом, валидация методики количественного определения суммы антоцианов в экстракте плодов аронии черноплодной по следующим характеристикам: прецизионность (повторяемость) и воспроизводимость (лабораторная и межлабораторная), правильность и линейность показала, что данная методика является высокочувствительной, правильной и воспроизводимой и может быть использована для стандартизации сырья.

**Ключевые слова:** валидация, арония черноплодная, антоцианы, повторяемость, воспроизводимость, линейность, правильность.

Плоды аронии черноплодной (рябины черноплодной) являются официальным лекарственным сырьем. Таблетки «Арония+С», свежие плоды и сок аронии, оказывающие адаптогенное, спазмолитическое, гипотензивное, диуретическое, жел-

чегонное, антиатеросклеротическое, С- и Р-витаминное действие, назначают для профилактики Р-витаминной недостаточности, лечения гипертензии I и II стадий и других заболеваний, сопровождающихся повышением артериального давле-

# Электронный научно-образовательный Вестник

Здоровье и образование в XXI веке

2015, том 17 [5]

ния. Широкий спектр фармакологических свойств аронии черноплодной обусловлен содержанием богатого комплекса биологически активных веществ (БАВ). Для стандартизации плодов аронии черноплодной высушенных нами предложена ранее методика количественного определения суммы антоцианов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид [1]. Для того чтобы аналитические методики гарантировали достоверные и точные результаты анализа, предусмотрена процедура их валидации (аттестации) [2; 3]. В связи с этим, целью настоящего исследования была валидационная оценка методики спектрофотометрического определения количественного содержания суммы антоцианов в плодах аронии черноплодной сухих.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили образцы плодов аронии черноплодной, высушенные до воздушно-сухого состояния.

Количественное определение антоцианов проводили методом прямого спектрофотометрического определения при длине волны 544 нм в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в соответствии с ранее разработанной методикой [1]. При этом

принятое опорное значение содержания антоцианов составило  $10,859 \pm 0,056\%$ .

Валидацию методики проводили методами математической статистики по следующим показателям: прецизионность (повторяемость), воспроизводимость (лабораторная и межлабораторная), правильность и линейность [2; 3]. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2007».

**Результаты исследования.** Повторяемость методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним методом, в одной лаборатории, одним лаборантом-исследователем, с использованием одного спектрофотометра, в пределах короткого промежутка времени. Статистическая обработка полученных результатов, показала, что они достоверны при доверительной вероятности 95%, вычисленные значения величины относительного стандартного отклонения (RSD) — 0,005% и относительного доверительного интервала среднего значения — 0,52% не превышают критериев приемлемости — 5%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 1).

Таблица 1

Результаты оценки повторяемости методики

№ опыта	1	2	3	4	5	6		
Объем аликвоты	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1.00		
Оптическая плотность, <i>D</i>	0,414	0,414	0,419	0,417	0,417	0,418		
Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О- гликозид, %	10,794	10,794	10,925	10,872	10,872	10,890		
Метрологические характеристики								
<i>X</i> <sub>ср</sub>	<i>S</i> <sup>2</sup>	<i>S</i>	<i>S</i> <sub><i>x</i></sub>	<i>S</i> <sub><i>r</i></sub>	P (%)	<i>t</i> (P, f)	Δ <i>x</i> <sub>ср</sub>	ε, %
10.8599	0.0029	0.0540	0.0220	0.0049	95	2,57	0.0567	0.5223

Воспроизводимость методики определяли на идентичных образцах сырья совместным оценочным экспериментом в двух различных лабораториях СибГМУ на различных приборах, разными

лаборантами-исследователями по 3 испытания образца на трех разных уровнях концентраций в интервале 80—120% от принятого опорного значения (табл. 2). Статистическое тестирование выбросов

# Электронный научно-образовательный Вестник

Здоровье и образование в XXI веке

2015, том 17 [5]

проводили с использованием критерия Кохрена, дисперсии и стандартного отклонения для каждого уровня и рассчитывали по ГОСТ Р ИСО [3]. При рассмотрении данных, не обнаружив, какой либо зависимости, в качестве показателей прецизионности, нами были выбраны средние значения стандартных отклонений. Данные значения стандартных отклонений могут быть применены в диапа-

зоне содержания антоцианов от 0,05 до 0,22 по массе. Меры прецизионности для данного метода измерений не превышают критериев приемлемости как для внутрилабораторной прецизионности  $1,50\% < 10\%$ , так и для межлабораторной прецизионности  $8,06\% < 15\%$ , что указывает на удовлетворительную воспроизводимость методики.

Таблица 2

Результаты оценки воспроизводимости методики

			Лаборатория № 1			Лаборатория № 2			
Уровни			1	2	3	1	2	3	
Объем аликвоты раствора А, мл			0,75	1,00	1,25	0,75	1,00	1,25	
Оптическая плотность $D_1$			0,257	0,414	0,615	0,238	0,439	0,663	
Содержание антоцианов, %			6,70	10,79	16,04	6,20	11,45	17,30	
Оптическая плотность $D_2$			0,259	0,414	0,624	0,285	0,438	0,664	
Содержание антоцианов, %			6,75	10,79	16,27	7,43	11,44	17,31	
Оптическая плотность $D_3$			0,254	0,419	0,628	0,285	0,436	0,671	
Содержание антоцианов, %			6,62	10,92	16,37	7,43	11,36	17,49	
Среднее содержание антоцианов, %, $X_{cp}$			6,69	10,83	16,22	7,02	11,41	17,37	
Метрологические характеристики									
№ лабора- тории	$X_{cp}$	$S^2$	$S$	$S_x$	$S_r$	$P$ , %	$t(P, f)^*$	$\Delta x$	$\varepsilon$ , %
1	6,69	0,0043	0,0656	0,0378	0,0098	95	4,3	0,1629	2,43
1	10,84	0,0056	0,0301	0,1002	0,0069	95	4,3	0,1116	1,03
1	16,23	0,0301	0,1736	0,1002	0,0106	95	4,3	2,6561	0,01
2	7,02	0,5006	0,7075	0,4048	0,1007	95	4,3	1,7565	2,50
2	11,41	0,0051	0,0398	0,0225	0,0034	95	4,3	0,0590	0,52
2	17,37	0,0117	0,1085	0,0626	0,0062	95	4,3	0,2693	1,55

Линейность аналитической методики определяли на пяти уровнях концентрации от принятого опорного значения расчетной величины (10,86%). Образцы готовили путем изменения аликвоты (табл. 3) В ходе определения линейности установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации суммы антоцианов и описывается уравнением:  $y = 3,7422x + 1,0463$

Коэффициент корреляции близок к единице  $-0,978$ , что свидетельствует о сильной линейной

зависимости значения оптической плотности от содержания действующих веществ. График зависимости представлен на рисунке.

Правильность методики устанавливали на идентичных образцах плодов аронии черноплодной с добавлением известного количества стандартного образца (СО) цианидин-3-О-глюкозида по 3 испытания образца на трех уровнях концентраций (табл. 4).