

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

А.В. Булатов*, **М.Т. Фалькова***, **М.О. Пушина***, **Л.Н. Москвин***, **Г.М. Алексеева****

* Санкт-Петербургский государственный университет
198504 Россия, Санкт-Петербурге, Университетский просп., 26

** Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия
197376 Россия, Санкт-Петербурге, ул. профессора Попова, 14
albina_my_mail@mail.ru

Поступила в редакцию 5 июля 2012 г., после исправлений – 15 августа 2012 г.

Разработана методика спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье, включающая стадию экстракционного выделения флавоноидов с последующим их детектированием по реакции образования окрашенных комплексов с ионами алюминия в мицеллярных средах цетилпиридиния хлорида. Предел обнаружения составил 0.2 % мас. в пересчете на рутин при массе пробы 0.1 г, время анализа – 35 мин.

Ключевые слова: спектрофотометрия, растительное сырье, флавоноиды, ПАВ.

Булатов Андрей Васильевич – д.х.н., доцент кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: проточные методы анализа, спектрофотометрия, анализ нефти и нефтепродуктов, разработка и аттестация государственных стандартных образцов.

Автор более 60 статей.

Фалькова Марина Тахировна – аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: проточные методы анализа, спектрофотометрия, анализ лекарственного растительного сырья, организованные среды на основе ПАВ.

Имеет 3 научные публикации.

Пушина Мария Олеговна – студентка 3 курса Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: спектрофотометрия, анализ лекарственного растительного сырья.

Имеет 2 научные публикации.

Москвин Леонид Николаевич – д.х.н., профессор, зав. кафедрой аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: методы разделения и концентрирования, хроматографические и проточные методы анализа, радиоаналитические методы, химические и радиохимические технологии в атомной энергетике.

Автор и соавтор более 800 публикаций, включая 3 монографии, учебник в трех томах, 450 статей в отечественных и зарубежных научных журналах и более 40 авторских свидетельств и патентов.

Алексеева Галина Михайловна – к.х.н., доцент, зав. кафедрой аналитической химии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии.

Область научных интересов: разработка методов анализа лекарственных препаратов, методы разделения и концентрирования.

Имеет более 50 публикаций.

Флавоноиды являются биологически активными веществами, которые способны повышать прочность стенок капилляров (Р-витаминная активность) за счет антиоксидантного действия, что важно при лечении хронической венозной недостаточности,

гипертонии и других сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с увеличением проницаемости кровеносных капилляров. Они усиливают действие аскорбиновой кислоты, оказывают седативное, противовоспалительное, кровоостанавливаю-

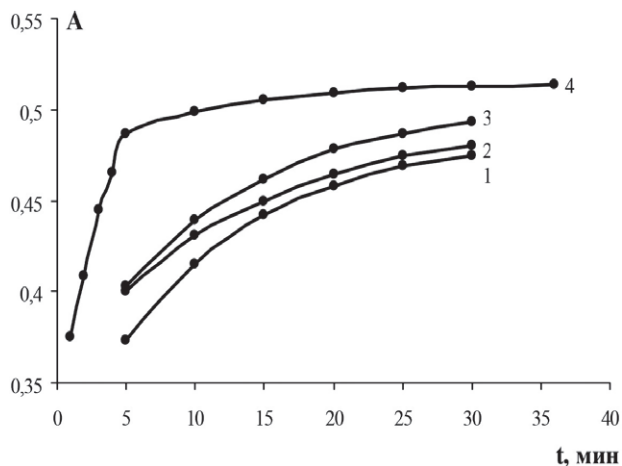


Рис. 1. Результаты исследования влияния различных ПАВ на скорость образования комплекса рутина с ионами алюминия: 1 – без ПАВ; 2 – Triton X-100; 3 – додецилсульфат натрия; 4 – ЦПХ

щие, противоязвенное действие; применяются при геморрое, служат хорошими желчегонными средствами [1-4]. Флавоноиды входят в состав многих препаратов растительного происхождения, к которым в настоящее время проявляется пристальное внимание, как к наиболее безопасным лекарственным средствам [5, 6]. В связи с этим актуальной задачей аналитической химии является разработка методик определения флавоноидов в растительном сырье. При этом для фармацевтических лабораторий наибольший интерес представляют методики, основанные на принципах широкодоступных аналитических методов, таких как спектрофотометрия.

Известные спектрофотометрические методики определения содержания флавоноидов, основанные на реакциях образования комплексов с ионами алюминия или железа (III), ограниченно пригодны для выполнения массовых анализов, так как лежащие в их основе фотометрические реакции являются кинетически замедленными [7].

Минимизировать кинетические ограничения при образовании аналитических форм можно за

Таблица 1

Спектрофотометрические характеристики комплекса рутина с ионами алюминия в присутствии различных ПАВ

ПАВ	Длина волны, нм	Молярный коэффициент светопоглощения, $\epsilon \cdot 10^4$ л/моль·см
Без добавления ПАВ	413	1.6
Додецилсульфат натрия	413	1.7
Triton X-100	413	1.7
Цетилпиридиния хлорид	413	1.9

счет проведения фотометрических реакций в мицеллярных средах [8-10]. До настоящего времени эта возможность улучшения аналитических характеристик методик определения флавоноидов еще не была изучена.

Цель работы – разработка экспрессной спектрофотометрической методики определения флавоноидов в лекарственном сырье по реакции образования их комплексов с ионами алюминия в мицеллярных средах ПАВ различной природы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы ПАВ (цетилпиридиния хлорида, додецилсульфата натрия и Triton X-100) готовили растворением препаратов в дистиллированной воде.

Растворы алюминия хлорида 4-50 г/л готовили растворением соответствующих навесок в 70 % растворе этилового спирта в воде.

Исходные растворы рутина готовили растворением его навесок в 70 % растворе этилового спирта при нагревании (50–60 °С). Рутин предварительно прокачивали при температуре 130 °С в течение 3 час до постоянной массы.

Ацетатный буферный раствор (pH = 4) готовили смешением 1 М раствора уксусной кислоты с 1 М раствором ацетата натрия в соотношении 1:1. pH буферного раствора корректировали добавлением 1 М HCl или 1 М NaOH.

Все используемые реактивы имели квалификацию не ниже ч.д.а.

При изучении влияния концентраций цетилпиридиния хлорида (ЦПХ) и ионов алюминия на протекание фотометрической реакции 1 мл 0.5 г/л раствора рутина помещали в мерную колбу емкостью 25 мл, прибавляли 1 мл раствора алюминия хлорида с концентрацией от 4 до 50 г/л и 1 мл ЦПХ (его концентрацию изменяли от 0.001 до 1 г/л). Объем раствора доводили в колбе до метки 70 % раствором этилового спирта. В качестве раствора сравнения использовали 0.02 г/л раствор рутина. Оптические плотности растворов измеряли через 5 мин при $\lambda = 413$ нм.

При изучении влияния кислотности на протекание фотометрической реакции в водной среде 1 мл 0.5 г/л раствора рутина помещали в мерную колбу емкостью 25 мл, прибавляли 1 мл 10 г/л раствора алюминия хлорида и 1 мл 0,01 г/л ЦПХ. Объем раствора доводили в колбе до метки дистиллированной водой. pH смешанного раствора корректировали добавлением 1 М HCl или 1 М NaOH и контролировали с помощью иономера И-500.

Оптические плотности и спектры поглощения растворов измеряли на спектрофотометре Shimadzu (UVmini-1240) ($l = 10$ мм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для фотометрического определения флавоноидов в растительном сырье использовали

реакцию образования их комплексов с ионами алюминия, так как эта фотометрическая реакция обеспечивает максимальную контрастность [11, 12].

Результаты исследования влияния цетилпиридиния хлорида, додецилсульфата натрия и Triton X-100 на скорость образования аналитической формы рутина представлены на рис. 1. Согласно полученным данным, при прочих равных условиях добавления любого из ПАВ приводят к увеличению оптической плотности растворов. Максимальный эффект проявляется в присутствии ЦПХ (крив. 4). В этом случае скорость протекания фотометрической реакции значительно возрастает. Для достижения близкого к предельному значению оптической плотности достаточно 5 мин. Кроме того, введение ЦПХ приводит к увеличению молярного коэффициента светопоглощения (табл. 1).

На основании полученных данных в качестве наиболее предпочтительного реагента был выбран ЦПХ.

В диапазоне концентраций ЦПХ 0.01 – 0.05 г/л оптическая плотность раствора аналитической формы достигает максимума и далее существенно не меняется (табл. 2). Исходя из этих данных, концентрация ЦПХ, равная 0.01 г/л, была выбрана в качестве оптимальной для дальнейших экспериментов.

Немаловажной особенностью является и тот факт, что в присутствии ЦПХ фотометрическая реакция эффективно протекает в среде дистиллированной воды. В этом случае в отличие от условий, предлагаемых в [7], отпадает необходимость использования этилового спирта для образования аналитической формы. При этом спектры поглощения комплекса рутина с алюминием в водной (рис. 2 кривая 1) и спиртовой средах (рис. 2 кривая 2) в присутствии ЦПХ практически идентичны.

В работе было изучено влияние концентрации ионов алюминия на оптическую плотность раствора аналитической формы (табл. 3). Согласно полученным данным аналитический сигнал максимален при концентрации ионов алюминия равной 10 г/л.

На следующем этапе было изучено влияние кислотности на протекание фотометрической реакции в водной среде. Было установлено, что при $\text{pH} < 4$ наблюдается значительное снижение оптической плотности фотометрируемого раствора, а при $\text{pH} > 5$ наблюдается образование коллоидного раствора. Для дальнейших экспериментов в качестве оптимального значения кислотности было выбрано $\text{pH} = 4$, создаваемое добавлением ацетатного буферного раствора ($\text{pH} = 4$).

Важным этапом при определении флавоноидов в лекарственном растительном сырье является пробоподготовка, включающая их извлечение. Была изучена эффективность извлечения флавоноидов из различного растительного сырья в водно-спиртовой раствор при нагревании. При проведении экспериментов варьировали время

Таблица 2

Результаты исследования влияния концентрации ЦПХ на оптическую плотность раствора аналитической формы рутина

$c(\text{ЦПХ}),$ г/л	0.001	0.01	0.05	0.1	0.5	1
А	0.470	0.505	0.505	0.498	0.498	0.500

Таблица 3

Результаты исследования влияния концентрации ионов алюминия на оптическую плотность раствора аналитической формы рутина

$c(\text{Al}^{3+}),$ г/л	4	6	8	10	20	30	40	50
А	0.304	0.343	0.347	0.437	0.401	0.379	0.352	0.313

извлечения, объем этилового спирта и навески сырья.

Для всего исследованного сырья (травы зверобоя, цветков ромашки и ноготков) оптимальными условиями извлечения флавоноидов с точки зрения минимизации временных затрат и затрат этилового спирта является кипячение 0.1 г пробы в 25 мл 70 % этилового спирта в течение 30 мин.

С учетом найденных условий выделения флавоноидов и образования их аналитических форм разработана методика их фотометрического определения в растительном лекарственном сырье.

В соответствии с разработанной методикой 0.1 г воздушно-сухой пробы сырья, измельченной и просеянной через сито с размером частиц 1-3 мм, помещают в круглодонную колбу емк. 100 мл и добавляют 25 мл 70 % этилового спирта. Извлечение осуществляют при нагревании с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор охлаждают и отфильтровывают через бумажный фильтр (красная лента). Фильтрат доводят в мерной колбе до 25 мл 70 % этиловым спиртом (раствор А).

1 мл раствора А переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляют 1 мл 10 г/л раствора алюминия хлорида, 1 мл 0.01 г/л раствора ЦПХ, 5 мл ацетатного буферного раствора и доводят раствор в колбе до метки дистиллированной водой. Оптическую плотность измеряют через 5 мин при длине волны 413 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный разбавлением раствора А дистиллированной водой в 25 раз.

Содержание флавоноидов определяют по градуировочному графику, построенному по стандартным растворам рутина. Градуировочный график линейен в диапазоне содержания флавоноидов от 0.2 до 25 % ($y = 0,8671x + 0.037$).

Разработанная методика была использована для определения флавоноидов в различном лекарственном растительном сырье (табл. 4). Параллельно определяли содержание флавоноидов в исследуемых объектах по известной методике

[7]. Расчет содержания флавоноидов в анализируемом растительном сырье осуществляли в пересчете на рутин, так как все максимумы в спектрах поглощения аналитических форм исследуемого растительного сырья практически совпали с максимумом поглощения аналитической формы

Таблица 4

Результаты определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье ($n = 3, P = 0.98$)

Лекарственное растительное сырье (производитель)	Найденное содержание, %	
	по разработанной методике	по методике ГФ XI
Зверобоя трава (ОАО «Красногорсклексредства»)	5.84 ± 0.05	5.72 ± 0.05
Ромашки цветки (ОАО «Красногорсклексредства»)	2.60 ± 0.04	2.51 ± 0.05
Ноготков цветки (ЗАО «Ст.-Медифарм»)	1.00 ± 0.05	1.02 ± 0.05

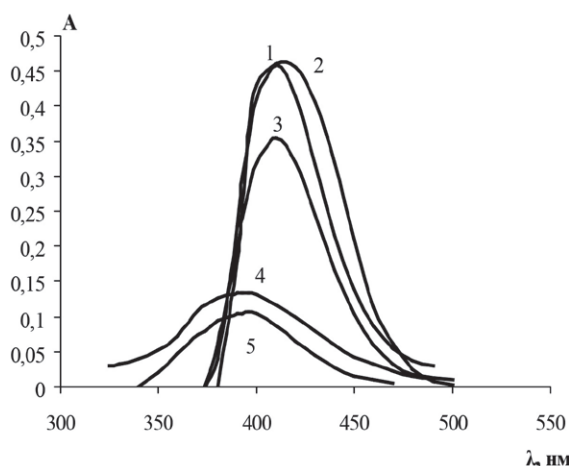


Рис. 2. Спектры поглощения комплекса рутина с алюминием в водной (1) и спиртовой (2) средах в присутствии ЦПХ и флавоноидов, выделенных из травы зверобоя (3); цветков ромашки (4) и календулы (5)

рутина (рис. 2). Расчет проведен с учетом потери в массе при высушивании.

Как видно из табл. 4, результаты, полученные по разработанной и стандартизованной методикам, отличаются незначимо, что подтверждает правильность получаемых результатов.

В табл. 5 представлены аналитические характеристики разработанной и известной методик [7]. Разработанная методика позволила сократить время проведения фотометрической реакции в 8 раз и устранить необходимость применения этилового спирта для ее проведения.

Авторы выражают благодарность РФФИ (Грант 10-03-00007-а) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). Изд. 2-ое. ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», Самара, 2007. 1239 с.
2. Биологическая активность растительных источников флавоноидов / А.В. Крикова и [др.] // Фармация. 2006. Т. 54. № 3. С. 17-18.
3. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania / Edita Bagdonaite et al. // Industrial Crops and Products. 2011. V. 35. P. 302-308.
4. Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids / Benguo Liu et al. // J. of Food Engineering. 2007. V. 78. P. 584-587.
5. Беликов В.В., Точкова Т.В. Реакция комплексообразования в анализе флавоноидов // Материалы 2 Всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. Алма-Ата, 1973. С. 168-172.
6. Евдокимова О.В. Препараты растительного происхождения при хронической венозной недостаточности // Новая аптека. 2006. № 4. С. 11-12.
7. Общие методы анализа: Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. МЗ СССР. Изд.11-е, доп. М.: «Медицина», 1987. 336 с.
8. Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества в анализе. Основные достижения и тенденции

Таблица 5

Сравнение аналитических характеристик разработанной методики и методики ГФ XI определения флавоноидов в растительном сырье

Характеристика	Разработанная методика	Методика ГФ XI
Время проведения фотометрической реакции, мин.	5	40
Масса пробы сырья, г	0.1	1.0
Диапазон определяемых концентраций, %	0.6 – 25	0.6 – 25
Предел обнаружения, %	0.2	0.2
Необходимость проведения фотометрической реакции в среде этилового спирта	нет	да

ции развития // Ж. аналит. химии. 2000. Т. 55. N.7. С. 679-686.

9. Доронин С.Ю., Чернова Р.К., Гусакова Н.Н. Конденсация п-(диметиламино)коричного альдегида с анилином и его замещенными в мицеллярных средах // Ж. общ. химии. 2005. Т. 75. Вып. 2. С. 288-295.

10. Доронин С.Ю., Чернова Р.К., Гусакова Н.Н. Аналитические возможности реакций первичных ароматических аминов с

п-диметиламинокоричным альдегидом в присутствии ионов и мицелл ПАВ // Ж. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 5. С. 471-478.

11. 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.

12. Беликов В.В., Колесник Н.Т. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье. А. с. СССР № 1507394. 1989.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN PLANT MATERIAL

A.V. Bulatov*, M.T. Falkova* M.O. Pushina*, L.N. Moskvin*, G.M. Alekseeva**

**Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Saint Petersburg State University
Saint Petersburg, Russia*

*** Department of Analytical Chemistry, Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy
Saint Petersburg, Russia*

The aim of this work was to develop a new spectrophotometric methodology for determination of flavonoids in medicinal raw material, including the stage of the extraction of flavonoids and their subsequent determination based on the reaction of obtaining their complexes with aluminum ions in micellar media of cetylpyridinium chloride.

The detection limit was 0.2 %, which is sufficient for this type of samples (0.1 g), time of analysis is 35 min.

Keywords: spectrophotometry, plant material, flavonoids, surfactants.