

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ТРАВЕ ВЕРБЕНЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

©**Курдюков Е. Е.**, ORCID: 0000-0001-9512-6770, SPIN-код: 2859-4063, канд. фарм. наук, Пензенский государственный университет, г. Пенза, Россия, e.e.kurdyukov@mail.ru

©**Митищев А. В.**, ORCID: 0000-0002-3327-9744, SPIN-код: 2831-1792, Пензенский государственный университет, г. Пенза, Россия, span2361@rambler.ru

©**Сарайкин Е. С.**, SPIN-код: 5534-4760, Пензенский государственный аграрный университет, г. Пенза, Россия, bio_vetsan@pgau.ru

©**Акмайкина А. Э.**, Пензенский государственный университет, г. Пенза, Россия, akmmay@mail.ru

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODS FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS IN VERBENA HERB BY SPECTROPHOTOMETRY

©**Kurdyukov E.**, ORCID: 0000-0001-9512-6770, SPIN-code: 2859-4063, Ph.D., Penza State University, Penza, Russia, e.e.kurdyukov@mail.ru

©**Mitishev A.**, ORCID: 0000-0002-3327-9744, SPIN-code: 2831-1792, Penza State University, Penza, Russia, span2361@rambler.ru

©**Saraikin E.**, SPIN-code: 5534-4760, Penza State Agrarian University, Penza, Russia, bio_vetsan@pgau.ru

©**Akmajkina A.**, Penza State University, Penza, Russia, akmmay@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты разработки методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве вербены лекарственной. Изучены условия количественного определения гидроксикоричных кислот растения и подобраны оптимальные параметры экстракции, такие как концентрация экстрагента, соотношение сырья и экстрагента, степень измельченности, время экстракции. Установлено, что наилучшим экстрагентом для травы вербеные лекарственной является спирт этиловый в концентрации 70%, соотношение сырья и экстрагента – 1:100, степень измельченности – 1 мм, оптимальное время экстракции – 60 минут при однократной экстракции. Установлено, что доминирующим веществом является хлорогеновая кислота, на который предлагаются вести пересчет, и аналитическая длина волны для количественного определения гидроксикоричных кислот составляет 330 ± 2 нм. В ходе проведенного анализа установлено содержание гидроксикоричных кислот, составившее максимально 3,42%.

Abstract. The article presents the results of the development of a method for the quantitative determination of the amount of hydroxycinnamic acids in verbena officinalis herb. The conditions for the quantitative determination of hydroxycinnamic acids of the plant were studied and optimal extraction parameters were selected, such as the concentration of the extractant, the ratio of raw materials to extractant, the degree of grinding, and the extraction time. It has been established that the best extractant for verbena herb is ethyl alcohol at a concentration of 70%, the ratio of raw

materials to extractant is 1:100, the degree of grinding is 1 mm, and the optimal extraction time is 60 minutes with a single extraction. It has been established that the dominant substance is chlorogenic acid, which is proposed to be recalculated, and the analytical wavelength for the quantitative determination of hydroxycinnamic acids is 330 ± 2 nm. During the analysis, the content of hydroxycinnamic acids was found to be a maximum of 3.42%..

Ключевые слова: хлорогеновая кислота, количественное определение, спектрофотометрия, трава, гидроксикоричные кислоты, вербена лекарственная

Keywords: chlorogenic acid, quantitative determination, spectrophotometry, herb, hydroxycinnamic acids, *verbena officinalis*

Одним из перспективных растений является вербена лекарственная (*Verbena officinalis*). Вербена лекарственная – лекарственное растение, широко распространенный в мире и широко используемый в народной медицине разных стран, включая традиционную китайскую медицину. Проведенные исследования зарубежными и отечественными учеными доказывают наличие широкого спектра фармакологической активности, например, антиоксидантные, противомикробные, противовоспалительные, нейропротекторные, противораковые, анальгетические или противосудорожные свойства экстрактов травы вербены. Трава вербены лекарственной содержит большое количество эфирного масла (вербенона, урсоловая кислота, артеметин, лимонел, лупеол, линалоол), горечи, дубильные вещества, стероиды (ситостерин), тритерпеноиды (лупеол, урсоловая кислота), флавоноиды (артеметин, цинарозид), иридоидгликозид (вербеналин, аукубин, вербенин), витамины, гидроксикоричные кислоты представлены хлорогеновой и кофейными кислотами. Гидроксикоричные кислоты чаще всего проявляют антиоксидантные, противовоспалительные, адаптогенные и тонизирующие свойства [1-4].

Одним из самых распространенных способов количественного определения гидроксикоричных кислот является метод прямой спектрофотометрии [5, 6].

Материал и методы исследования

Для количественного определения гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую использовали высушеннную траву вербены лекарственной, собранную в Ботаническом саду ПГУ им. И.И. Спрыгина. Спектрофотометрическое исследование было выполнено на спектрофотометре СФ-103 с подбором оптимальных параметров экстракции: концентрация экстрагента, соотношение сырья и экстрагента, степень измельчения, время экстракции. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XV [5].

Результаты и обсуждение

При разработке методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве вербены лекарственной использован метод прямой спектрофотометрии с подбором оптимальных условий проведения [5-7].

В ходе эксперимента были изучены спектры поглощения спиртовых растворов травы вербены лекарственной (Рисунок 1).

Суммарное содержание гидроксикоричных кислот извлекаемых из травы вербены в оптимальных условиях составило 3,42%. Около 1 г измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой и прибавляют 100 мл спирта

этанолового, и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 60 мин при перемешивании.

Извлечение охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы спиртом, концентрация которого соответствовала используемой для экстракции. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр в колбу, отбрасывая при этом первые 10 мл экстракта (раствор А).

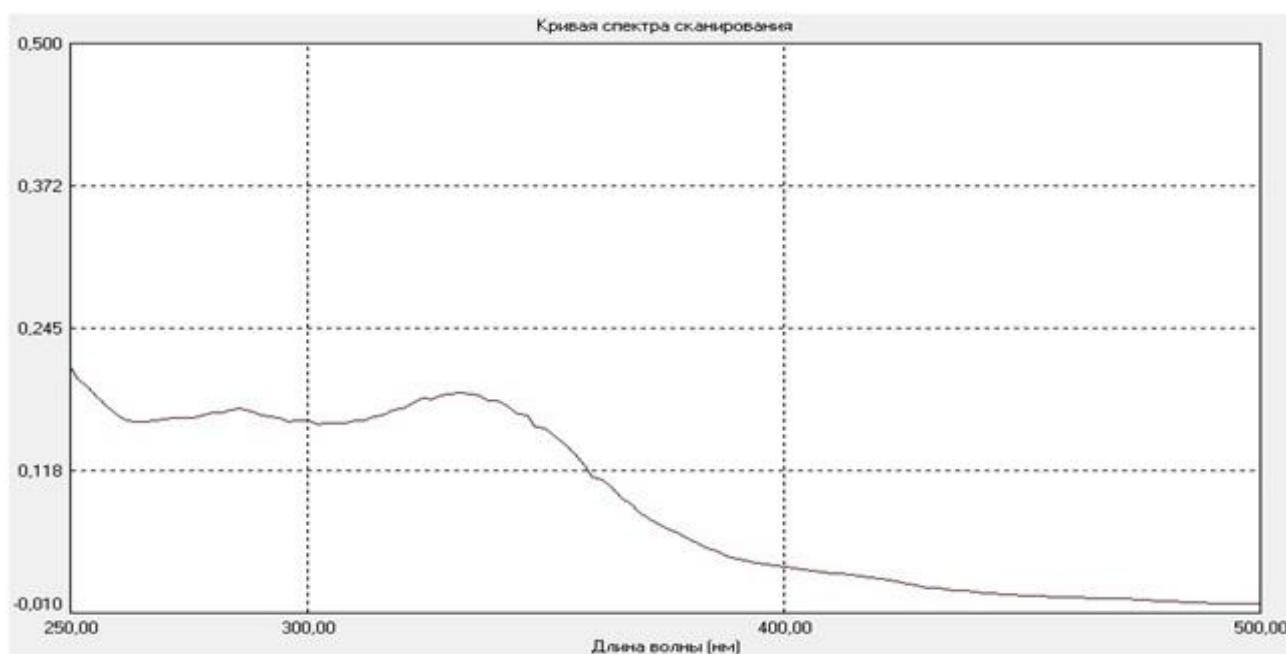


Рисунок 1. Электронный спектр спиртового раствора извлечения из травы вербены

Таблица 1

Экстрагент	Соотношение сырье – экстрагент	Измельченность, мм	Время извлечения, мин	Суммарное содержание гидроксикоричных кислот, %
Влияние степени измельченности				
Этанол 70 %	1:100	0,5	60	$3,36 \pm 0,06$
Этанол 70 %	1:100	1,0	60	$3,42 \pm 0,09$
Этанол 70 %	1:100	2,0	60	$3,38 \pm 0,06$
Этанол 70 %	1:100	3,0	60	$3,34 \pm 0,08$
Влияние экстрагента				
Этанол 40 %	1:100	1,0	60	$1,29 \pm 0,05$
Этанол 70 %	1:100	1,0	60	$3,42 \pm 0,09$
Этанол 95 %	1:100	1,0	60	$0,75 \pm 0,03$
Влияние соотношения «сырье – экстрагент»				
Этанол 70 %	1:50	1,0	60	$2,90 \pm 0,09$
Этанол 70 %	1:100	1,0	60	$3,42 \pm 0,09$
Этанол 70 %	1:200	1,0	60	$2,75 \pm 0,10$
Влияние времени экстрагирования				
Этанол 70 %	1:50	1,0	30	$2,55 \pm 0,07$
Этанол 70 %	1:50	1,0	60	$3,42 \pm 0,09$
Этанол 70 %	1:50	1,0	90	$2,39 \pm 0,09$

Испытуемый раствор для анализа гидроксикоричных кислот готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл,

доводят объем раствора до метки 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор Б). В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый концентрации 70% (раствор сравнения Б). Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-102 в кварцевых кюветах (10 мм). Спектры собственного поглощения гидроксикоричных кислот травы вербены регистрировали в интервале длин волн 200-400 нм. Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 330 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Определение содержания суммы гидроксикоричных кислот в траве вербены лекарственной в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{497 \times m \times 1 \times (100 - W)}$$

где соотношение D — оптическая плотность испытуемого раствора; m — навеска сырья, г; 497 — удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм; W — потеря в массе при высушивании, %.

Проведена метрологическая оценка предложенной методики. В результате пяти параллельных определений ($X_{cp}=3,42$) установлена дисперсия ($S_2=0,005$), стандартное отклонение ($S=0,071$), стандартное отклонение среднего результата ($SX_{cp}=0,031$), относительное стандартное отклонение среднего результата ($RSD = 2,08\%$), полуширина доверительного интервала ($\Delta X_{cp} = 0,088$). Погрешность среднего результата ($\epsilon, \%$) суммы гидроксикоричных кислот с доверительной вероятностью ($P, \%$) 95% в сырье вербены лекарственной составила $\pm 2,58\%$, в пересчете на хлорогеновую кислоту.

В соответствии с требованием нормативной документации, необходимо проведения валидации разрабатываемых методик. Валидацию проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи РФ XV издания по показателям: линейность, прецизионность, правильность [5].

Линейность методики определяли для серии растворов хлорогеновой кислоты, на основании полученных данных построили график зависимости значений оптической плотности от концентрации хлорогеновой кислоты, а затем рассчитали уравнение линейной регрессии. Коэффициент корреляции составил 0,9957.

Прецизионность методики (уровень повторяемости) оценивали путем анализа исследуемого образца вербены в 5-кратной повторности при одинаковых условиях. Согласно полученным результатам среднее значение составило 3,43%, установлена дисперсия ($S^2 = 0,006$), стандартное отклонение ($S = 0,079$), относительное стандартное отклонение среднего результата ($RSD = 2,30 \%$), полуширина доверительного интервала ($\Delta X = 0,10$). Погрешность среднего результата ($\epsilon, \%$) суммы гидроксикоричных кислот с доверительной вероятностью ($P, \%$) 95% в сырье вербены составила $\pm 2,84\%$.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности количественный анализ спиртового экстракта проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования пятикратно (Таблица 2).

Таблица 2
ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ
МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ (Р=95; N=5)

Исследователь 1	Исследователь 2	Метрологические характеристики	
X, %	X, %	Исследователь 1	Исследователь 2
3,37	2,80	$\underline{X}, \% = 3,43$	$\underline{X}, \% = 3,42$

Исследователь 1	Исследователь 2	Метрологические характеристики
3,51	2,88	$S^2 = 0,003$
3,45	2,72	$S = 0,055$
3,39	2,79	$S\bar{X} = 0,025$
		$RSD, \% = 1,60$
		$\Delta\bar{X} = 0,068$
3,45	2,75	$\underline{E}, \% = 1,99$
		$\bar{E}, \% = 3,11$

Выявлено, что ошибка среднего результата с доверительной вероятностью 95% составляет не более 4% при определении суммарного содержания гидроксикоричных кислот. Следовательно, дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквиваленты и различия между полученными значениями не значительны. Правильность методики (Таблица 3) устанавливали определением содержания гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в пробах, полученных путем добавления 0,5, 1,0, 1,5, 0,2, 0,25 мл раствора СО образца хлорогеновой кислоты к исследуемому экстракту травы вербены. Оценку правильности выполняли относительно среднего процента восстановления — процента полученного значения содержания гидроксикоричных кислот в пробе от ожидаемого, средняя величина которого находится в пределах 100±3% [5].

Таблица 3
 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ

Содержание флавоноидов, мг	Добавлено СО цинарозида, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
34,2	0,05	34,25	34,36	100,32	$\underline{X}, \% = 100,01$
	0,1	34,30	34,35	100,14	$\underline{X} \pm \Delta\bar{X} = 100,01 \pm 0,30\%$
	0,15	34,35	34,27	99,76	$\underline{E} = 0,30\%$
	0,2	34,40	34,42	100,05	$P=95\%; n=5; f=4;$
	0,25	34,45	34,38	99,79	

По итогам анализа определили, что средний процент восстановления составляет 100.01%, диапазон восстановления от 99.76 до 100.28%. Разработанная методика отвечает критерию правильности. Разработанная методика суммарного содержания гидроксикоричных кислот, соответствует критериям линейности, прецизионности и правильности. Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и составляет менее 4%. Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммы гидроксикоричных кислот в пересчёте на хлорогеновую кислоту.

Для проведения стандартизации растительного сырья вербены лекарственной по содержанию биологически активных соединений, можно установить суммарное содержание гидроксикоричных кислот не менее 3,40%.

Заключение

Разработана и валидирована методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот (прямая спектрофотометрия) в пересчете на хлорогеновую кислоту, которая может быть использована для стандартизации травы вербены

лекарственной. Определены максимумы поглощения в извлечений из травы вербены при $\lambda=330\pm2$ нм. Максимальное количество гидроксикоричных кислот извлекается при использовании этилового спирта 70%. Содержание гидроксикоричных кислот в сырье, равное 3,42%, достигается применением подобранных условий экстракции: степень измельчения – 1 мм, соотношение «сырье – экстрагент» 1:100 при экстрагировании в течение 60 минут.

Выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда, проект №24-25-20155 «Исследование новых источников лекарственного растительного сырья и разработка комплексного фитосредства для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний»

Список литературы:

1. Kubica P., Szopa A., Dominiak J., Luczkiewicz M., Ekiert H. *Verbena officinalis (common vervain) – a review on the investigations of this medicinally important plant species* // *Planta medica*. 2020. V. 86. №17. P. 1241-1257. <https://doi.org/10.1055/a-1232-5758>
2. Khan A. W., Khan A., Ahmed T. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative activities of *Verbena officinalis* // *Frontiers in pharmacology*. 2016. V. 7. P. 499. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00499>
3. Аникина Т. А., Сазанова М. Л. Биологически активные вещества травы вербены лекарственной // Химические проблемы современности 2023. 2023. С. 13-15.
4. Куляк О. Ю. и др. Вербена лекарственная (*Verbena officinalis* L.): обзор фитохимических и фармакологических исследований // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019. Т. 22. №11. С. 9-18. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-02>
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. <https://femb.ru/record/pharmacopea14>
6. Куркин В. А. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Распространение, классификация, структурный анализ, биологическая активность // Химия природных соединений. 2003. Т. 2. С. 87-110.
7. Куркин В. А., Авдеева Е. В. Проблемы стандартизации растительного сырья и препаратов, содержащих фенилпропаноиды // Фармация. 2009. №1. С. 51-54.

References:

1. Kubica, P., Szopa, A., Dominiak, J., Luczkiewicz, M., & Ekiert, H. (2020). *Verbena officinalis (common vervain) – a review on the investigations of this medicinally important plant species*. *Planta medica*, 86(17), 1241-1257. <https://doi.org/10.1055/a-1232-5758>
2. Khan, A. W., Khan, A. U., & Ahmed, T. (2016). Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative activities of *Verbena officinalis*. *Frontiers in pharmacology*, 7, 499. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00499>
3. Anikina, T. A., & Sazanova, M. L. (2023). Biologicheski aktivnye veshchestva travy verbeny lekarstvennoi. In *Khimicheskie problemy sovremennosti 2023* (pp. 13-15).
4. Kulyak, O. Yu., Adamov, G. V., Radimich, A. I., & Saibel', O. L. (2019). *Verbena lekarstvennaya (Verbena officinalis L.): obzor fitokhimicheskikh i farmakologicheskikh issledovanii*. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*, 22(11), 9-18. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-02>

5. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XIV izdaniya.
<https://femb.ru/record/pharmacopea14>
6. Kurkin, V. A. (2003). Fenilpropanoidy lekarstvennykh rastenii. Rasprostranenie, klassifikatsiya, strukturnyi analiz, biologicheskaya aktivnost'. *Khimiya prirodykh soedinenii*, 2, 87-110.
7. Kurkin, V. A., & Avdeeva, E. V. (2009). Problemy standartizatsii rastitel'nogo syr'ya i preparatov, soderzhashchikh fenilpropanoidy. *Farmatsiya*, (1), 51-54.

Поступила в редакцию
21.10.2025 г.

Принята к публикации
30.10.2025 г.

Ссылка для цитирования:

Курдюков Е. Е., Митищев А. В., Сарайкин Е. С., Акмайкина А. Э. Разработка и валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве вербены лекарственной методом спектрофотометрии // Бюллетень науки и практики. 2025. Т. 11. №12. С. 182-188. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/121/23>

Cite as (APA):

Kurdyukov, E., Mitishev, A., Saraikin, E., & Akmajkina, A. (2025). Development and Validation of the Methods for the Quantitative Determination of the Amount of Hydroxycinnamic Acids in Verbena Herb by Spectrophotometry. *Bulletin of Science and Practice*, 11(12), 182-188. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/121/23>