

УДК 615.451.16

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2025.1.28 EDN: XCAXNH

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ В КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ ЛИСТЬЯХ**© Русяева Н.С., Молохова Е.И., Березина Е.С.***Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2**Резюме*

Цель. Разработка методики количественного определения хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев и определение основных валидационных характеристик.

Методика. Измерение оптической плотности проводили методом фотометрии КФК-3 «ЗОМЗ» в кювете с длиной поглощающего слоя 10 мм в диапазоне волн 550-750 нм. Пробоподготовка заключалась в дробной экстракции сырья крапивы двудомной листьев на водяной бане при температуре 85-100°C 70% этиловым спиртом, объединение извлечений и доведение используемым растворителем до 100 мл, с последующим разведением полученного раствора в соотношении 2:25 95% этиловым спиртом. Количественное определение включало измерение оптической плотности раствора относительно 95% этилового спирта в максимуме поглощения 663 ± 5 нм, вычисление содержания хлорофилла в процентах, в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Результаты. Разработана методика количественного определения содержания хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев, и проведена оценка основных валидационных характеристик (специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность). Специфичность методики подтверждается изучением спектральных характеристик, при которых установлены пики при 663 ± 5 нм и 642 ± 3 нм на спектрофотометре. Методика количественного определения линейна в аналитической области в интервале от 0,5 до 1,5 г, относительная ошибка единичного определения составляет 10,53%. Прецизионность методики подтверждается доверительным интервалом ($P=95\%$) $0,2849\pm0,0256\%$ и стандартным отклонением 0,0245%. Установлены оптимальные условия экстракции хлорофиллов из крапивы двудомной листьев: температура 85-100°C, дробная экстракция в течении часа, использование 70% этилового спирта для экстракции и 95% для последующего разведения полученного после экстракции раствора.

Заключение. Разработанная методика валидна и пригодна для количественного определения содержания хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев.

Ключевые слова: хлорофилл, крапива двудомная, количественное определение, фотометрия

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF CHLOROPHYLL CONTENT IN URTICA DIOICA LEAVES**Rusaeva N.S., Molokhova E.I., Berezina E.S.***Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya St., 614990, Perm, Russia**Abstract*

Objective. Development of a methodology for the quantitative determination of chlorophylls isolated from *Urtica dioica* leaves and determination of the main validation characteristics.

Methods. The optical density was measured by the KKK-3 "ZOMZ" photometry method in a cuvette with an absorbing layer length of 10 mm in the wavelength range of 550-750 nm. Sample preparation consisted in fractional extraction of raw *Urtica dioica* leaves in a water bath at a temperature of 85-100°C with 70% ethyl alcohol, combining the extracts and bringing the solvent used to 100 ml, followed by dilution of the resulting solution in a ratio of 2:25 with 95% ethyl alcohol. The quantitative determination included measuring the optical density of the solution relative to 95% ethyl alcohol at an absorption maximum of 663 ± 5 nm, calculating the chlorophyll content as a percentage, in terms of completely dry raw materials.

Results. A method has been developed for the quantitative determination of the content of chlorophylls isolated from *Urtica dioica* leaves, and an assessment of the main validation characteristics (specificity, analytical domain, linearity, correctness, precision) has been carried out. The specificity of the technique is confirmed by studying the spectral characteristics, at which peaks were established at 663 ± 5 nm and 642 ± 3 nm on a spectrophotometer. The method of quantitative determination is linear in the analytical domain in the range from 0.5 to 1.5 g, the relative error of a single determination is 10.53%. The precision of the technique is confirmed by a confidence interval ($P=95\%$) of $0.2849\pm0.0256\%$ and a standard deviation of 0.0245%. Optimal conditions for the extraction of chlorophylls from *Urtica dioica* leaves have been established: temperature $85-100^{\circ}\text{C}$, fractional extraction within an hour, the use of 70% ethyl alcohol for extraction and 95% for subsequent dilution of the solution obtained after extraction.

Conclusion. The developed technique is valid and suitable for the quantitative determination of the content of chlorophylls isolated from *Urtica dioica* leaves.

Keywords: chlorophyll, *Urtica dioica*, quantitative determination, photometry

Введение

По химической структуре хлорофиллы представляют собой сложные эфиры дикарбоновой хлорофиллиновой кислоты и 2 остатков метанола и фитола, являясь при этом магниевыми комплексами тетрапирролов. В настоящее время хлорофиллы используются в пищевой промышленности в качестве пигментов и в медицинской практике в виде растворов для наружного применения. Имеются исследования, показывающие наличие биологической активности хлорофиллов при пероральном применении- стимуляция гемопоэза [5]. Наличие данного вида биологической активности обосновывается схожей химической структурой хлорофилла со структурой гема- важного составляющего гемоглобина. В связи с этим, актуальна разработка лекарственных препаратов для перорального применения на основе хлорофиллов. [5]

Большая часть препаратов и биологически активных добавок (БАДов) на данный момент производится на основе хлорофиллов, выделенных из листьев эвкалипта и шелковицы, люцерны травы и т.д. Обращает внимание растительное сырье крапивы двудомной листья (*Urtica dioica* L. (сем. Крапивные – *Urticaceae*)), так как оно содержит большое количество хлорофиллов и имеет значительные запасы сырья в Российской Федерации, в том числе и на Урале, неприхотливо к погодным условиям и производит большие объемы зеленой массы. В связи с этим является перспективным расширение использования фармакопейного сырья крапивы двудомной листьев в фармации. [10]

Для разработки лекарственных препаратов на основе хлорофиллов из крапивы двудомной листьев необходимо выбрать оптимальные условия их экстрагирования из сырья и методики количественного определения хлорофиллов в полученных извлечениях. Актуальность определения условий экстракции и количественного определения хлорофиллов в растительном сырье подтверждается публикациями современных исследователей по изучению шлемника байкальского и обыкновенного [11], облепихи крушиновидной [6], кукурузы [3] и т.д.

Цель исследования – разработка методики количественного определения хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев и определение основных валидационных характеристик.

Методика

Количественное содержание хлорофиллов определяли в сырье крапивы двудомной листьев АО «Красногорсклексредства» (серия: 30222, дата производства: 02/2022, срок годности 3 года). Для вычисления потери в массе при высушивании сырье высушивалось в анализаторе влажности «Эвлас-2М» в течение часа при 100°C . [2]. Определение оптической плотности проводили на фотометре КФК-3 «ЗОМЗ» в кювете с длиной поглощающего слоя- 10 мм. Оптическую плотность определили трижды, после чего вычисляли среднее значение.

Пробоподготовка заключалась в дробной экстракции в течение часа по 30 мин каждая измельченного сырья с размером частиц 1,0 мм на водяной бане при температуре 100°C 70% этиловым спиртом в соотношении сырье:экстрагент 1:100, объединение извлечений и доведение

используемым растворителем до 100 мл, с последующим разведением полученного раствора в соотношении 2:25 95% этиловым спиртом.

Количественное определение включало измерение оптической плотности раствора относительно 95% этилового спирта в максимуме поглощения 663 ± 5 нм, вычисление содержания хлорофилла в процентах, в пересчете на абсолютно сухое сырьё, по формуле:

$$x = \frac{A * 25 * 100 * 100 * 100}{m * 944,5 * 2 * 100 * (100 - W)}$$

, где: A – оптическая плотность раствора в соответствующем максимуме поглощения; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, % ($W = 5,41\%$); 944,5 – удельный показатель поглощения хлорофилла при 663нм [9].

В ходе пробоподготовки установлено, что экстракция начинается при температуре водяной бани 85°C (температура кипения этилового спирта).

С целью выбора оптимального метода экстракции и количественного определения, опробована методика, описанная в статье [3]. Содержание хлорофиллов вычисляется по формуле [3]:

$$C_{\text{мл}} = \frac{A}{10mb}$$

, где: A оптическая плотность фотометрируемого раствора; b – тангенс угла наклона градуировочного графика; m – масса навески, г.

Общее содержание хлорофиллов определялось фотометрическим методом градуировочного графика, построенного с использованием реактива Гетри. Для экстракции использовали 80% раствор ацетона.

Методика анализа: Навеску листьев массой 0,1 г помещали в фарфоровую ступку, добавляли на кончике шпателя сухой карбонат кальция и растирали с 2-3 мл 80% ацетона, затем добавляли 10 мл раствор ацетона и продолжали растирать в течение 5 мин. Полученную вытяжку фильтровали в мерную колбу на 25 мл. Экстракцию проводили повторно с порцией чистого растворителя, добиваясь полного обесцвечивания тканей листа. Объём вытяжки доводили до метки. Фотометрирование вытяжки проводили при 670 нм, раствор сравнения – 80% раствор ацетона, в кюветах длиной 1 см. Анализ проводили при комнатной температуре на рассеянном свете, не допуская попадания прямых солнечных лучей, так как фотоокисление хлорофилла приводит к искажению результатов анализа. [3] Электронные спектры (рис. 1) поглощения измеряли на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 в кюветах с толщиной поглащающего слоя 10 мм в диапазоне волн 550-750 нм. При изучении спектральных характеристик извлечений из крапивы двудомной листьев наблюдали максимум поглощения в области 663 ± 5 нм, свойственный для хлорофилла А и пики в области 642 ± 3 нм, свойственные для хлорофилла Б [4], что свидетельствует о количественном преимуществе хлорофилла А в крапиве двудомной листьях.

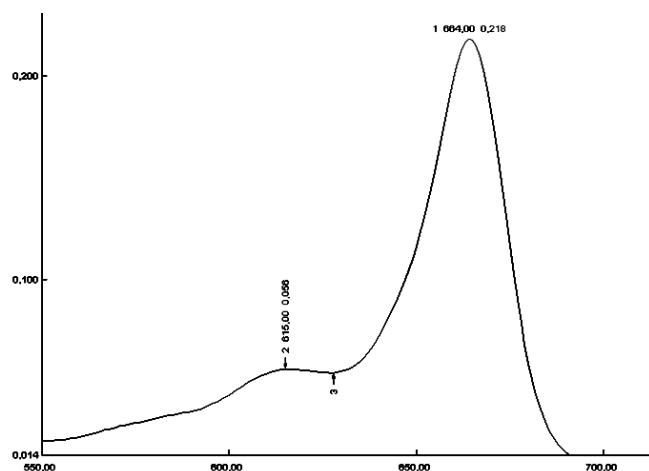


Рис. 1. Спектр поглощения спиртового извлечения из крапивы двудомной листьев

Результаты исследования и их обсуждение

Специфичность методики оценивали по совпадению положения максимумов на спектрах поглощения индивидуальных хлорофиллов и исследуемого извлечения (рис. 1). Для хлорофиллов характерен максимум поглощения, расположенный при 663 нм [7, 11]. Линейность определяли на 5 уровнях концентраций: 91%, 96%, 100%, 107%, 109%, которые указаны в табл. 1.

Таблица 1. Уровни концентраций для определения линейности

Количественное содержание хлорофилла, %	Оптическая плотность
0,2462	0,088
0,2611	0,140
0,2714	0,194
0,2896	0,259
0,2956	0,318

График, уравнение линейности и коэффициент аппроксимации представлены на рис. 2. Коэффициент корреляции (R^2) при интервале навески 0,5 – 1,5 г = 0,9814. Аналитическая область валидируемой методики количественного определения находится в интервале от 0,5 до 1,5 г. За номинальное значение принята навеска сырья массой 1 г.

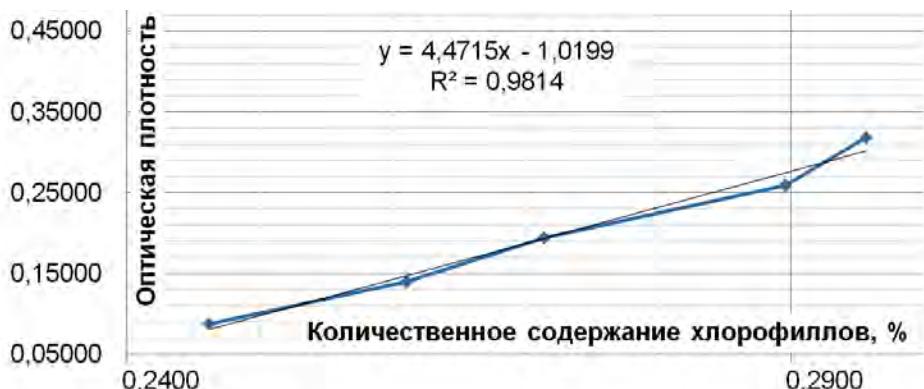


Рис. 2. График линейности методики

Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 2)

Таблица 2. Прецизионность методики определения хлорофиллов ($P=95\%$; $n=6$)

Проба	Оптическая плотность	Содержание, %
1	0,224	0,2527
2	0,194	0,2714
3	0,197	0,2751
4	0,212	0,2913
5	0,189	0,2938
6	0,209	0,3249

Примечание: наименьшее значение, % = 0,2527; наибольшее значение, % = 0,3249; среднее значение, % = 0,2849; доверительный интервал ($p=95\%$), % = $0,2849 \pm 0,0256$; стандартное отклонение, % = 0,0245

Проведена метрологическая оценка валидированной методики согласно ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [2]. Относительная ошибка единичного определения составляет 10,53% (с доверительной вероятностью 95%) (табл. 3).

В результате проведённых исследований в качестве критерия качества сырья по показателю «Количественное определение» можно предложить регламентировать содержание суммы хлорофиллов – не менее 0,2%.

С целью выбора оптимального метода экстракции и количественного определения, опробована методика с использованием метода фотометрии по градуировочному графику с реагентом Гетри [3].

Таблица 3. Метрологическая характеристика методики определения хлорофиллов ($P=95\%$; $n=6$)

n	f	\bar{x}	s^2	$s_{\bar{x}_f}$	RSD _x	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	\bar{e}
6	5	0,2849	0,0006	0,0349	3,49	0,0256	0,2849±0,03	10,53

Для построения градуировочного графика (рис. 3) использовали стандартный раствор реагента Гетри в 7 разведениях, которые соответствуют определенному содержанию хлорофилла. Зависимость оптической плотности от концентрации хлорофилла в реагенте Гетри представлена в табл. 4.

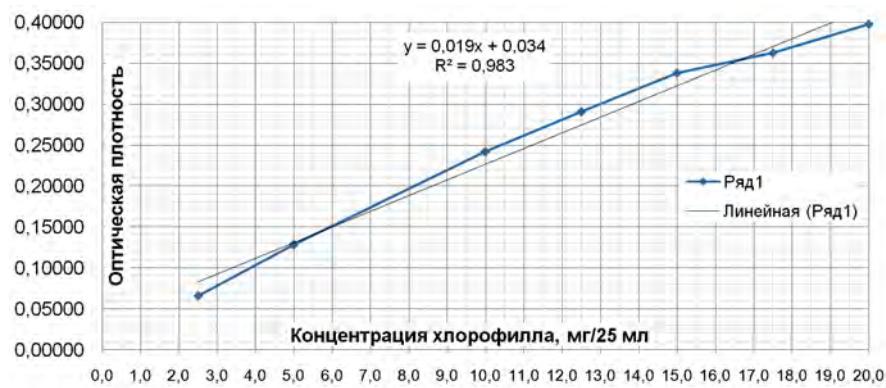


Рис. 3. Градуировочный график для определения содержания хлорофилла

Таблица 4. Зависимость оптической плотности от концентрации хлорофилла

Объём реагента Гетри, мл	Концентрация хлорофилла, мг/25 мл	Оптическая плотность
2,5	0,21	0,066
5,0	0,42	0,128
10,0	0,85	0,242
12,5	1,06	0,291
15,0	1,27	0,338
17,5	1,48	0,363
20,0	1,70	0,398

По полученным результатам, представленным в табл. 5, можно сделать вывод, что методика неповторяется, с заниженными результатами количественного содержания хлорофиллов.

Таблица 5. Содержание хлорофилла с реагентом Гетри

Масса навески, г	Оптическая плотность	Содержание хлорофиллов, %
0,1001	0,345	0,1803
0,1001	0,291	0,1521
0,1022	0,091	0,0466
0,1018	0,124	0,0637
0,1025	0,121	0,0618
0,1006	0,080	0,0416

Сравнительным анализом двух опробованных методик определения содержания хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев, установлено, что более точной является методика с использованием удельного показателя поглощения хлорофилла [9].

Для оценки перспективности крапивы двудомной листьев в качестве источника хлорофиллов, представлялось интересным сравнить полученные данные по их содержанию в образцах с литературными данными [1, 6-8] других представителей растительного сырья (табл. 6).

При этом установлено, что содержание хлорофиллов в различных видах растительного сырья находится в диапазоне от 0,1 до 0,75%. Результаты исследования показывают необходимость оптимизации метода экстракции и количественного определения хлорофиллов из крапивы двудомной листьев с целью увеличения выхода хлорофиллов.

Таблица 6. Литературные данные по содержанию хлорофиллов в образцах других представителей растительного сырья

№	Название вида растительного сырья	Содержание хлорофиллов, %
1	Tanacetum achilefolium (M. Bieb.) Sch. Bip	0,652
2	Potentilla glaucescens Schlehd.	0,581
3	Salvia stepposa Des.-Shost	0,469
4	Artemisia austriaca Jacq.	0,512
5	Fragaria viridis (Duchesne) Weston	0,450
6	Urtica dioica	0,60-0,75
7	Medicago sativa L.	0,2-0,4
8	Morus bombycina	0,2-0,4
9	Eucalyptus viminalis Labill. (препарат «Хлорофиллпт»)	0,1-0,5

Заключение

Разработана методика количественного определения хлорофиллов методом фотометрии в крапивы двудомной листьях, которая может быть использована для стандартизации данного лекарственного растительного сырья. Из двух опробованных методик количественного определения хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев, выбрана более точная методика с использованием удельного показателя поглощения хлорофиллов. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости.

На основании полученных результатов сделан вывод, что методика линейна и специфична. Проведена метрологическая оценка разработанной методики. Относительная ошибка единичного определения составляет 10,53%. Аналитическая область валидируемой методики количественного определения находится в интервале от 0,5 до 1,5 г. Аналитическая методика валидна и пригодна для фотометрического определения хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев.

Литература (references)

- Бойко Н.Н., Писарев Д.И., Жилякова Е.Т., Новиков О.О. Сравнительный анализ биологически активных веществ в препаратах «Эвкалипта настойка» и «Хлорофиллпт» // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – №21(11). – С. 16-23. [Bojko N.N., Pisarev D.I., Zhiljakova E.T., Novikov O.O. Voprosy biologicheskoy, medicinskoy i farmacevticheskoy himii. Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry. – 2018. – N21(11). – C. 16-23. (in Russian)]
- Государственная Фармакопея Российской Федерации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. XIV изд. Москва, 2018. [Электронный ресурс] // URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/>
- Глаз Н.В., Казакова Н.И., Уфимцева Л.В. Методические подходы к выбору условий пробоотбора и оценке содержания хлорофилла в листьях растений кукурузы // Вестник КрасГАУ. – 2015. – №3. – С. 73-76. [Glaz N.V., Kazakova N.I., Ufimceva L.V. Vestnik KrasGAU. Bulletin of the KrasSAU. – 2015. – N3. – C. 73-76. (in Russian)]
- Дерябин А.Н. Хлорофилл b // Большая российская энциклопедия: научно-образовательный портал. URL: <https://bigenc.ru/c/khlorofill-b-nt-659ca3> [Derjabin A.N. Bol'shaja rossijskaja jenciklopedija: nauchno-obrazovatel'nyj portal. The Great Russian Encyclopedia: a scientific and educational portal. URL: <https://bigenc.ru/c/khlorofill-b-nt-659ca3> (in Russian)]

5. Кабашникова Людмила. Хлорофилл - зеленое вещество жизни // Наука и инновации. – 2018. – №179. – С. 65-69. [Kabashnikova Ljudmila. *Nauka i innovacii. Science and innovation.* – 2018.]
6. Ковалёва Наталья Александровна, Тринеева Ольга Валерьевна, Колотнева Анастасия Игоревна. Разработка и валидация методики количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2023. – №4. – С. 199-207. [Kovaljova Natal'ja Aleksandrovna, Trineeva Ol'ga Valev'evna, Kolotneva Anastasija Igorevna. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii.* Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2023. – N4. – С. 199-207. (in Russian)]
7. Смирнов Е.В. Пищевые красители. URL: <https://alternativa-sar.ru/tehnologu/pishchevye-dobavki-i-ingredienteysmirnov-e-v-pishchevye-krasiteli/2490-6-9-khlorofilly#> [Smirnov E.V. – Pishhevye krasiteli. Food coloring. URL: <https://alternativa-sar.ru/tehnologu/pishchevye-dobavki-i-ingredienteysmirnov-e-v-pishchevye-krasiteli/2490-6-9-khlorofilly#> (in Russian)]
8. Сунил В., Султанова Ш.А., Сафаров Ж.Э. Влияние температуры сушки на шелковые листья // Universum: технические науки. – 2021. – №11(92). – С. 63-65. [Sunil V., Sultanova Sh.A., Safarov Zh.Je. *Universum: tehnicheskie nauki.* Universum: technical sciences. – 2021. – N11(92). – С. 63-65. (in Russian)]
9. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica L.*) // Химия растительного сырья. – 2015. – №3. – С. 105-110. [Trineeva O.V., Slivkin A.I., Safonova E.F. *Himija rastitel'nogo syr'ja.* Chemistry of plant raw materials. – 2015. – N3. – P. 105-110. (in Russian)]
10. Турышев А.Ю. Методологические основы мониторинга ресурсов дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала с использованием информационных технологий: Афтореф. дис. ... доктора фармацевтических наук. – Самара, 2022. – 42 с. [Turyshev A.J. *Metodologicheskie osnovy monitoringa resursov dikorastushhih lekarstvennyh rastenij Srednego Urala s ispol'zovaniem informacionnyh tehnologij* (doctoral dis.). Methodological foundations of monitoring the resources of wild medicinal plants of the Middle Urals using information technology (Doctoral Thesis). – Samara, 2022. – 42 p. (in Russian)]
11. Уранова В.В., Близняк О.В., Ломтева Н.А.. Определение содержания хлорофиллов а и в в надземной части растительного сырья *Scutellaria baicalensis* Georgi и *Scutellaria galericulata* L. // Тверской медицинский журнал. – 2023. – №1. – С. 279-282. [V.V. Uranova, O.V. Bliznjak, N.A. Lomteva. *Tverskoj medicinskij zhurnal.* Tver Medical Journal. – 2023. – N1. – P. 279-282. (in Russian)]

Информация об авторах

Русаева Наталья Сергеевна – аспирант кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: rusaeva.00@mail.ru

Молохова Елена Игоревна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: profmol17@gmail.com

Березина Елена Станиславовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: berezina.e.s@yandex.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.01.2025

Принята к печати 20.03.2025