

УДК 582.284:543.062

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ

© М.А. Проценко\*, Н.Е. Костина

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,  
а/я 257, р.п. Кольцово, Новосибирский район, Новосибирская область, 630559,  
(Россия), e-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru

Разработаны экспресс-методики количественного определения фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах базидиальных грибов с использованием в качестве модельной системы этанольных экстрактов ксилотрофного гриба *Fomes fomentarius*. За основу методики анализа фенольных соединений взят фотоколориметрический метод Фолина – Чикольте. Для анализа флавоноидов выбран спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. Проведена оптимизация состава реагентов и их концентрации в реакционной смеси для каждой из методик анализа. Достоинствами разработанных методик являются простота, быстрота, использование общелабораторного оборудования, малые объемы исследуемых проб и реактивов. Показано, что предложенные методики позволяют проводить анализы в серии до четырех десятков образцов. Установлено, что уменьшение объема исследуемой пробы в 5–10 раз не снижает чувствительность разработанных авторами методик относительно классических вариантов данных методик. Проведена валидация разработанных методик по таким параметрам, как линейность, правильность, сходимости и внутрिलाбораторная прецизионность. Валидация показала, что методики отвечают критериям приемлемости. Предложенные авторами методики количественного анализа фенольных соединений и флавоноидов могут быть рекомендованы для характеристики экстрактов грибов и растений как природного, так и биотехнологического происхождения.

*Ключевые слова:* экстракты, грибы, растения, фенольные соединения, флавоноиды, валидация, линейность, правильность, прецизионность, сходимости.

### Введение

Анализ литературных данных показал возрастающий интерес к фенольным соединениям и флавоноидам грибов и растений в качестве потенциальных лекарственных средств. Это объясняется широко представленной доказательной базой проявления биологической активности фенольных соединений [1–4] и флавоноидов [5–7]. Исходя из этого представляется актуальной разработка экспресс-анализа количественного содержания этих групп биологически активных соединений в препаратах природного происхождения.

Аналитический этап любого исследования определяется каждым исследователем в зависимости от аппаратного обеспечения, трудоемкости, надежности и достоверности. Инструментальные методы анализа, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, обладают высокой чувствительностью и позволяют устанавливать структуру БАВ. При этом используется дорогостоящее оборудование, требующее продолжительной и затратной пробоподготовки. Для стандартизации разрабатываемых лекарственных препаратов на основе грибного и растительного сырья тре-

---

Проценко Мария Анатольевна – младший научный сотрудник, e-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru  
Костина Нина Егоровна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: kostina\_ne@vector.nsc.ru

буется разработать экспресс-методики количественного определения фенольных соединений и флавоноидов с использованием доступного общелабораторного оборудования. Разработанные методики подлежат валидационной оценке.

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

### **Экспериментальная часть**

В работе использовали государственные стандартные образцы (ГСО): дигидрокверцетин и галловую кислоту. Методики анализа экстрактов из грибов отработывали на модельной системе, представленной сухими этанольными экстрактами из плодовых тел дереворазрушающего гриба *Fomes fomentarius*. Плодовые тела гриба собраны в 2012 г. в Караканском бору на территории Ордынского района Новосибирской области. Сухие этанольные экстракты из *Fomes fomentarius*, полученные, как описано в работе [8], растворяли в 96% этиловом спирте в концентрации 5 мг/мл. Для анализа образцы готовили в разведении 1 : 4 и 1 : 8 в этаноле.

Измерение проводили на спектрофотометре Smart Spec Plus. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью встроенных функций в среде офисного приложения Microsoft Excel. При этом рассчитывали содержание групп БАВ как в растворе экстракта, так и в пересчете на сухой экстракт.

Для проверки пригодности методик анализа фенольных соединений и флавоноидов проводили их валидационную оценку по следующим параметрам: линейность, правильность, сходимость и внутривлабораторная прецизионность [9–11].

Испытание специфичности методик не проводилось ввиду доказанной высокой специфичности методов, на основе которых методики разрабатывались.

### **Обсуждение результатов**

#### **1. Анализ экстрактов на содержание фенольных соединений**

*Разработка методики анализа экстрактов на содержание фенольных соединений*

*Выбор метода.* Существует несколько принципиально различающихся методов количественного определения фенольных соединений в фитопрепаратах. К ним относятся метод Дейса [12], метод Левенталля [13] и спектрофотометрический метод [14].

Недостатками метода Дейса, основанного на гравиметрическом определении продуктов взаимодействия с избытком формальдегида, являются большая ошибка, увеличение погрешности метода с уменьшением концентрации фенольных веществ, низкая специфичность [5]. Кроме того, для проведения реакции используется токсичный формальдегид.

Метод Левенталля заключается в титровании перманганатом калия в присутствии индигокармина в качестве индикатора. Метод имеет относительно хорошую точность и воспроизводимость. Однако отмечается ряд недостатков: субъективность определения конца титрования по появлению золотисто-желтой окраски, зависимость результатов от интенсивности перемешивания титруемого раствора и освещения, зависимость расхода перманганата калия от скорости титрования [5].

Фотоколориметрический метод Фолина – Чикольте основан на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота. Интенсивность появляющейся синей окраски зависит от концентрации восстановителя. В большинстве случаев используют смесь фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот (реактив Фолина – Чикольте). В щелочной среде эти соли при взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием окрашенных в синий цвет комплексов, интенсивность окраски которых оценивается спектрофотометрически [14, 15].

Таким образом, из рассмотренных методов анализа фенольных соединений наиболее чувствительным и специфичным является фотоколориметрический метод Фолина – Чикольте.

*Оптимизация состава реакционной смеси.* При проведении окислительно-восстановительной реакции подбирали объемы реагентов так, чтобы объем реакционной смеси не превышал 1,5 мл. В качестве стандарта использовали приготовленный на этиловом спирте раствор галловой кислоты в концентрации 10 (опыт 1) и 100 (опыт 2) мкг/мл.

В таблице 1 показаны максимальные значения оптической плотности у реакционных смесей *d* и *e*. С учетом соответствия повышения  $D_{765}$  увеличению концентрации ГК реакционная смесь *d* является оптимальной для обеспечения чувствительности анализа и стабильности результатов.

Последовательность проведения анализа для реакционной смеси *d*: в микропробирку на 1,5 мл вносят 200 мкл пробы, 450 мкл воды дистиллированной, 100 мкл реактива Фолина – Чикольте и перемешивают; через 3–5 мин к смеси добавляют 400 мкл 7,5% раствора натрия карбоната; смесь выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 60–80 мин, в случае выпадения осадка центрифугируют при 5–6 тыс. об./мин 10–15 мин; в раствор сравнения вместо пробы вносят воду дистиллированную; измеряют оптическую плотность при длине волны 765 нм.

Таблица 1. Оптическая плотность различных составов реакционной смеси при анализе экстрактов на содержание фенольных соединений

Код р.с.	Соотношение П : В : ФЧ : КН	Опыт 1		Опыт 2	
		Концентрация ГК, мкг/мл	D <sub>765</sub> , о.е.	Концентрация ГК, мкг/мл	D <sub>765</sub> , о.е.
<i>a</i>	1 : 31 : 2 : 6	0,25	0,040	2,5	0,244
<i>b</i>	1 : 15 : 1 : 3	0,50	0,042	5,0	0,493
<i>c</i>	2 : 9 : 1 : 8	1,00	0,144	10,0	1,644
<i>d</i>	4 : 9 : 2 : 8	1,74	0,249	17,4	2,522
<i>e</i>	8 : 5 : 2 : 8	3,48	0,306	34,8	4,000*

Примечание: р.с. – реакционная смесь; П – проба; В – вода дистиллированная; ФЧ – реактив Фолина – Чикольте; КН – 7,5% раствор карбоната натрия; ГК – галловая кислота, \* верхний предел чувствительности спектрофотометра.

#### Валидация методики анализа экстрактов на содержание фенольных соединений

Для оценки *линейности* необходимо установить область линейной зависимости оптической плотности от концентрации исследуемого вещества в растворе. С этой целью из стандартного раствора кислоты галловой (5 мг/мл) путем разбавления 96% этиловым спиртом готовили рабочие растворы с содержанием 25, 31, 38, 50, 63, 75, 100, 125, 150 мкг/мл и измеряли их оптическую плотность. Экспериментальные данные результатов анализа представлены графически (рис. 1).

Показано, что в концентрации от 9 до 125 мкг/мл зависимость оптической плотности от концентрации галловой кислоты в растворе проходит через ноль оси ординат и имеет линейный характер. При этом коэффициент корреляции составил 0,9976 (должен быть не ниже 0,99) [11].

Сходимость оценивали в условиях, при которых независимые результаты получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же сотрудником с использованием одного и того же оборудования в течение короткого промежутка времени по 12 последовательным измерениям растворов этанольного экстракта плодового тела гриба *Fomes fomentarius* в разведениях 1 : 4 и 1 : 8. Рассчитывали среднее содержание фенольных соединений в экстракте в пересчете на дигидрокверцетин, стандартное отклонение, коэффициент вариации, доверительный интервал. Результаты анализов представлены в таблице 2.

Содержание ФС в сухом экстракте для доверительной вероятности 95% составляет  $57,3 \pm 2,2$  мг/г. Таким образом, доказана приемлемость методики на уровне сходимости [11].

*Внутрилабораторную прецизионность* методики определяли в условиях, при которых результаты получали одним и тем же методом одним и тем же сотрудником с использованием одного и того же оборудования в течение трех дней по шести последовательным измерениям оптической плотности растворов этанольного экстракта плодового тела гриба *Fomes fomentarius* в разведении 1 : 8. Растворы готовились из разных серий сухих этанольных экстрактов *Fomes fomentarius*, полученных одним и тем же методом [8].

Содержание ФС в сухом экстракте для доверительной вероятности 95% составляет  $61,0 \pm 2,1$  мг/г. На основании результатов, представленных в таблице 3, показана приемлемость методики на уровне внутрилабораторной прецизионности.

*Правильность* разработанной методики определяли на образцах раствора экстракта *Fomes fomentarius* с концентрацией 39,0 мкг/мл при добавлении известного количества галловой кислоты (5 и 12,5 мкг/мл). Рассчитывали процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций. Результаты приведены в таблице 4.

Средний процент восстановления составил 100,3% (в пределах  $100 \pm 5\%$ ). Исходя из этого предложенная методика анализа фенольных соединений является приемлемой.

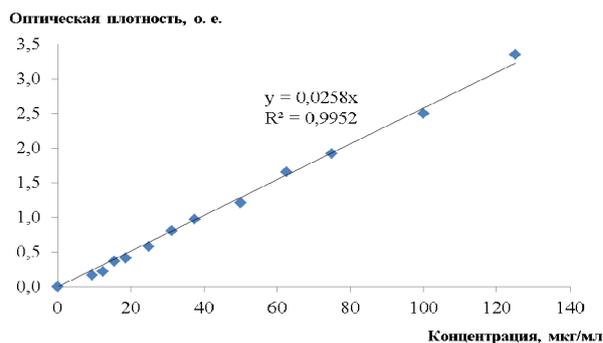


Рис. 1. Калибровочный график по галловой кислоте

Таблица 2. Результаты оценки сходимости методики количественного определения фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в экстрактах *Fomes fomentarius*

№	Разведение	D <sub>765</sub> , о.е.	Концентрация ФС, мкг/мл		Содержание ФС в сухом экстракте, мг/г
			в р.с.	в растворе экстракта	
1	4	1,740	67,3	269,2	53,8
2	4	1,793	69,4	277,6	55,5
3	4	1,703	65,9	263,5	52,7
4	4	1,756	68,0	271,8	54,4
5	4	1,874	72,5	290,1	52,0
6	4	1,878	72,7	290,7	58,5
7	8	0,841	32,5	260,2	58,0
8	8	0,946	36,6	292,7	58,1
9	8	1,072	41,5	331,9	66,4
10	8	0,878	34,0	272,0	54,4
11	8	0,983	38,0	304,0	60,8
12	8	1,009	39,1	312,4	62,5

Среднее содержание ФС в сухом экстракте  $\bar{X} = 57,3$  мг/г.

Стандартное отклонение  $S = + \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \right]^{0,5} = 4,3$  мг/г.

Коэффициент вариации  $CV = \frac{S}{\bar{X}} 100 = 7,6\%$

Полуширина доверительного интервала  $\Delta\bar{X} = \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}} = 2,2$  мг/г.

Коэффициент Стьюдента (0,05; n-1)  $t = 1,796$ .

Примечание: р.с. – реакционная смесь; ФС – фенольные соединения, доверительная вероятность 95%, n=12.

Таблица 3. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в экстрактах *Fomes fomentarius*

№	Содержание ФС в сухом экстракте, мг/г		
	день 1	день 2	день 3
1	61,7	58,0	65,9
2	63,0	58,1	62,7
3	65,6	66,4	62,4
4	68,7	54,4	69,7
5	50,3	60,8	56,7
6	53,7	62,5	62,6
	Среднее содержание ФС по дням, мг/г		
	60,5	60,0	63,3

Среднее содержание ФС в сухом экстракте  $\bar{X} = 61,0$  мг/г.

Стандартное отклонение  $S = + \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \right]^{0,5} = 5,2$  мг/г.

Коэффициент вариации  $CV = \frac{S}{\bar{X}} 100 = 8,5\%$

Полуширина доверительного интервала  $\Delta\bar{X} = \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}} = 2,1$  мг/г.

Коэффициент Стьюдента (0,05; n-1)  $t = 1,740$ .

Примечание: ФС – фенольные соединения, доверительная вероятность 95%, n=18.

Таблица 4. Результаты оценки правильности методики количественного определения фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в экстрактах *Fomes fomentarius*

№	Добавлено ГК, мкг/мл	Ожидаемое содержание ФС, мкг/мл	Полученное содержание ФС, мкг/мл	% восстановления
1	2	3	4	5
1	5,0	44,0	45,5	103,4
2	5,0	44,0	45,9	104,3
3	5,0	44,0	45,6	103,6
4	5,0	44,0	46,1	104,8
5	12,5	51,5	50,1	97,3
6	12,5	51,5	50,7	98,4
7	12,5	51,5	53,5	103,9

Окончание таблицы 4

1	2	3	4	5
8	12,5	51,5	48,8	94,8
9	12,5	51,5	49,1	95,3
10	12,5	51,5	49,9	96,9
11	12,5	51,5	49,7	96,5
12	12,5	51,5	53,9	104,7
Средний процент восстановления			100,3%	

Примечание: ФС – фенольные соединения.

## 2. Анализ экстрактов на содержание флавоноидов

### Разработка методики анализа экстрактов на содержание флавоноидов

Разработка методики количественного анализа **флавоноидов** в природных объектах включала следующие этапы: выбор метода анализа, выбор реактивов, оптимизация концентрации компонентов, выбор длины волны.

**Выбор метода.** Спектральные методы анализа (фотоэлектроколориметрия, спектрофотометрия, денситометрия) имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с гравиметрическими и титриметрическими методами, а именно: сокращение времени анализа, высокая чувствительность и специфичность. Для работы выбран спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с солями металлов, проявляющей высокую специфичность в отношении флавоноидов [16].

**Выбор реагентов.** Наиболее распространенным и доступным комплексообразователем для количественного анализа флавоноидов является соль алюминия [17, 18], поэтому в качестве основного реактива для анализа флавоноидов выбран хлорид алюминия.

В связи с тем, что полученный комплекс флавоноидов с солями неустойчив, требовалось создать условия его стабилизации. В литературе описано много способов определения содержания флавоноидов в растительном сырье с помощью реакции комплексообразования с хлоридом алюминия с добавлением соляной или уксусной кислот [17]. Однако в работе [17] показано, что кислоты не оказывают заметного стабилизирующего действия на образующийся комплекс.

В работе В.М. Петриченко установлено, что перспективным стабилизирующим реактивом, повышающим чувствительность анализа, является ацетат натрия. Например, одновременное использование комплексообразователя и стабилизатора при анализе флавоноидов очанки увеличивало батохромное смещение полос поглощения по сравнению с использованием только комплексообразующего реагента [19].

Следовательно, для усиления батохромного смещения и повышения чувствительности методики необходимо введение ацетата натрия в качестве стабилизирующего реагента.

**Подбор концентрации реактивов.** В работах [17–19] хлорид алюминия применяют в концентрации 2–5%, а ацетат натрия – в концентрации 8%. Оба реактива растворены в 96% этаноле. Нами выбраны минимально возможные концентрации реагентов: 2% – для хлорида алюминия и 4% – для ацетата натрия. Это связано с тем, что при высоких концентрациях реагентов и незначительных изменениях внешних условий в реакционной смеси существует риск возникновения опалесценции и даже выпадения осадка.

**Оптимизация соотношения реактивов.** В большинстве случаев для биохимического анализа используют сравнительно большие объемы (примерно 2–10 мл) экстракта и реактивов, что вполне оправдано целью снижения ошибки измерения и небольшой серией анализируемых проб (до 5). В настоящей работе объемы реагентов подбирали так, чтобы объем реакционной смеси не превышал 1,5 мл. При этом серия анализируемых проб составляла 20 и более.

Результаты измерения оптической плотности реакционных смесей **a, b, c, d, e, f**, где в качестве пробы использовали дигидрокверцетин в концентрации 50 (опыт 1) и 500 (опыт 2) мкг/мл, при длинах волн 360, 370 и 380 нм, приведены в таблице 5. При этом в качестве отрицательного контроля готовили соответствующую реакционную смесь, в которую вместо раствора хлорида алюминия вносили 96% спирт.

При измерении оптической плотности различных реакционных смесей, выявлено, что наименьшее значение оптическая плотность при трех длинах волн наблюдается у реакционных смесей **d, e, и f**, а наибольшее – у реакционных смесей **a, b и c**. С учетом соответствия повышения  $D_\lambda$  увеличению концентрации дигидрокверцетина реакционная смесь **c** является оптимальной для обеспечения стабильности результатов анализа и его чувствительности.

Таблица 5. Оптическая плотность различных составов реакционной смеси для трех длин волн при анализе экстрактов на содержание флавоноидов

Код р.с.	Соотношение П : ХА : СП : АН	Опыт 1				Опыт 2			
		Концентрация ДКВ в р.с., мкг/мл	D <sup>360</sup> , о.е.	D <sup>370</sup> , о.е.	D <sup>380</sup> , о.е.	Концентрация ДКВ в р.с., мкг/мл	D <sup>360</sup> , о.е.	D <sup>370</sup> , о.е.	D <sup>380</sup> , о.е.
<i>a</i>	2 : 2 : 5 : 1	10	0,037	0,081	0,085	100	0,521	0,871	1,014
<i>b</i>	2 : 1 : 6 : 1	10	0,035	0,076	0,074	100	0,548	0,818	0,888
<i>c</i>	4 : 2 : 13 : 1	10	0,027	0,088	0,100	100	0,461	0,799	0,931
<i>d</i>	1 : 1 : 7 : 1	5	-0,010	0,011	0,010	50	0,304	0,448	0,489
<i>e</i>	2 : 2 : 15 : 1	5	-0,012	0,021	0,024	50	0,211	0,399	0,472
<i>f</i>	2 : 1 : 16 : 1	5	-0,005	0,024	0,017	50	0,249	0,413	0,465

Примечание: р.с. – реакционная смесь; П – проба; ХА – 2% спиртовой раствор хлорида алюминия; СП – спирт этиловый 96%; АН – 4% спиртовой раствор ацетата натрия; ДКВ – дигидрокверцетин.

*Выбор длины волны.* Один из максимумов поглощения дигидрокверцетина в дифференциальном спектре находится в диапазоне 350–400 нм, рутин и лютеолин-7 гликозида в диапазоне 390–430 нм. С учетом сказанного и результатов других авторов нами выбраны следующие длины волн для анализа флавоноидов: 380 нм – для дигидрокверцетина, 410 и 420 нм – для рутина и лютеолин-7 гликозида соответственно.

Последовательность проведения анализа для реакционной смеси *c*: в микропробирку на 1,5 мл вносят 200 мкл пробы, прибавляют 100 мкл 2% раствора хлорида алюминия; смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 40–60 мин; по истечении времени выдерживания к смеси прибавляют 650 мкл 96% этилового спирта и 50 мкл 4% спиртового раствора натрия ацетата; параллельно готовят раствор сравнения: в микропробирку на 1,5 мл вносят 200 мкл пробы, прибавляют 800 мкл 96% этанола; измеряют оптическую плотность при длинах волн 380, 410 и 420 нм.

#### *Валидация методики анализа экстрактов на содержание флавоноидов*

Показано, что в концентрации от 25 до 600 мкг/мл зависимость оптической плотности от концентрации дигидрокверцетина в растворе имеет линейный характер (рис. 2). Коэффициент корреляции составил 0,9965 (выше 0,99).

Следует отметить положительный момент широкого диапазона количественного анализа флавоноидов, так как упрощается стадия пробоподготовки путем снижения количества и кратности разведений анализируемого образца.

*Сходимость* методики анализа флавоноидов оценивали по 12 независимым последовательным измерениям оптической плотности растворов экстракта *Fomes fomentarius* в разведениях 4 и 8. Результаты измерений представлены в таблице 6.

Содержание ФЛ в сухом экстракте для доверительной вероятности 95% составляет  $405,4 \pm 9$  мг/г. Таким образом, показана приемлемость методики на уровне сходимости.

*Внутрилабораторную прецизионность* анализировали в условиях, при которых результаты получали одним и тем же методом одним и тем же сотрудником с использованием одного и того же оборудования в течение двух дней по шести последовательным измерениям оптической плотности растворов этанольного экстракта плодового тела *Fomes fomentarius* в разведении 1 : 8. Растворы в 1-й и 2-й дни готовились из разных сухих этанольных экстрактов гриба, но полученных одним и тем же методом.

Содержание флавоноидов составляет  $403,9 \pm 9,3$  мг/г. Таким образом, на основании результатов, приведенных в таблице 7, показана приемлемость методики на уровне внутрилабораторной прецизионности.

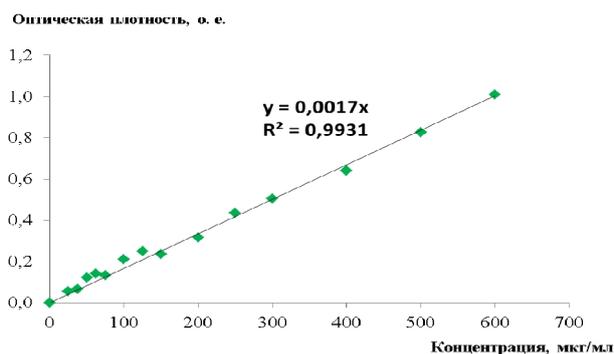


Рис. 2. Калибровочный график по дигидрокверцетину

Правильность разработанной методики определяли на образцах раствора экстракта *Fomes fomentarius* с концентрацией 152 мкг/мл при добавлении известного количества дигидрокверцетина (50 и 75 мкг/мл). Рассчитывали процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций. Результаты исследования правильности методики показаны в таблице 8.

Выявлено, что процент восстановления составляет от 94,7 до 104,8%. Средний процент восстановления составляет 101,0% (в пределах  $100 \pm 5\%$ ). Следовательно, предложенная авторами методика анализа флавоноидов отвечает критерию правильности.

Таблица 6. Результаты оценки сходимости методики количественного определения флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин в экстрактах *Fomes fomentarius*

№	Разведение	D <sup>380</sup> , о.е.	Концентрация ФЛ, мкг/мл		Содержание ФЛ в сухом экстракте, мг/г
			в р.с.	в растворе экстракта	
1	4	0,844	503	2016	403,2
2	4	0,890	531	2124	424,8
3	4	0,867	518	2072	414,4
4	4	0,810	484	1936	387,2
5	4	0,896	535	2140	428,0
6	4	0,875	523	2092	418,4
7	8	0,394	235	1880	376,0
8	8	0,399	238	1904	380,8
9	8	0,441	263	2104	420,8
10	8	0,428	256	2048	409,6
11	8	0,414	247	1976	395,2
12	8	0,425	254	2032	406,4

Среднее содержание ФЛ в сухом экстракте  $\bar{X}$ , мг/г = 405,4.

Стандартное отклонение  $S = + \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1} \right]^{0,5} = 17,3$  мг/г.

Коэффициент вариации  $CV = \frac{S}{\bar{X}} 100 = 4,3\%$

Полуширина доверительного интервала  $\Delta \bar{X} = \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}} = 9,0$  мг/г.

Коэффициент Стьюдента (0,05; n-1)  $t = 1,796$ .

Примечание: р.с. – реакционная смесь; ФЛ – флавоноиды, доверительная вероятность 95%, n=12.

Таблица 7. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения флавоноидов в пересчете на дигидрокверцетин в экстрактах *Fomes fomentarius*

№	Содержание ФЛ в сухом экстракте, мг/г	
	1-й день	2-й день
1	425,4	376,0
2	434,0	380,8
3	392,0	420,8
4	404,4	409,6
5	388,1	395,2
6	413,9	406,4
	Среднее содержание ФЛ по дням	
	409,6 мг/г	398,1 мг/г

Среднее содержание ФЛ в сухом экстракте  $\bar{X} = 403,9$  мг/г.

Стандартное отклонение  $S = + \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1} \right]^{0,5} = 18,0$  мг/г.

Коэффициент вариации  $CV = \frac{S}{\bar{X}} 100 = 4,5\%$

Полуширина доверительного интервала  $\Delta \bar{X} = \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}} = 9,3$  мг/г.

Коэффициент Стьюдента (0,05; n-1)  $t = 1,796$ .

Примечание: ФЛ – флавоноиды, доверительная вероятность 95%, n=12.

Таблица 8. Результаты оценки правильности методики количественного определения флавоноидов

№	Добавлено ДКВ, мкг/мл	Ожидаемое содержание ФЛ, мкг/мл	Полученное содержание ФЛ, мкг/мл	% восстановления
1	50	202	204	101,0
2	50	202	196	97,0
3	50	202	207	102,5
4	50	202	211	104,5
5	50	202	205	101,5
6	75	227	238	104,8
7	75	227	235	103,5
8	75	227	237	104,4
9	75	227	218	96,0
10	75	227	215	94,7

Средний процент восстановления = 101,0 %

Примечание: ДКВ – дигидрокверцетин; ФЛ – флавоноиды.

### Выводы

Таким образом, разработаны и апробированы экспресс-методики количественного определения фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах базидиального гриба *Fomes fomentarius*. Проведена валидация методик, которая показала, что методики отвечают критериям приемлемости. К достоинствам разработанных методик относятся простота, быстрота, использование общелабораторного оборудования, малые объемы исследуемых проб и реактивов. Предложенные методики позволяют проводить серийные анализы в несколько десятков образцов. Установлено, что уменьшение объема исследуемой пробы в 5–10 раз не снижает чувствительность разработанных авторами методик относительно классических вариантов данных методик. Разработанные методики анализа содержания фенольных соединений и флавоноидов могут быть рекомендованы для характеристики экстрактов грибов и растений как природного, так и биотехнологического происхождения.

### Список литературы

- Lo K.M., Cheung P.C.K. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var *Alba* // Food Chemistry. 2005. Vol. 89. Pp. 533–539.
- Lee I., Yun B. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance // J Antibiot. 2011. Vol. 64, N5. Pp. 349–359.
- Ковалева А.В., Кузьминых О.В., Лашенко Е.Ю., Древаль К.Г., Каниболоцкая Л.В., Бойко М.И., Шендрик А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих макромицетов // Вісник донецького національного університету. 2013. №1. С. 136–139.
- Zheng W., Z Yao Y., Zheng M., Yin Z., Chen C., Wei Z. Phenolic compounds from *Inonotus obliquus* and their immune-stimulating effects // Mycosystema. 2008. Vol. 27, N4. Pp. 574–581.
- Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендрик А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. 2008. №3. С. 123–127.
- Цыдендамбаев П.Б., Хышиктуев Б.С., Николаев С.М. Биологические эффекты флавоноидов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2006. №6 (52).
- Шарова О.В., Куркин В.А. Флавоноиды цветков календулы лекарственной // Химия растительного сырья. 2007. №1. С. 65–68.
- Проценко М.А. Получение экстрактов и характеристика биологически активных соединений из *Fomes fomentarius* // Медицина и образование в Сибири. 2013. №4.
- ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1: Основные положения и определения. М., 2002. 28 с.
- Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 2. М., 2010. 600 с.
- Мешковский А.П. Валидация аналитических методов // Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий : сборник. М., 2002. С. 26–30.
- Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М., 1977. 158 с.
- ГОСТ 19885-74 Чай. Методы определения содержания танина и кофеина. М., 1974. 5 с.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // Methods in Enzymology. 1999. Vol. 299. Pp. 152–178.
- Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine // Jpn. J. Nutr. 1986. Vol. 44. Pp. 307–315.

16. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музыкакина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск, 2007. 232 с.
17. Латыпова Г.М., Романова З.Р., Бубенчикова В.Н., Аюпова Г.В. Исследование качественного и количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта первоцвета лекарственного // Химия растительного сырья. 2009. №4. С. 113–116.
18. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2004. №1. С. 47–52.
19. Патент 2266544 (РФ). Унифицированный способ количественного определения флавоноидов в траве и экстракционных препаратах очанки / В.М. Петриченко, Т.В. Сухинина. 2005.

*Поступило в редакцию 9 августа 2015 г.*

*После переработки 20 сентября 2015 г.*

Protsenko M.A.\*, Kostina N.E. ELABORATION AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS IN THE EXTRACTS OF HIGHER FUNGI

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, 630559, Koltsovo, Novosibirsk region (Russia),  
e-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru

Simple rapid method for the quantitative determination of phenolic compounds and flavonoids in the extracts of basidiomycetes and plants have been elaborated, using as a model system ethanol extract of the fungus xylotrophic *Fomes fomentarius*. The basis of the methods of analysis of phenolic compounds selected photolorimetric method of Folin Ciocalteu. For analysis of flavonoid selected spectrophotometric method based on the reaction of complexation with aluminum chloride. It was conducted optimization of the composition of the reactants and their concentrations in the reaction mixture for each of the analysis techniques. The advantages of the developed techniques are: simplicity, speed, the use of general laboratory equipment, small volumes of test samples and reagents. It is shown that the proposed methods allow to conduct analyses in a series of up to four dozen samples. Set validation parameters of the developed methods: linearity, precision and convergence. It was determined validation parameters of the developed methods linearity, precision and convergence. Validation showed that the methods meet the eligibility criteria. The proposed methods of quantitative analysis by the authors of phenolic compounds and flavonoids can be recommended for the characterization of extracts of fungi and plants, both natural and biotechnological origin.

**Keywords:** extracts, fungi, plants, phenolic compounds, flavonoids, validation, linearity, precision, convergence.

### References

1. Lo K.M., Cheung P.C.K. *Food Chemistry*, 2005, vol. 89, pp. 533–539.
2. Lee I., Yun B. *J. Antibiot.*, 2011, vol. 64, no. 5, pp. 349–359.
3. Kovaleva A.V., Kuz'minykh O.V., Lashchenko E.Iu., Dreval' K.G., Kanibolotskaia L.V., Boiko M.I., Shendrik A.N. *Visnyk donec'kogo nacional'nogo universytetu*, 2013, no. 1, pp. 136–139. (in Russ.).
4. Zheng W., Z Yao Y., Zheng M., Yin Z., Chen C., Wei Z. *Mycosystema*, 2008, vol. 27, no. 4, pp. 574–581.
5. Fedoseeva A.A., Lebedkova O.S., Kanibolotskaia L.V., Shendrik A.N. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2008, no. 3, pp. 123–127. (in Russ.).
6. Tsydendambaev P.B., Khyshiktuev B.S., Nikolaev S.M. *Biulleten' VSNTs SO RAMN*, 2006, no. 6 (52). (in Russ.).
7. Sharova O.V., Kurkin V.A. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2007, no. 1, pp. 65–68. (in Russ.).
8. Protsenko M.A. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*, 2013, no. 4. (in Russ.).
9. GOST R ISO 5725-1-2002. *Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenii. Chast' 1. Osnovnye polozheniia i opredeleniia*. [State Standard R ISO 5725-1-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: Basic terms and definitions]. Moscow, 2002. 28 p. (in Russ.).
10. *Gosudarstvennaia Farmakopeia Rossiiskoi Federatsii. XII izdanie. 2 chast'*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XII edition. 2 part]. Moscow, 2010, 600 p. (in Russ.).
11. Meshkovskii A.P. *Sovremennye trebovaniia k organizatsii i deiatel'nosti kontrol'no-analiticheskikh laboratorii otdelov kontroliia kachestva farmatsevticheskikh predpriatii: sbornik*. [Modern requirements for the organization and operation of control-analytical laboratories quality control departments of pharmaceutical companies: a collection]. Moscow, 2002. C. 26–30. (in Russ.).
12. Blazhei A., Shutyi L. *Fenol'nye soedineniia rastitel'nogo proiskhozhdeniia*. [Phenolic compounds of plant origin]. Moscow, 1977, 158 p. (in Russ.).
13. GOST 19885-74. *Chai. Metody opredeleniia sodержaniia tannina i kofeina*. [State Standard 19885-74 tea. Methods for determination of tannin and caffeine]. Moscow, 1974, 5 p. (in Russ.).
14. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. *Methods in Enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152–178.
15. Oyaizu M. *Jpn. J. Nutr.*, 1986, vol. 44, pp. 307–315.
16. Korul'kin D.Iu., Abilov Zh.A., Muzychkina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnye flavonoidy*. [Natural flavonoids]. Novosibirsk, 2007, 232 p. (in Russ.).
17. Latypova G.M., Romanova Z.R., Bubenchikova V.N., Aiupova G.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2009, no. 4, pp. 113–116. (in Russ.).
18. Lobanova A.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2004, no. 1, pp. 47–52. (in Russ.).
19. Patent 2266544 (RU). 2005. (in Russ.).

Received August 9, 2015

Revised September 20, 2015

\* Corresponding author.