







Т.А. Голомазова 
Е.П. Шефер 
С.С. Прохвятилова 
Н.П. Антонова 

Определение аскорбиновой кислоты в лекарственных растительных препаратах методом ВЭЖХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Голомазова Татьяна Александровна; golomazovata@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Аскорбиновая кислота (витамин С) участвует во многих биохимических процессах в организме человека, необходимых для его жизнедеятельности. Одним из природных источников витамина С являются плоды шиповника, которые применяются в виде отваров и являются компонентом многих витаминных сборов. Методы количественного определения аскорбиновой кислоты, включенные в фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации, имеют ряд недостатков, что не позволяет объективно оценить содержание аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и лекарственных растительных препаратах (ЛРП).

Цель работы: разработка методики количественного определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и ЛРП методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).





Материалы и методы. Объектами исследования служили лекарственные растительные препараты «Плоды шиповника» и «Витаминный сбор № 2», стандартные образцы аскорбиновой кислоты, рутозида, кверцетина, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, лютеолин-7-глюкозида, лимонной кислоты, DL-яблочной кислоты, тиамин и пиридоксин гидрохлорида. Исследование проводили с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II с диодно-матричным детектором. Хроматографическая колонка GL Sciences Inc, Inertsil ODS-3 250 мм × 4,6 мм × 5 мкм, режим подачи подвижной фазы градиентный, аналитическая длина волны 244 нм.

Результаты: аскорбиновая кислота может быть количественно определена в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ. Надлежащие условия пробоподготовки и хроматографирования позволяют ингибировать процессы окисления аскорбиновой кислоты в водных растворах на время, достаточное для проведения полного испытания (не менее 8 ч).

Выводы: разработана высокочувствительная и селективная методика количественного определения аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ для стандартизации ЛРС/ЛРП, которая может быть рекомендована для включения в ФС «Шиповника плоды» и «Витаминный сбор № 2». Норму содержания аскорбиновой кислоты («не менее 0,2%») в ЛРС/ЛРП «Шиповника плоды» и ЛРП «Витаминный сбор № 2», установленную с помощью титриметрического метода, не рекомендуется снижать при переходе на использование метода ВЭЖХ. Проблема заниженного содержания аскорбиновой кислоты в подавляющем количестве испытуемых образцов шиповника, возможно, связана с использованием низковитаминных видов шиповника секции *Rosa caninae*, которые должны применяться только как желчегонное средство.

Ключевые слова: шиповника плоды; аскорбиновая кислота; витамин С; ВЭЖХ; высокоэффективная жидкостная хроматография; витаминный сбор; лекарственные растительные препараты

Для цитирования: Голомазова Т.А., Шефер Е.П., Прохвятилова С.С., Антонова Н.П. Определение аскорбиновой кислоты в лекарственных растительных препаратах методом ВЭЖХ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2):184–194. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-458>

T.A. Golomazova ✉ 
E.P. Shefer 
S.S. Prokhvatilova 
N.P. Antonova 

Quantitative Determination of Ascorbic Acid in Herbal Medicinal Products by HPLC

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Tatyana A. Golomazova; golomazovata@expmed.ru

ABSTRACT

Ascorbic acid (vitamin C) is involved in many vital biochemical processes in the human body. Rose hips are a natural source of ascorbic acid. Rose hips are used in decoctions and many vitamin herbal teas. Russian compendial methods for the quantitative determination of ascorbic acid have certain limitations precluding its objective measurement in herbal drugs, herbal drug preparations, and herbal medicinal products.

The aim of the study was to develop an analytical procedure for the quantitative determination of ascorbic acid in herbal drugs, herbal medicinal preparations, and herbal medicinal products using high performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and methods. The study involved two herbal medicinal products, Rose Hips (rose hips) and Vitamin Herbal Tea 2 (rose hips and rowan fruits), and reference standards for ascorbic acid, rutoside, quercetin, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, citric acid, DL-malic acid, thiamine, and pyridoxine hydrochloride. The authors used a 1260 Infinity II chromatograph with a diode array detector by Agilent and an Inertsil ODS-3 chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by GL Sciences. The HPLC system was operated in gradient elution mode, and the detector was set at 244 nm.

Results. Ascorbic acid content in herbal drugs, herbal medicinal preparations, and herbal medicinal products can be determined by HPLC. Adequate sample preparation and chromatography conditions allow for inhibiting ascorbic acid oxidation in aqueous solutions for a period sufficient to complete testing (not less than 8 h).

Conclusions. The authors developed a highly sensitive and selective HPLC procedure for the quantitative determination of ascorbic acid intended for the standardisation of herbal drugs, herbal medicinal preparations, and herbal medicinal products. The procedure is worthy of inclusion in the Rose Hips and Vitamin Herbal Tea 2 monographs of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Switching to HPLC should not require lowering the limit for ascorbic acid (not less than 0.2%) established in the Rose Hips and Vitamin Herbal Tea 2 monographs for the titration method. The ascorbic acid content was below this limit in the vast majority of study samples. However, this discrepancy may be explained by the presence of dog rose (*Rosa canina*) species low in vitamin C, which should normally be used only as cholagogues.

Key words: Rose hips; dog rose fruits; *Rosae fructus*; ascorbic acid; vitamin C; HPLC; high performance liquid chromatography; vitamin herbal tea; herbal drugs; herbal medicinal preparations; herbal medicinal products

For citation: Golomazova T.A., Shefer E.P., Prokhvatilova S.S., Antonova N.P. Quantitative determination of ascorbic acid in herbal medicinal products by HPLC. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(2):184–194. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-458>

Введение

Аскорбиновая кислота (АК), или витамин С, относится к классу водорастворимых витаминов и является важным элементом биохимических

процессов, протекающих в организме человека. Один из растительных источников витамина С — плоды шиповника, которые применяются в виде отваров и являются компонентом

многих витаминных сборов и лекарственных растительных препаратов (ЛРП). Помимо витамина С (0,10–7,44%) в плодах шиповника содержатся рибофлавин (витамин В₂), β-каротин (провитамин А), филлохинон (витамин К₁), биофлавоноиды (витамин Р), тиамин (витамин В₁), органические кислоты (яблочная, лимонная), флавоноиды, пектиновые вещества, жирные кислоты, дубильные вещества и сахара. В современной медицинской практике плоды шиповника используются в качестве поливитаминного и желчегонного средства¹.

Витаминная активность плодов шиповника различна и зависит от вида производящего растения. К высоковитаминным видам шиповника (содержание АК 2,46–7,44%) относят шиповники секции *Rosa cinnamomea* (коричный (майский), даурский, иглистый, кокандский, морщинистый, шиповник Беггера, Уэбба, Федченко), к низковитаминным (содержание АК 0,10–2,16%) – шиповники секции *Rosa caninae* (собачий, щитконосный, мелкоцветковый, песколюбивый, войлочный, зангезурский) [1].

В Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ) и Государственной фармакопее Республики Беларусь² представлены титриметрические методы определения содержания АК в лекарственном растительном сырье (ЛРС), к недостаткам которых можно отнести:

- высокую погрешность измерений, связанную с субъективностью визуального установления точки эквивалентности, особенно в окрашенных извлечениях из ЛРС;
- низкую специфичность, являющуюся следствием того, что извлечения из ЛРС и ЛРП содержат сумму биологически активных веществ с восстанавливающими свойствами.

В Европейской и Британской фармакопеех для обнаружения АК в ЛРС предложен метод спектрофотометрии, основанный на измерении светопоглощения продукта взаимодействия динитрофенилгидразина с АК в сернохлорной среде при длине волны 520 нм³. Метод отличается значительной длительностью проведения испытания, трудоемкостью и нестабильностью окрашенного продукта реакции. Также не учитывается термолабильность АК, так как методика предполагает длительное нагревание раствора АК при 50 °С.

В источниках литературы можно найти много примеров определения АК методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в таких объектах, как лекарственные препараты, продукты питания и биологические жидкости (см., например, [2–4]). Подавляющее большинство этих методик не учитывают специфику объекта, не валидированы или нуждаются в коррекции и поэтому не могут быть использованы в анализе ЛРП. Ключевой проблемой количественного определения АК является стабильность ее растворов, поскольку водные растворы АК очень чувствительны к воздействию света и кислорода воздуха, повышенной температуре, pH и присутствию ионов металлов. В связи с этим необходим подбор оптимальных условий испытаний и получение водных растворов АК, устойчивых при проведении анализа.

Цель работы – разработка методики определения содержания АК в ЛРП и ЛРС, которая может быть рекомендована для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации при пересмотре ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды» и при разработке ФС на «Витаминный сбор № 2».

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы образцы ЛРП «Шиповника плодов» отечественных производителей (7 серий) и «Витаминный сбор № 2» (1 серия). Испытания выполняли в трех параллельных экспериментах с расчетом стандартного и относительного стандартного отклонений. Стандартные образцы: L-аскорбиновая кислота, Sigma-Aldrich, кат. № A5960, серия SLCC2154, содержание 100,0%; кофейная кислота Sigma-Aldrich, кат. № C0625, серия SLCC6298, содержание 98,5%; лимонная кислота Sigma-Aldrich, кат. № 33114, серия STBJ5337, содержание 100,2%; хлорогеновая кислота Sigma-Aldrich, кат. № C3878, серия WXBD1890V, содержание 96,0%; галловая кислота Sigma-Aldrich, кат. № G7384, серия SLBW1278, содержание 99,5%; яблочная кислота Sigma-Aldrich, кат. № 240176, серия STBL2344, содержание 99,2%; тиамин EP CRS, кат. № Y0000467, серия 2.0; пиридоксина гидрохлорид EP CRS, кат. № P4100000, серия 2.0; рутозид EP CRS, кат. № Y0000105, серия 4.0, содержание 88,8%; кверцетин USP RS, кат. № 1592409, серия R120F0, содержание 89,1%;

¹ Быков ВА, ред. Атлас лекарственных растений России. ВИЛАР; 2006.

² Шиповника плоды. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2. Минск; 2008.

³ ФС 2.5.0106.18. Шиповника плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

³ Monograph. 07/2019:1510 Dog Rose. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

Dog Rose. Monograph. British Pharmacopoeia. Vol. III. London; 2009.

лютеолин-7-глюкозид USP RS, кат. № 1370837, серия R121A0, содержание 96,0%.

Использованное оборудование: жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity II; хроматографическая колонка: Inertsil ODS-3, 250 мм × 4,6 мм × 5 мкм (GL Sciences); электронные весы XPE205DR (Mettler Toledo); pH-метр/иономер SevenCompact S220 (Mettler Toledo), система очистки воды Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore), шейкер орбитальный KS 501 digital (IKA Works), центрифуга Sigma 2-16 (Sartorius), мельница MF 10 basic (IKA Works), сушильный шкаф ED 53 (Binder).

В качестве экстрагента и растворителя использовали 0,01 М водный раствор щавелевой кислоты (ЩК) (Sigma-Aldrich, кат. № 75688, содержание 99,7%).

Точную навеску ЛРП массой ~2,5 г, измельченную до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещали в мерную колбу темного стекла объемом 250 мл и прибавляли 100 мл растворителя. Полученный раствор встряхивали на орбитальном шейкере в течение 20 мин, затем центрифугировали со скоростью 5000 мин⁻¹ в течение 5 мин. Супернатант фильтровали через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы (размер пор 0,45 мкм), отбрасывая первые 1–2 мл фильтрата. В качестве стандартного раствора использовали 0,004% раствор АК в растворителе.

Приготовление испытуемого и стандартного растворов проводили в защищенном от света

Таблица 1. Программа градиентного элюирования для количественного определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном препарате

Table 1. Gradient elution programme for the quantitative determination of ascorbic acid in herbal medicinal products

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза Б, % Mobile phase B, %
0	100	0
8	100	0
10	50	50
17	50	50
19	100	0
25	100	0

Примечание. Подвижная фаза А – фосфатный буферный раствор с pH 3,0 (1)⁴, подвижная фаза Б – ацетонитрил.

Note. Mobile phase A: phosphate buffer solution, pH 3.0 (1)⁴; mobile phase B: acetonitrile.

месте с использованием мерных колб темного стекла. Готовые растворы немедленно перенесли в виалы для светочувствительных образцов и отправляли в термостат автосамплера, где поддерживалась необходимая температура для проведения испытания.

Испытание проводили в условиях градиентного элюирования (табл. 1) на обращенно-фазовой колонке Inertsil ODS-3. Детектирование осуществляли с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 244 нм. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура колонки – 30 °С, температура термостата автосамплера – 4 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл. Время удерживания АК в описанных условиях составило ~5,5 мин, время удерживания ЩК ~2,7 мин (рис. 1).

Результаты и обсуждение

Для подтверждения специфичности методики была проведена оценка спектральной чистоты пиков аскорбиновой кислоты на хроматограммах растворов стандартного и испытуемого образцов с использованием спектрофотометрического детектора с диодной матрицей; полученные результаты: более 99,9%.

Спектры основных пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов идентичны и имеют один максимум поглощения при 244 нм (рис. 2). Времена удерживания АК на хроматограммах раствора стандартного образца АК и испытуемых образцов ЛРС совпадают, пик АК на хроматограммах подвижной фазы и растворителя отсутствует. Присутствие в водном извлечении других веществ не влияет на определение АК, что показано с помощью растворов стандартных образцов аскорбиновой кислоты, рутозида, кверцетина, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, лютеолин-7-глюкозида, лимонной кислоты, DL-яблочной кислоты, тиамин и пиридоксина гидрохлорида в растворителе (рис. 3).

Основной проблемой при разработке метода количественного определения АК в ЛРП является стабильность АК. Для ее решения в качестве экстрагента был использован 0,01 М водный раствор ЩК, так как:

- ЩК образует с ионами металлов прочные хелатные комплексы, что ингибирует процесс катализа реакций дегградации АК ионами металлов;
- 0,01 М раствор ЩК обеспечивает необходимую для экстракции АК кислую реакцию среды – pH около 2,3 [5];

⁴ ОФС.1.3.0003.15. Буферные растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

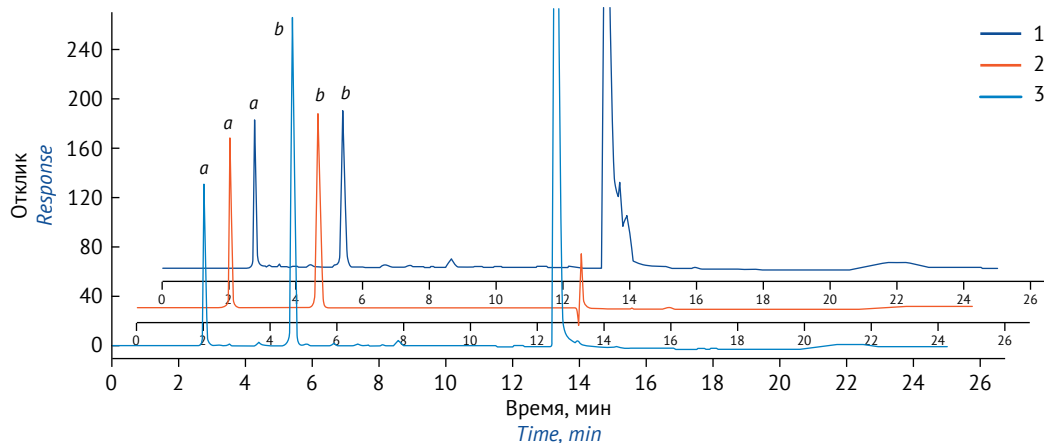


Рис. 1. Типичные хроматограммы: 1 – испытуемого раствора Шиповника плодов; 2 – раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты; 3 – испытуемого раствора Витаминного сбора № 2; а – пик щавелевой кислоты; b – пик аскорбиновой кислоты

Fig. 1. Characteristic chromatograms: 1, test solution of Rose Hips (rose hips); 2, ascorbic acid standard solution; 3, test solution of Vitamin Herbal Tea 2 (rose hips and rowan fruits); a, oxalic acid peak; b, ascorbic acid peak

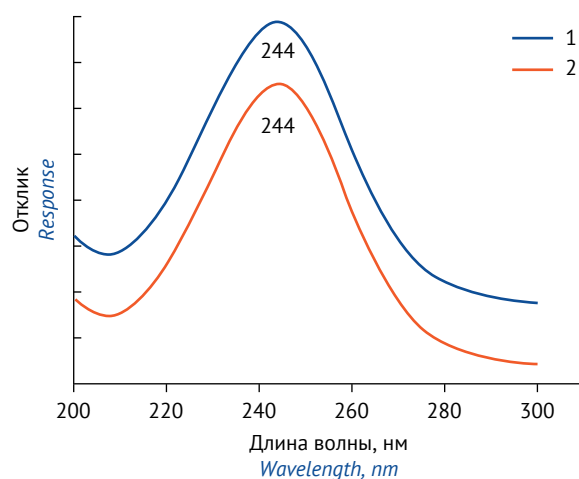


Рис. 2. УФ-спектры поглощения: 1 – раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты; 2 – испытуемого раствора Шиповника плодов

Fig. 2. UV absorption spectra: 1, ascorbic acid standard solution; 2, test solution of Rose Hips (rose hips)

- при хроматографировании ЩК не препятствует определению АК, так как детектируется по отдельному пику (разрешение между вышеуказанными пиками – 17).

Таким образом, 0,01 М раствор ЩК в качестве экстрагента способен стабилизировать АК в разбавленных растворах в течение 8 ч, что достаточно для проведения полного комплекса хроматографических испытаний; колебания определяемой концентрации растворов находятся в пределах допустимой погрешности метода (рис. 4).

Следующей задачей являлся подбор условий пробоподготовки, обеспечивающих полноту экстракции. Согласно ФС.2.5.0106.18 ГФ РФ

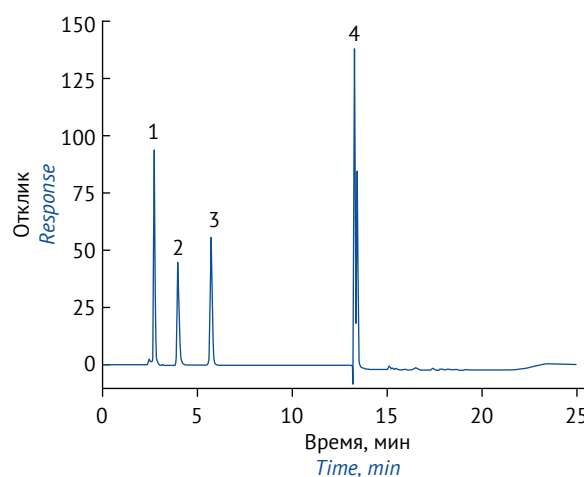


Рис. 3. Хроматограмма раствора смеси стандартных образцов аскорбиновой кислоты, рутозида, кверцетина, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, лютеолин-7-глюкозида, лимонной кислоты, DL-яблочной кислоты, тиамин и пиридоксина гидрохлорида в растворителе: 1 – пик щавелевой кислоты; 2 – пик тиамин; 3 – пик аскорбиновой кислоты; 4 – неделиющиеся пики кверцетина, рутозида, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, лютеолин-7-глюкозида, лимонной кислоты, DL-яблочной кислоты и пиридоксина гидрохлорида

Fig. 3. Chromatogram of mixed reference standards (ascorbic acid, rutoside, quercetin, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, citric acid, DL-malic acid, thiamine, and pyridoxine hydrochloride) in solvent: 1, oxalic acid peak; 2, thiamine peak; 3, ascorbic acid peak; 4, unresolved peaks of quercetin, rutoside, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, citric acid, DL-malic acid, riboflavin, and pyridoxine hydrochloride

«Шиповника плоды» продолжительность экстракции составляет 10–120 мин. В проведенных нами исследованиях максимальное извлечение АК наблюдалось через 20 мин экстракции (рис. 5). Дальнейшее увеличение времени

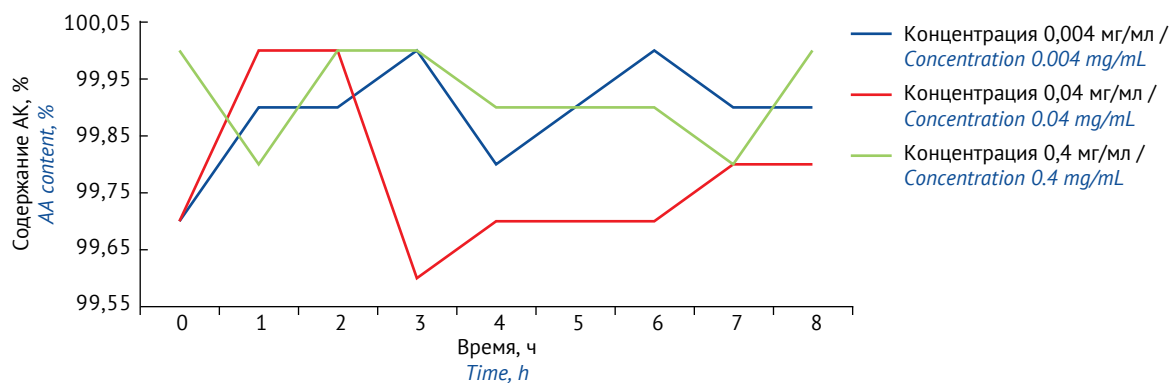


Рис. 4. Результаты исследования стабильности растворов аскорбиновой кислоты (АК)

Fig. 4. Results of the ascorbic acid (AA) stability study

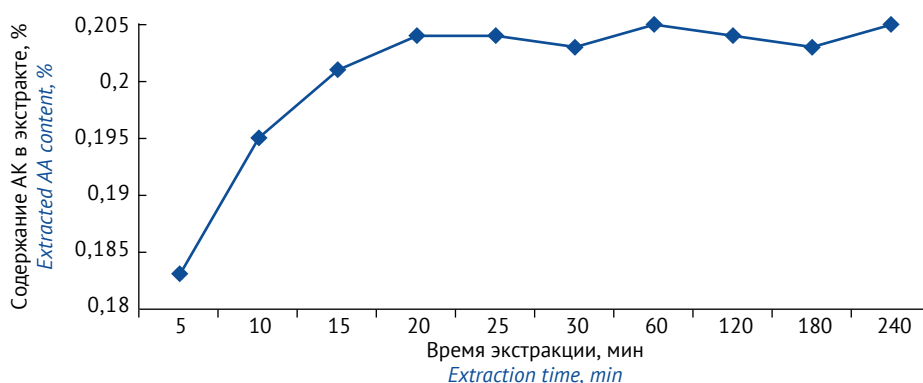


Рис. 5. Содержание аскорбиновой кислоты (АК) в извлечениях в зависимости от продолжительности экстракции

Fig. 5. Correlation between the ascorbic acid (AA) content in extracts and extraction time

экстрагирования не приводило к изменению определяемой концентрации АК в испытуемом растворе. Экстракция проводилась без нагревания из-за термолабильности АК, а также из-за многокомпонентности состава ЛРС, так как при повышении температуры в процессе экстрагирования наблюдается появление дополнительных пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Был подобран профиль градиентного элюирования. Наиболее соответствующей поставленным задачам была признана подвижная фаза состава ацетонитрил – фосфатный буферный раствор с рН 3,0 (табл. 1). Значение рН буферного раствора 3,0 оптимально, так как, с одной стороны, является щадящим для используемых хроматографических колонок, а с другой – позволяет сохранить АК в неионизированном состоянии (pK_a АК-4), что важно для получения стабильных времен удерживания.

В ходе испытания установлено содержание АК в различных образцах ЛРП «Шиповника плоды» разных производителей (табл. 2). Только один образец из семи соответствует требованиям

фармакопейной статьи «Шиповника плоды» ГФ РФ по разделу «Количественное определение АК». В остальных образцах содержание АК ниже в несколько раз, а в отдельных случаях АК содержится в следовых количествах. Низкое содержание АК в препарате может быть связано с использованием в качестве сырья плодов низковитаминных сортов шиповника, нарушением технологии сбора и сушки сырья, а также нарушением условий хранения лекарственного растительного препарата [6, 7].

Определение содержания АК в образцах плодов шиповника титриметрическими методиками показало более высокие результаты по сравнению с методикой ВЭЖХ (табл. 2). Необходимо отметить, что при титровании окрашенных водных извлечений нечеткий интервал перехода окраски затрудняет определение конечной точки титрования, что, в свою очередь, может привести к увеличению погрешности измерений.

В частях гипантия шиповника, отобранного из Витаминного сбора № 2, содержание АК составило 1,319% (RSD 0,52%), в плодах рябины витаминного сбора № 2 АК не обнаружена.

Таблица 2. Количественное определение аскорбиновой кислоты в плодах шиповника с использованием различных методик

Table 2. Quantitative determination of ascorbic acid in rose hips by different analytical procedures

Номер и наименование образцов <i>Sample number and name</i>	Результат, % <i>Result, %</i>		
	ВЭЖХ <i>HPLC</i>	Йодатометрия <i>Iodine titration</i>	Индофенольная методика <i>Indophenol titration</i>
Шиповника плоды, плоды цельные, производитель 1 <i>Rose hips, whole, manufacturer 1</i>	0,005 (RSD 1,72%)	0,010 (RSD 3,00%)	0,012 (RSD 3,25%)
Шиповника плоды, плоды-порошок, производитель 2 <i>Rose hips, powdered, manufacturer 2</i>	0,205 (RSD 0,65%)	0,305 (RSD 2,24%)	0,302 (RSD 2,80%)
Шиповника плоды, плоды цельные, производитель 3 <i>Rose hips, whole, manufacturer 3</i>	0,106 (RSD 0,95%)	0,162 (RSD 2,84%)	0,159 (RSD 1,49%)
Шиповника плоды, плоды-порошок, производитель 3 <i>Rose hips, powdered, manufacturer 3</i>	0,065 (RSD 1,21%)	0,110 (RSD 2,47%)	0,110 (RSD 2,09%)
Шиповника плоды, плоды цельные, производитель 4 <i>Rose hips, whole, manufacturer 4</i>	0,005 (RSD 1,83%)	0,011 (RSD 3,09%)	0,010 (RSD 3,12%)
Шиповника плоды, плоды-порошок, производитель 5 <i>Rose hips, powdered, manufacturer 5</i>	0,006 (RSD 1,67%)	0,015 (RSD 3,29%)	0,012 (RSD 3,05%)
Шиповника плоды, плоды цельные, производитель 6 <i>Rose hips, whole, manufacturer 6</i>	0,100 (RSD 0,46%)	0,158 (RSD 2,51%)	0,154 (RSD 2,11%)
Витаминный сбор № 2, сбор измельченный, производитель 3 <i>Vitamin Herbal Tea 2, cut, manufacturer 3</i>	0,302 (RSD 1,00%)	0,446 (RSD 1,99%)	0,440 (RSD 2,07%)

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение. Определение методом иодатометрии и по индофенольной методике проводили согласно ФС.2.5.0106.18. Шиповника плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.

Note. RSD, relative standard deviation. The iodine and indophenol titration procedures corresponded to the Rose Hips monograph (ФС.2.5.0106.18) of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, ed. XIV.

В плодиках-орешках шиповника, в среднем составляющих около 48% от всего плода, АК практически отсутствует и составляет 0,001% (RSD 1,88%). Из полученных результатов следует, что в подавляющем большинстве ЛРП, содержащих плоды шиповника и представленных в аптечных организациях, использованы низковитаминные виды шиповника.

Была проведена оценка пригодности хроматографической системы по хроматограмме стандартного образца АК по следующим параметрам:

- значение асимметрии пика АК – 1,03;
- эффективность колонки по пику АК – 11904 теоретические тарелки;
- относительное стандартное отклонение площади пика АК для 6 определений – 0,65%;
- разрешение между пиками ЩК и АК – 17,04.

С учетом фактически полученных результатов для оценки пригодности хроматографической системы были установлены следующие требования:

- значение асимметрии пиков АК на хроматограммах раствора стандартного образца должно составлять 0,8–1,5;
- эффективность колонки по пику АК на хроматограмме раствора стандартного образца

должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение площади пика АК на хроматограммах раствора стандартного образца для 6 определений должно составлять не более 2,0%.

Содержание АК в ЛРП в процентах, в пересчете на абсолютно сухое сырье (X), вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 5 \times 100 \times P \times 100 \times 100}{S_0 \times a \times 50 \times 25 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{S \times a_0 \times P \times 40}{S_0 \times a \times (100 - W)} \quad (1)$$

где: S – площадь пика АК на хроматограмме раствора испытуемого образца; S_0 – площадь пика АК на хроматограмме раствора стандартного образца; a – навеска испытуемого ЛРП, г; a_0 – навеска стандартного образца АК, г; P – содержание основного вещества в стандартном образце АК, %; W – содержание влаги в ЛРП, %.

По результатам проведенного исследования предложено сохранить значение нормы содержания АК в ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды» «не менее 0,2%».

В ходе проведения валидационных исследований⁵ методики получены результаты, соответствующие критериям приемлемости (табл. 3).

Выводы

1. Разработана высокочувствительная и селективная методика количественного определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ.

2. Надлежащие условия пробоподготовки и хроматографирования позволяют ингибировать процессы окисления аскорбиновой кислоты в водных растворах на время, достаточное для проведения полного испытания (не менее 8 ч).

3. В соответствии с данными по валидации методика пригодна для количественного

Таблица 3. Результаты валидационных исследований методики количественного определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном препарате «Шиповника плоды»

Table 3. Validation results for the analytical procedure for ascorbic acid quantification in the Rose Hips medicinal herbal product.

Характеристика <i>Parameter</i>	Требования <i>Requirements</i>	Результат <i>Result</i>	
Специфичность <i>Specificity</i>	Методика позволяет определить конкретное вещество <i>The procedure quantifies the analyte</i>	Время удерживания основного вещества испытуемого раствора соответствует времени удерживания АК стандартного раствора АК. На УФ-спектре испытуемого раствора присутствует характерный максимум поглощения (244 нм), совпадающий с максимумом поглощения УФ-спектра стандартного раствора АК <i>The retention time of the main peak in the chromatogram of the test solution corresponds to the retention time of the ascorbic acid in the chromatogram of the ascorbic acid standard solution. The UV spectrum of the test solution shows a characteristic absorption maximum which matches the absorption maximum in the UV spectrum of the ascorbic acid standard solution</i>	
	Присутствие сопутствующих компонентов не влияет на результат анализа <i>Concomitant compounds do not inadvertently affect test results</i>	Присутствие в водном извлечении других веществ не влияет на определение АК, что показано с помощью стандартных растворов рутозида, кверцетина, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, лютеолин-7-глюкозида, лимонной кислоты, DL-яблочной кислоты, тиамин, рибофлавина и пиридоксина гидрохлорида. Разрешение (R) между пиками АК и ЩК на хроматограмме стандартного раствора АК составляет 17,04 <i>Other substances present in the aqueous extract do not affect the quantitative determination of ascorbic acid, as demonstrated with standard solutions of rutinoside, quercetin, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, citric acid, DL-malic acid, thiamine, riboflavin, and pyridoxine hydrochloride. The resolution (R) between the ascorbic and oxalic acid peaks in the chromatogram of the ascorbic acid standard solution is 17.04</i>	
Линейность <i>Linearity</i>	Линейность детекции. Данные экспериментальных измерений аналитических сигналов 5 проб стандартных образцов с различным содержанием АК обработаны методом наименьших квадратов с использованием линейной модели: $y = a + bx$ <i>Detection linearity. Experimental data obtained by measuring the analytical responses from 5 samples of the ascorbic acid reference standard, with different amounts of the analyte, are processed using the least squares method and the linear model: $y = a + bx$</i> Коэффициент корреляции <i>Correlation coefficient:</i> $ r \geq 0,99$	Концентрация АК, мг/мл <i>Concentration of ascorbic acid, mg/mL</i>	Площадь пика, у.е. <i>Peak area, a.u.</i>
		0,0320	932,7158
		0,0361	1060,1256
		0,0406	1192,2615
		0,0440	1292,1061
		0,0481	1412,510
Уравнение прямой <i>Line equation</i> $y = 29720x - 15,63$ Коэффициент корреляции <i>Correlation coefficient</i> $ r = 0,9999$			
Аналитическая область <i>Range</i>	Методика применима в интервале 80–120% от номинального значения <i>The method is applicable in the range from 80 to 120% of the nominal value</i>	Соответствует на основании данных по изучению линейности <i>The linearity data confirm that the result conforms to the requirements</i>	

⁵ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018

Продолжение таблицы 3

Table 3 (continued)

Характеристика <i>Parameter</i>	Требования <i>Requirements</i>	Результат <i>Result</i>		
Правильность <i>Trueness</i>	Свободный член линейного уравнения меньше своего доверительного интервала <i>The y-intercept of the line equation is less than its confidence interval</i> $\Delta a = t(0,05, n - 2) \times s_a$ $a \leq \Delta a$	На основании данных по изучению линейности: <i>Based on the linearity data:</i> $ a = 15,63 $ $s_a = 8,04$ $t(0,05, n - 2) = 3,18$ $\Delta a = 3,18 \times 8,04 = 25,57$ $a < \Delta a$		
		Количество АК в испытуемом образце с добавками, % <i>Spiked ascorbic acid amount, %</i>	Найдено, % <i>Measured ascorbic acid amount, %</i>	Отношение найденного количества АК к количеству АК в испытуемом образце с добавками, % <i>Percent recovery of ascorbic acid, %</i>
	0,160			
		0,156		
	0,155			
	0,180	0,179	98,9	
		0,178		
		0,178		
	0,200	0,199	100,5	
		0,201		
0,203				
0,220	0,221	100,9		
	0,220			
	0,224			
0,240	0,239	99,2		
	0,240			
	0,235			
Прецизионность <i>Precision</i> Повторяемость <i>Repeatability</i>	<i>RSD</i> результатов 6 определений количественного содержания АК $\leq 3,0\%$ <i>The RSD for 6 determinations of ascorbic acid content is $\leq 3.0\%$</i>	Результаты 6 определений количественного содержания АК <i>Results of 6 determinations of ascorbic acid content, %</i>		
		№	Значение, % <i>Result, %</i>	
		1	0,207	
		2	0,206	
		3	0,204	
		4	0,204	
		5	0,206	
		6	0,204	
		Среднее значение <i>Mean</i>	0,205	
<i>RSD</i> = 0,65%				

Продолжение таблицы 3

Table 3 (continued)

Характеристика <i>Parameter</i>	Требования <i>Requirements</i>	Результат <i>Result</i>		
		№	Исполнитель 1, Оборудование 1 <i>Operator 1, Instrument 1</i>	Исполнитель 2, Оборудование 2 <i>Operator 2, Instrument 2</i>
Межлабораторная прецизионность <i>Intermediate precision</i>	Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения <i>The F-test value calculated from the results obtained by different operators with different equipment is less than the reference value</i> $F_{\text{практ}} = s_1^2/s_2^2 \leq F_{\text{теор}}$	1	0,202%	0,206%
		2	0,203%	0,208%
		3	0,205%	0,204%
		s	0,0015	0,0020
		s_2	0,000002	0,000004
		$F_{\text{практ}} = 0,000004/0,000002 = 2$		
		$F_{\text{теор}}(0,05; 2; 2) = 19,00$ $F_{\text{практ}} < F_{\text{теор}}$		

Примечание. АК – аскорбиновая кислота, ЩК – щавелевая кислота, $t(0,95; n=2)$ – коэффициент Стьюдента, где 0,95 – вероятность, $n=2$ – число степеней свободы; $F_{\text{практ}}, F_{\text{теор}}(0,05; 2; 2)$ – полученный и табличный критерии Фишера соответственно, где 0,05 – уровень значимости, 2 и 2 – число степеней свободы; s – стандартное отклонение; s_1, s_2 – большее и меньшее стандартные отклонения полученных результатов соответственно; s_0 – стандартное отклонение свободного члена, RSD – относительное стандартное отклонение (%).

Note. t , Student's t -test (probability=0.95; $n=2$); $F_{\text{практ}}$ and $F_{\text{теор}}$ calculated and critical Fisher's test values, respectively (significance level=0.05; number of degrees of freedom=2); s , standard deviation; s_1 and s_2 standard deviations of test results, the highest and the lowest, respectively; s_0 standard deviation of the y -intercept; RSD, relative standard deviation (%).

определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и ЛРП, так как позволяет получать достоверные и воспроизводимые результаты и может быть рекомендована для включения в ФС на «Шиповника плоды» и «Витаминный сбор № 2» вместо более трудоемких и неселективных титриметрических методик определения, результаты которых показывают завышенное значение содержания аскорбиновой кислоты в ЛРС и ЛРП.

4. Норму содержания аскорбиновой кислоты («не менее 0,2%») в ЛРС и ЛРП «Шиповника плоды» и ЛРП «Витаминный сбор № 2», установ-

ленную с помощью титриметрического метода, не рекомендуется снижать при использовании метода ВЭЖХ, поскольку содержание аскорбиновой кислоты в высоковитаминных видах шиповника может составлять от 2,5 до 7%.

5. Проблема заниженного содержания аскорбиновой кислоты в подавляющем количестве испытуемых образцов шиповника, возможно, связана с использованием в качестве источников сырья низковитаминных видов шиповника секции *Rosa caninae*, которые применяются только как желчегонное средство.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ламан Н, Копылова Н. Шиповник – природный концентрат витаминов и антиоксидантов. *Наука и инновации*. 2017;10(176):45–9. Laman N, Kopylova N. Rosehips as a natural concentrate of vitamins and antioxidants. *The Science and Innovations*. 2017;10(176):45–9 (In Russ.). EDN: [SNNROI](#)
2. Novakova L, Solich P, Solichova D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends Anal Chem*. 2008;27(10): 942–58. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.006>
3. Um M, Kim JW, Lee JW. Optimization of ascorbic acid extraction from *Rugosa Rose* (*Rosa rugosa* Thunb.) fruit using response surface methodology and validation of the analytical method. *J Korean Wood Sci Technol*. 2020;48(3):364–75. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2020.48.3.364>
4. Хасанов ВВ, Дычко КА, Куряева ТТ, Нестерова ЕВ. Определение аскорбиновой кислоты в крови методом ВЭЖХ. *Аналитика и контроль*. 2013;17(3):322–5. Khasanov VV, Dychko KA, Kuriaeva TT, Nesterova EV. HPLC determination of ascorbic acid in blood. *Analytics and Control*. 2013;17(3):322–5 (In Russ.). EDN: [RBACBX](#)
5. Радждип С, Бхавана П, Храменко ВЕ. Содержание аскорбиновой кислоты в зеленых, красных и черных листьях бадана толстолистного. *Научное обозрение. Педагогические науки*. 2019;(4):86–9. Rajdeep S, Bhavana P, Khramchenko VE. Ascorbic acid concentration in green, red, and black leaves of *Bergenia crassifolia*. *Scientific Review. Pedagogical Sciences*. 2019;(4):86–9 (In Russ.). EDN: [JOODXN](#)

6. Морозов СВ, Ткачева НИ, Ткачев АВ. Проблемы комплексного химического профилирования лекарственных растений. *Химия растительного сырья*. 2018;(4):5–28.
Morozov SV, Tkacheva NI, Tkachev AV. Problems of comprehensive chemical profiling of medicinal plants. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;(4):5–28 (In Russ.).
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2018044003>
7. Новрузов АР. Содержание и динамика накопления аскорбиновой кислоты в плодах *Rosa canina* L. *Химия растительного сырья*. 2014;(3):221–6.
Novruzov AR. Contents and dynamics of accumulation of the ascorbic acid in fruits of *Rosa canina* L. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2014;(3):221–6 (In Russ.).
<https://doi.org/10.14258/jcprm.1403221>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Т.А. Голомазова – выполнение экспериментальной части исследований, написание текста рукописи; Е.П. Шефер – разработка дизайна валидационного исследования и обработка его результатов; С.С. Прохвятилова – сбор, анализ и обобщение данных литературы; Н.П. Антонова – идея, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Tatyana A. Golomazova conducted experiments and drafted the manuscript. Elena P. Shefer designed the validation study and analysed its results. Svetlana S. Prokhvatilova collected, analysed, and summarised literature data. Natalia P. Antonova elaborated the study idea, planned the study, and provided consultations on individual experimental stages.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Голомазова Татьяна Александровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>
golomazovata@expmed.ru

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>
shefer@expmed.ru

Прохвятилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>
prokhvatilova@expmed.ru

Антонова Наталия Петровна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>
nantonava@expmed.ru

Поступила 30.05.2022

После доработки 28.10.2022

Принята к публикации 21.11.2022

Online first 20.04.2023

Tatyana A. Golomazova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>
golomazovata@expmed.ru

Elena P. Shefer, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>
shefer@expmed.ru

Svetlana S. Prokhvatilova, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>
prokhvatilova@expmed.ru

Natalia P. Antonova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>
nantonava@expmed.ru

Received 30 May 2022

Revised 28 October 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 20 April 2023