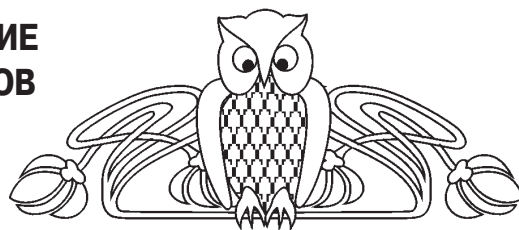




УДК 543:535.243

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ



О. Н. Сорокина, Е. Г. Сумина*, А. В. Петракова*, С. В. Барышева**

Саратовский государственный аграрный университет

E-mail: Sorokina-O-N@yandex.ru

*Саратовский государственный университет

E-mail: SuminaEG@yandex.ru

**Энгельсский технологический институт (филиал)

Саратовского государственного технического университета

Спектрофотометрическим методом проведено определение суммарного содержания флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения. Выбраны оптимальные условия пробоподготовки и спектрофотометрирования.

Ключевые слова: спектрофотометрия, флавоноиды, рутин, кверцетин.

Spectrophotometric Analysis of the Total Contents of Flavonoids in Medical Phytopreparations

O. N. Sorokina, E. G. Sumina,
A. V. Petrakova, S. V. Barysheva

The total contents of flavonoids in medical phytopreparations were estimated spectrophotometrically. Optimal conditions of sampling and spectrophotometry were chosen.

Key words: spectrophotometry, flavonoids, rutin, quercetin.

Введение

Флавоноиды – полифенольные соединения, присутствующие в ряде растений. Их называют *натуральными биологическими модификаторами реакции* из-за способности изменять реакцию организма на аллергены, вирусы и канцерогены. Об этом говорят их противовоспалительные, антиаллергические, антивирусные и антиканцерогенные свойства. По антиоксидантной активности флавоноиды превосходят витамины С, Е и каротиноиды [1–3].

В растительных и фармацевтических объектах флавоноидные соединения в основном содержатся в виде смесей различных гликозидов, относящихся к разным классам полифенолов, что затрудняет выбор метода их определения и требует проведения системных исследований.

Анализ литературных данных показал, что с этой целью используют разнообразные хроматографические [4–8], электрохимические [8, 9], электрофоретические [4, 8] методы анализа. Наиболее простым и доступным является метод молекулярной абсорбционной спектроскопии в

УФ- и видимой областях спектра, позволяющий определять суммарное содержание флавоноидов в исследуемых объектах [8, 10–12].

В связи с этим настоящая работа посвящена разработке спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в некоторых лекарственных препаратах растительного происхождения.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования выбраны водно-спиртовые извлечения из следующих препаратов, содержащих флавоноиды: прополис – в виде водно-спиртовой настойки и сухого вещества, софора японская, шелуха лука. Пробоподготовка объектов осуществлялась согласно [11].

В качестве стандартов выбраны кверцетин и рутин (ч.д.а.), наиболее часто встречающиеся в растительных объектах. Стандартные растворы исследуемых флавоноидов в 95%-м этиловом спирте с концентрацией 1 мг/мл готовили по точной навеске. Рабочие спиртовые растворы готовили разбавлением стандартных и хранили в холодильнике не более 7 дней.

Исследования проводили методом спектрофотометрии на спектрофотометре «Shimadzu», Япония (кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см) и на фотоколориметре КФК-2 МП (стеклянные кюветы с толщиной слоя 1 см).

Результаты и их обсуждение

С целью выбора аналитической длины волны предварительно были получены УФ-спектры спиртовых растворов исследуемых экстрактов, а также стандартных образцов рутина и кверцетина в индивидуальном состоянии и с добавлением хлорида алюминия, вступающего в реакции комплексообразования с исследуемыми соединениями [10]. Спектры поглощения представлены на рис. 1, 2.

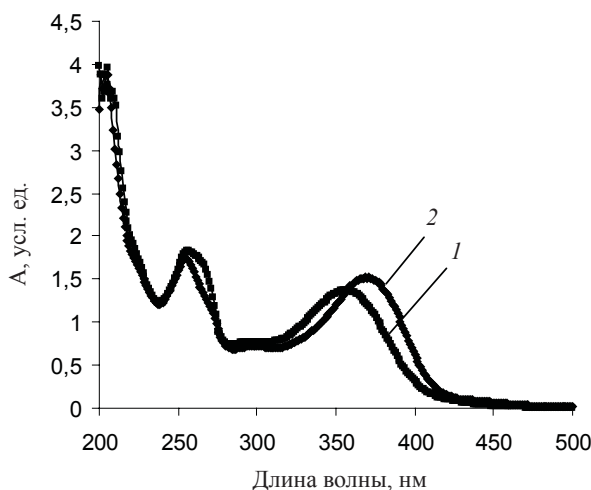


Рис. 1. УФ-спектры поглощения флавоноидов (раствор сравнения – дистиллированная вода): 1 – рутин, 2 – кверцетин; $C_R=50$ мкг/мл

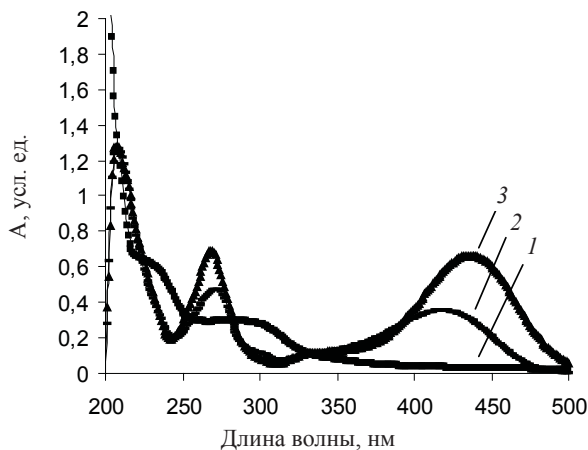


Рис. 2. УФ-спектры поглощения комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия (раствор сравнения – водно-спиртовой раствор хлорида алюминия): 1 – хлорид алюминия, 5%-ный; 2 – комплексы рутина с Al (III); 3 – комплексы кверцетина с Al (III); $C_R=25$ мкг/мл

Анализ спектров показывает, что отсутствие поглощения $AlCl_3$ в области максимумов поглощения его комплексов с кверцетином и рутином позволяет использовать в качестве раствора сравнения дистиллированную воду.

Из представленных данных также видно, что взаимодействие кверцетина и рутина с ионами алюминия приводит к bathochromic смещению на 66–67 нм максимумов поглощения исходных реагентов. Поскольку максимумы спектров поглощения кверцетина и рутина находятся в области 370 и 356 нм соответственно, а их комплексов с ионами алюминия при 437 и 422 нм – раздельное определение кверцетина и рутина невозможно. В связи с этим спектрофотометрический метод был использован для суммарного определения флавоноидов в пересчете на кверцетин или рутин. Вы-

бор стандартного вещества для количественного определения флавоноидов осуществляли с учетом близости спектров поглощения комплексов рутина и кверцетина с Al (III) и спектров поглощения комплексов флавоноидов, извлеченных из объектов. Такой подход, на наш взгляд, позволяет снизить погрешность определения при пересчете.

Исходные водно-спиртовые извлечения из растительных объектов в отсутствие хлорида алюминия не поглощают в области 400–450 нм, следовательно, не вносят погрешность в определение (рис. 3).

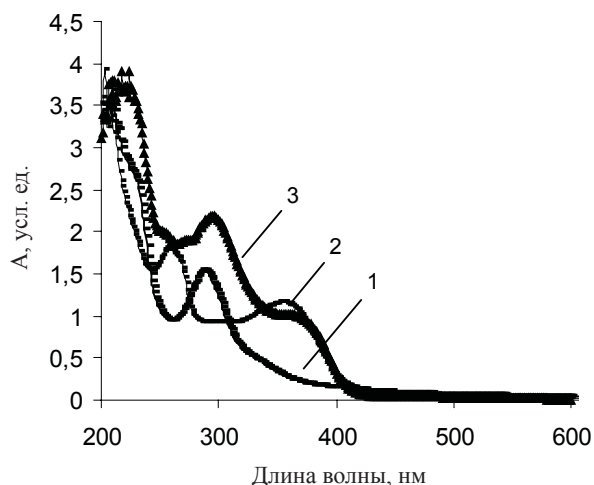


Рис. 3. УФ-спектры поглощения флавоноидов из растительного сырья (раствор сравнения – дистиллированная вода): 1 – прополис, 2 – шелуха лука, 3 – софора японская

Анализ данных на рис. 4 показывает, что максимумы спектров поглощения комплексов флавоноидов с Al (III) из водно-спиртовых экстрактов находятся при 413,5 нм для софоры японской; при 416,5 нм – для шелухи лука; при 430 нм – для прополиса. Следовательно, для пересчета содержания флавоноидов в первых двух объектах в качестве стандартного вещества использовали рутин, в последнем – кверцетин.

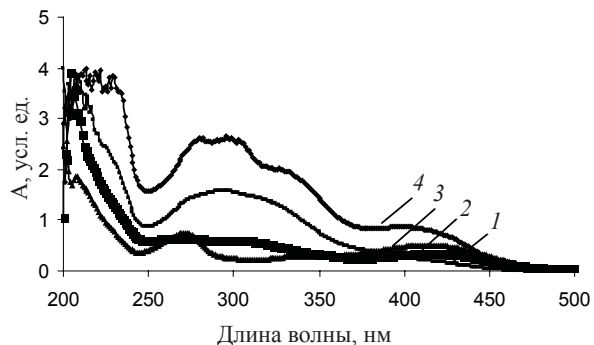


Рис. 4. УФ-спектры поглощения флавоноидов с Al (III) (раствор сравнения – дистиллированная вода): 1 – настойка прополиса, 2 – шелуха лука, 3 – софора японская, 4 – прополис (сухое вещество)



При выбранных оптимальных длинах волн для кверцетина (440 нм) и рутина (400 нм) были построены градуировочные графики, которые представлены на рис. 5, 6. Для рутина оптимальная длина волны 400 нм была выбрана вследствие того, что угол наклона градуировочного графика (характеризует чувствительность определения) при данной длине волны выше по сравнению с длиной волны, равной 440 нм.

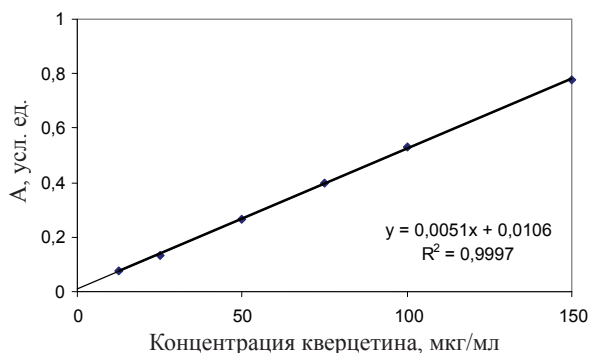


Рис. 5. Градуировочный график на кверцетин. $\lambda = 440$ нм. Раствор сравнения: водно-спиртовой раствор хлорида алюминия

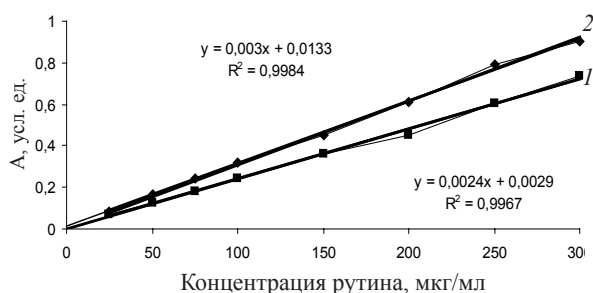


Рис. 6. Градуировочные графики на рутин: 1 – $\lambda = 440$ нм, 2 – $\lambda = 400$ нм. Раствор сравнения: водно-спиртовой раствор хлорида алюминия

Полученные зависимости линейны в интервале определяемых содержаний кверцетина 12,5–150 мкг/мл, рутин – 25–300 мкг/мл.

Контроль правильности проводили методом «введено-найдено» (табл. 1, 2). Значения S_r при определении кверцетина не превышают 0,017, рутин – 0,008; значения абсолютной погрешности измерения имеют как отрицательное, так и положительное отклонение от среднего значения, а значения относительной погрешности определения не превышают 4% для кверцетина и 2% – для рутина. Полученные результаты позволяют использовать данный метод для количественного определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин или кверцетин.

Таблица 1
Результаты определения кверцетина методом «введено-найдено» ($n = 3, p = 0,95, t_{pf} = 4,13$)

| Введено кверцетина, мкг | Найдено кверцетина, мкг | Метрологические характеристики | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------|-----------------------|
| | | S_r | Δx | $\Delta x/x_{cp}, \%$ |
| 30 | $29,2 \pm 0,9$ | 0,012 | +0,8 | 3 |
| 40 | $41,5 \pm 1,7$ | 0,017 | -1,5 | 4 |
| 60 | $58,5 \pm 2,3$ | 0,016 | +1,5 | 4 |
| 90 | $89,3 \pm 0,6$ | 0,002 | +0,7 | 1 |

Таблица 2
Результаты определения рутина методом «введено-найдено» ($n = 3, p = 0,95, t_{pf} = 4,13$)

| Введено рутина, мкг | Найдено рутина, мкг | Метрологические характеристики | | |
|---------------------|---------------------|--------------------------------|------------|-----------------------|
| | | S_r | Δx | $\Delta x/x_{cp}, \%$ |
| 90 | $88,9 \pm 1,8$ | 0,007 | +1,1 | 2 |
| 120 | $122 \pm 2,9$ | 0,008 | -2 | 2 |
| 180 | $178,6 \pm 2,2$ | 0,004 | +1,4 | 1 |

Количественное определение содержания суммы флавоноидов в исследуемом сырье проводили по одному из градуировочных графиков. Для контроля правильности использовали метод добавок. Результаты представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3
Статистическая обработка результатов определения флавоноидов в растительных объектах ($n = 3, p = 0,95, t_{pf} = 4,13$)

| Анализируемый образец | Найдено флавоноидов в пересчете на рутин, мкг/мл | | S_r | $\Delta x/x_{cp}, \%$ | Процентное содержание в сырье, % |
|---------------------------|--|--------------------------------|-------|-----------------------|----------------------------------|
| | $X_{cp} \pm \Delta X$ | пересчете на кверцетин, мкг/мл | | | |
| Софора японская | $126,6 \pm 5,9$ | – | 0,016 | 5 | 4 |
| Шелуха лука | $90,3 \pm 4,8$ | – | 0,018 | 5 | 2,8 |
| Прополис (сухое вещество) | – | $47,5 \pm 2,6$ | 0,019 | 6 | 1,5 |
| Прополис (настойка) | – | $31,4 \pm 0,4$ | 0,003 | 1 | 0,8 |



Таблица 4

Правильность результатов анализа. Проверка методом стандартной добавки

| Анализируемый объект | Найдено флавоноидов в пробе в пересчете на рутин, мкг | Добавка рутин, мкг | | S _г |
|----------------------|---|--------------------|------------|----------------|
| | | Введено | Найдено | |
| Софора японская | 158,3 ± 7,4 | 30 | 27,8 ± 2,9 | 0,036 |

Заключение

На основании полученных результатов разработана методика спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете их содержания на рутин или кверцетин. Установлено, что в софоре японской содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) составляет 126,6±5,9 мкг/мл, в шелухе лука – 90,3±4,8 мкг/мл, в прополисе (сухое вещество) – 47,5±2,6 мкг/мл (в пересчете на кверцетин), в прополисе (настойка) – 31,4±0,4. Правильность определения контролировали методом стандартной добавки. Относительное стандартное отклонение не превышает 0,04.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 12-03-00450а).

Список литературы

1. Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. М., 1974. 203 с.
2. Федосеева А. А., Лебедкова О. С., Каниболоцкая Л. В. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. 2008. № 3. С. 123–127.
3. Коноплева М. М. Фармакогнозия : природные биологически активные вещества. Витебск, 2007. 273 с.
4. Карцова Л. А., Алексеева А. В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63, № 11. С. 1126–1136.
5. Ванидзе М. Р., Каландия А. Г., Шалашвили А. Г. Флавоноидные соединения плодов фейхоа // Химия растительного сырья. 2009. № 3. С. 103–108.
6. Маркарян А. А., Абрамов А. А. Хроматографическое изучение фенольного состава сухого экстракта «Нефрофит» // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2003. Т. 44, № 5. С. 356–360.
7. Темердашев З. А., Фролова Н. А., Колычев И. А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66, № 4. С. 417–424.
8. Дмитриенко В. А., Кудринская В. А., Апяри В. В. Методы выделения, конденсирования и определения кверцетина // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67, № 4. С. 340–353.
9. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Определение флавонолов в фармпрепаратах методом вольтамперометрии // Хим.-фарм. журн. 2005. Т. 39, № 10. С. 54–56.
10. Бекетов Е. В., Абрамов А. А., Нестерова О. В. Идентификация и количественная оценка флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2005. Т. 46, № 4 С. 259–262.
11. Бубенчиков Р. А., Дроздова И. Л. Флавоноиды фиалки трехцветной // Фармацевтическая химия и фармакогнозия. 2004. № 2. С. 11–12.
12. Жукова О. Л., Абрамов А. А., Даргаева Т. Д. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2006. Т. 47, № 5. С. 342–345.