



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Шеромов А.М.¹, Товстик Е.В.^{*1,2},
Шуплецова О.Н.²

¹ Вятский государственный университет, Киров, Россия

² Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, Киров, Россия

*E-mail: tovstik2006@inbox.ru

VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINING FREE AND BOUND POLYPHENOLS IN BARLEY PLANTS BY SPECTROPHOTOMETRY

Sheromov A.M.¹, Tovstik E.V.^{*1,2},
Shupletsova O.N.²

¹ Vyatka State University, Kirov, Russia

² Federal Agricultural Research Center of the North-East named after N.V. Rudnitsky, Kirov, Russia

*E-mail: tovstik2006@inbox.ru

В статье представлены результаты исследования общего содержания и содержания свободных полифенолов в зерне и соломе ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Содержание полифенолов установлено по результатам измерения оптической плотности растворов, содержащих соединения, образующиеся между полифенолами, входящими в состав экстрактов из растительного сырья, и комплексами молибдена реактива Фолина-Чокальтеу. Пригодность методики спектрофотометрического определения содержания полифенолов в зерне и соломе ячменя подтверждена по двум характеристикам: линейность и повторяемость. В ходе исследования установлено, что общее содержание и содержание свободных полифенолов в соломе ячменя выше ($21,9 \pm 0,6$ и $4,78 \pm 0,09$ мг/г), чем в зерне ($8,7 \pm 0,6$ и $2,49 \pm 0,13$ мг/г). Сделано заключение, что методика определения полифенолов валидна и позволяет установить содержание полифенолов в растениях ячменя.

Ключевые слова: ячмень ♦ зерно ♦ соломина ♦ полифенолы ♦ спектрофотометрический метод ♦ валидация метода

The article represents the results of a research of the total content and content of free polyphenols in the grain and straw of spring barley (*Hordeum vulgare* L.). The content of polyphenols was determined by measuring the optical density of solutions containing blue-colored compounds formed between polyphenols of raw plant and molybdenum complexes of the Folin-Ciocalteu reagent. The suitability of the method was confirmed by two characteristics: linearity and repeatability. The study found that the total content and content of free polyphenols in barley straw is higher (21.9 ± 0.6 and 4.78 ± 0.09 mg/g) than in grain (8.7 ± 0.6 and 2.49 ± 0.13 mg/g). The research revealed that the method for determining polyphenols is valid and allows to determine the content of polyphenols in barley plants.

Keywords: barley, ♦ grain, ♦ straw, ♦ polyphenols, ♦ spectrophotometric method, ♦ validation method

Поступила в редакцию: 01.04.2024

Принято в печать: 30.05.2024

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-80-85](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-80-85)

EDN: [ABOUAL](https://www.edn.ru/ABOUAL)



ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших аспектов аналитической химии является разработка и валидация методов количественного анализа. Проведение данных мероприятий позволяет убедиться в правильности, достоверности и надежности получаемых результатов [Тринеева, Сливкин, 2016].

Полифенолы являются широко распространенными и биологически значимыми метаболитами растений. В их структуре выделяют общее ароматическое кольцо, несущее несколько гидроксильных групп, непосредственно связанных с атомом углерода в одном (гидроксibenзойная и оксикоричная кислоты) или нескольких (флавоноиды) бензольных кольцах [Olszowy, 2019; Soto-Hernández et al., 2019]. Фенольные соединения в растениях

могут быть этерифицированы или связаны с нерастворимыми и легко растворимыми эфирными соединениями [Lasky et al., 2023; Desai et al., 2023]. Их высвобождению из растительного сырья обычно способствует щелочной гидролиз [Mussatto et al., 2007].

Важнейшей функцией полифенолов в растениях является защита от действия стрессовых факторов. Как правило, растения, различающиеся по устойчивости к стрессам, реагируют на него однотипно, но отличаются скоростью физиологических и структурных перестроек. Повышение устойчивости к абиотическим стрессам часто коррелирует с эффективностью работы антиоксидантной системы [Прудников и др., 2018]. Многие из полифенолов способны связывать свободные радикалы и предотвращать перекисное окисление липидов клеточных мембран [Belščak-Cvitanović et al., 2018].

Скрининг сортов сельскохозяйственных растений с повышенным содержанием полифенолов, сочетающих высокую урожайность и устойчивость к абиотическим факторам, в настоящее время приобретает все большую актуальность [Yoon et al., 2022]. Среди злаковых культур, наибольший интерес в этом направлении представляет ячмень (*Hordeum vulgare* L.). Его зерна богаты крахмалом, бета-глюканом, антоцианами; солома – лигноцеллюлозой [Тетяников, Боме, 2022]. Кроме того, зерновые, особенно цельнозерновые, являются важным источником пищевых полифенолов. По сравнению с овощами и фруктами содержание и биологическая активность полифенолов в злаках долгое время недооценивались [Tian et al., 2019]. Ячмень адаптирован к широкому спектру агроклиматических условий и является источником широкого спектра соединений, полезных для людей и животных, а также пригодных для промышленных целей [Meng et al., 2023].

Характерная структура и свойства полифенолов определяют разнообразие методов их количественного определения в растениях. Среди них хроматографические (высокоэффективная жидкостная и тонкослойная), электрофоретические (капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография), спектрофотометрические методы анализа [Карцова, Алексеева, 2008].

Метод спектрофотометрии является одним из наиболее распространённых и доступных способов количественного определения полифенолов в растениях. Его основным преимуществом является простота пробоподготовки, отсутствие необходимости разрушения соединений в процессе анализа, а также относительная экспрессность метода [Тыжигирова, Лопатина, 2021].

Спектрофотометрическое определение полифенолов в растениях основано на реакции их окисления. В качестве окислителя используется реактив Фолина-Чокальтеу, который содержит в своем составе фосфорно-вольфрамовую ($P_2O_5 \cdot 13WO_3 \cdot 5MoO_3 \cdot 13H_2O$) и фосфорно-молибденовую кислоты ($P_2O_5 \cdot 14WO_3 \cdot 4MoO_3 \cdot 13H_2O$). В ходе окислительно-восстановительной реакции между полифенолами и комплексами молибдена образуются соединения состава $P_2MoW_{11}O_{40}$ или гидратированные гидроксиды $Mo_2O_5 \cdot nH_2O$, $Mo_4O_{11} \cdot nH_2O$, $Mo_8O_{23} \cdot 8H_2O$, имеющие максимум поглощения при длине волны 765 нм [Оганесян и др., 2022].

Цель работы – валидация методики количественного определения общего содержания и содержания свободных полифенолов в растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Предметом исследования – общее содержание и содержание свободных полифенолов в зерне и солоmine ячменя.

Количественное определение полифенолов проводили с опорой на методику, изложенную в ГОСТе Р 55488-2013, на спектрофотометре марки ПЭ5300ВИ, ООО «Экротех», Россия (стеклянные кюветы с толщиной слоя 1 см). Перед проведением анализа готовили щелочные и спиртовые извлечения из растительного сырья для определения общего содержания и содержания свободных полифенолов соответственно. В качестве экстрагентов использовали 2 н. раствор гидроксида натрия (NaOH) и 70%-ый этиловый спирт (C₂H₅OH).

Определение содержания полифенолов осуществляли спектрофотометрическим методом. В качестве стандарта использовали галловую кислоту (х.ч., Россия).

Валидацию метода определения осуществляли по двум характеристикам – линейность и повторяемость (ОФС 1.1.0012 ГФ РФ XV издание).

Линейность устанавливали на 5 уровнях концентраций – 80%, 90%, 100%, 110%, 120% от номинальной массы навески. За удовлетворительный результат валидации принимали графическое изображение регрессионной прямой и значение коэффициента корреляции (r), удовлетворяющее условию $|r| \geq 0,99$.

Повторяемость результатов доказывали на шести навесках растительного сырья массой 0,3 г (100%). Критерием приемлемости повторяемости результатов анализа выступала величина относительного стандартного отклонения (RSD), не превышающая 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты определения оптической плотности растворов характеризовались линейной зависимостью, величина коэффициента корреляции при этом составила 0,99, что позволило говорить о валидности методики для выбранного сырья по критерию линейности (рис.)

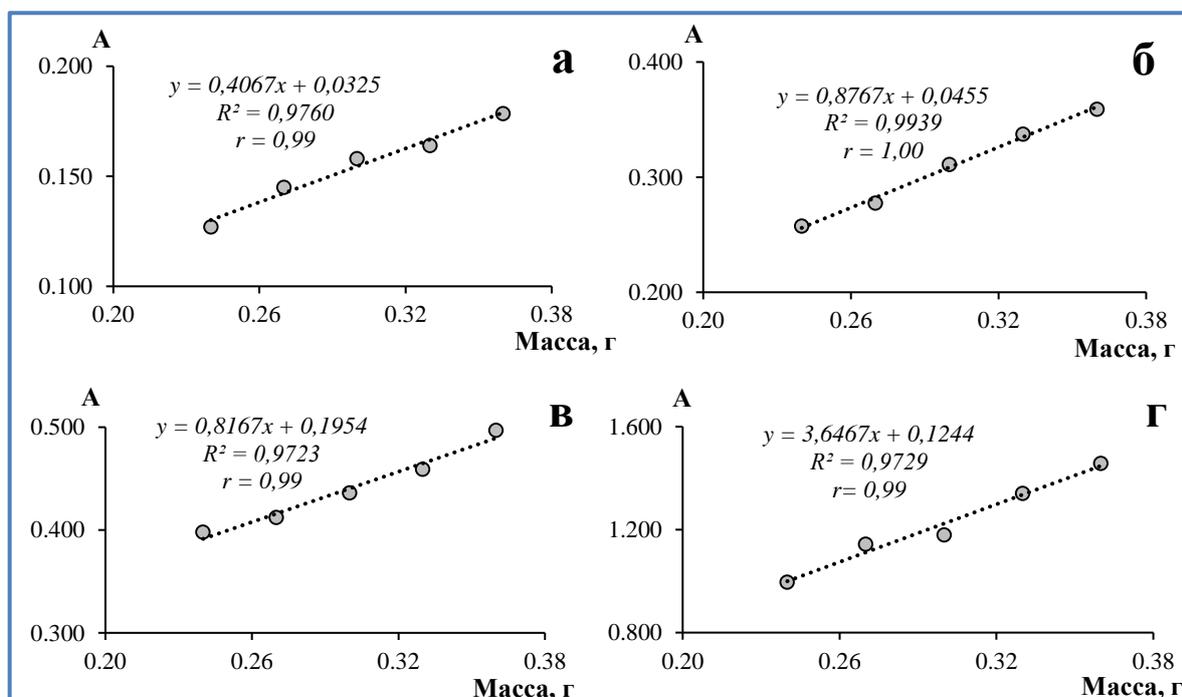


Рис. Зависимость оптической плотности растворов от массы зерна (а, в) и соломины (б, г) в водно-спиртовых и щелочных извлечениях соответственно

Величины, характеризующие повторяемость результатов, представлены в таблице (табл.).

Таблица. Метрологическая характеристика повторяемости результатов (n = 6, P = 0,95)

№	Оптическая плотность, А	Концентрация галловой кислоты, мг/см ³	x_i	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$	Метрологические характеристики
Водно-спиртовые извлечения						
Семена						
1	0,143	0,0015	2,44	0,05	0,0030	$S_x = 0,13$ $S_{x\text{ ср}} = 0,05$ $\Delta = 0,13$ $\varepsilon = 5\%$ RSD = 5%
2	0,145	0,0015	2,47	0,02	0,0005	
3	0,157	0,0016	2,63	0,14	0,0196	
4	0,143	0,0015	2,44	0,06	0,0032	
5	0,135	0,0014	2,33	0,17	0,0275	
6	0,158	0,0016	2,65	0,16	0,0256	
Среднее значение \bar{x}			2,49			
Сумма значений					0,0794	
Соломина						
1	0,307	0,0028	4,74	0,05	0,0023	$S_x = 0,08$ $S_{x\text{ ср}} = 0,03$ $\Delta = 0,09$ $\varepsilon = 2\%$ RSD = 2%
2	0,315	0,0029	4,86	0,07	0,0053	
3	0,317	0,0029	4,88	0,10	0,0098	
4	0,301	0,0028	4,66	0,13	0,0162	
5	0,309	0,0029	4,77	0,01	0,0002	
6	0,311	0,0029	4,80	0,02	0,0003	
Среднее значение \bar{x}			4,78			
Сумма значений					0,0339	
Щелочные извлечения						
Зерно						
1	0,423	0,0038	8,28	0,42	0,1787	$S_x = 0,07$ $S_{x\text{ ср}} = 0,23$ $\Delta = 0,60$ $\varepsilon = 7\%$ RSD = 7%
2	0,474	0,0043	9,21	0,51	0,2579	
3	0,423	0,0038	8,28	0,42	0,1787	
4	0,414	0,0037	8,12	0,59	0,3445	
5	0,490	0,0044	9,50	0,80	0,6397	
6	0,453	0,0041	8,53	0,12	0,0155	
Среднее значение \bar{x}			8,71			
Сумма значений					1,6151	
Соломина						
1	1,171	0,0101	21,93	0,04	0,0018	$S_x = 0,54$ $S_{x\text{ ср}} = 0,22$ $\Delta = 0,57$ $\varepsilon = 3\%$ RSD = 2%
2	1,131	0,0098	21,20	0,77	0,5967	
3	1,154	0,0100	21,62	0,35	0,1245	
4	1,178	0,0102	22,06	0,09	0,0073	
5	1,218	0,0105	22,79	0,82	0,6643	
6	1,188	0,0103	22,24	0,27	0,0716	
Среднее значение \bar{x}			21,97			
Сумма значений					1,4661	

Согласно проведенным расчетам, величина RSD не превышала 10%, что свидетельствовало о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таким образом, методика определения общего содержания и содержания свободных полифенолов в зерне и солоmine ячменя была отвалидирована по характеристикам линейность и повторяемость.

Сопоставление полученных данных позволило установить, что общее содержание и содержание свободных полифенолов в соломине ячменя выше ($21,9 \pm 0,6$ и $4,78 \pm 0,09$ мг/г), чем в зерне ($8,7 \pm 0,6$ и $2,49 \pm 0,13$ мг/г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Важнейшим этапом разработки и валидации методики является оценка неопределенности [Барановская, Медведевских, 2018]. Основными факторами неопределенности в данном исследовании выступали неоднородность сырья и случайные эффекты, которые могут оказывать влияние на достоверность получаемых результатов. В соответствии с неопределенностями были обозначены критерии для валидации – линейность и повторяемость. Согласно полученным данным методика спектрофотометрического определения полифенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу валидна и позволяет установить общее содержание и содержание свободных полифенолов в зерне и соломине ярового ячменя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барановская В.Б., Медведевских М.Ю. Валидация методик химического анализа: международные требования // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2018. Т. 84. № 12. С. 25–31.
2. Карцова Л.А., Алексеева А.В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений // Журнал аналитической химии. 2008. Т. 63. № 11. С. 1126–1136.
3. Оганесян Э.Т., Поздняков Д.И., Аджихметова С.Л., Червонная Н.М., Харченко И.И. Содержание фенольных соединений в растительных объектах // Медицинский вестник Башкортостана. 2022. Т. 17. № 5. С. 66–70.
4. Прудников П.С., Кривушина Д.А., Гуляева А.А. Реакция антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления липидов *Prunus cerasus* L. в ответ на действие гипертермии // Вестник аграрной науки. 2018. № 1 (70). С. 30–35.
5. Тетяников Н.В., Боме Н.А. Генетические ресурсы ячменя и их использование в селекции: монография, 2022. 215 с.
6. Тринеева О.В., Сливкин А.И. Валидация методики определения каротиноидов в плодах облепихи различными способами консервации // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 2. С. 145–151.
7. Тыжигирова В.В., Лопатина А.А. Анализ лекарственных препаратов нитрофурала УФ-спектрофотометрическим методом // Инновационные технологии в фармации: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2021. С. 115–120.
8. Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Hudek A., et al. Overview of polyphenols and their properties // Polyphenols: properties, recovery, and applications. 2018. P. 3–44. DOI: [10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4)
9. Desai N.M., Patil M., Pawar U.R. Plant metabolites under environmental stress. New York: Apple Academic Press, 2023. 332 p. DOI: [10.1201/9781003304869](https://doi.org/10.1201/9781003304869)

10. Lasky J.R., Josephs E.B., Morris J.P. Genotype-environment associations to reveal the molecular basis of environmental adaptation // *Plant cell*. 2023. V. 35 (1). P. 125–138. DOI: [10.1093/plcell/koac267](https://doi.org/10.1093/plcell/koac267)
11. Meng G., Rasmussen S.K., Christensen C.S.L., Fan W., Torp A.M. Molecular breeding of barley for quality traits and resilience to climate change // *Frontiers in Genetics*. 2023. V. 13. Art. 1039996. DOI: [10.3389/fgene.2022.1039996](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1039996)
12. Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain // *Industrial crops and products*. 2007. V. 25 (2). P. 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.11.001>
13. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? // *Plant physiology and biochemistry*. 2019. V. 144. P. 135–143. DOI: [10.1016/j.plaphy.2019.09.039](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039)
14. Soto-Hernández M., García-Mateos R., Palma-Tenango M. Plant physiological aspects of phenolic compounds. London: Books on Demand, 2019. 120 p.
15. Tian S., Sun Y., Chen Z., Yang Y., Wang Y. Functional Properties of Polyphenols in Grains and Effects of Physicochemical Processing on Polyphenols // *Journal of Food Quality*. 2019. V. 3. P. 1–8. DOI: [10.1155/2019/2793973](https://doi.org/10.1155/2019/2793973)
16. Yoon Y.M., Kim Y.K., Lee M.J. Lee M.J., et al. A Black Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivar, ‘Heukdahyang’, with High Polyphenol Content, High Yield, and Tolerance to Lodging Stress // *Korean Journal of Breeding Science*. 2022. V. 54 (2). P. 136–142. DOI: [10.9787/KJBS.2022.54.2.136](https://doi.org/10.9787/KJBS.2022.54.2.136)

Цитировать как

Шеромов А.М., Товстик Е.В., Шуплецова О.Н. Валидация методики определения свободных и связанных полифенолов в растениях ячменя методом спектрофотометрии // *Экобиотех*, 2024, Т. 7 № 2. С. 80-85. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-80-85](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-80-85) EDN: ABQUAL

Cited as

Sheromov A.M., Tovstik E.V., Shupletsova O.N. Validation of a method for determining free and bound polyphenols in barley plants by spectrophotometry. *Èkobioteh*. 2024, V. 7 (2). P. 80-85. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-80-85](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-80-85) EDN: ABQUAL (In Rus.)