

УДК 615.074:543.061:582.842.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ПИОНА**Смирнова М.М., Яборова О.В., Накарякова Н.И., Люст Е.Н., Олешко О.А.***ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России»,
Пермь, e-mail: smirnova-m@pfa.ru*

Флавоноиды являются важной группой биологически активных веществ, обеспечивающих широкий спектр фармакологического действия многих растений: седативное, противовоспалительное, кровоостанавливающее и др. Качественными реакциями и методом хроматографического анализа на бумаге из травы пиона уклоняющегося и пиона садового выделены и идентифицированы по значениям Rf флавоноиды (рутин и кверцетин). Спектр поглощения извлечения из травы пиона садового имеет максимум, близкий к спектру рутина, поэтому он выбран в качестве доминирующего в сумме, на который в дальнейшем вели пересчет при количественном анализе. Нами определены оптимальные условия проведения количественного анализа сырья пиона садовых сортов и разработана методика определения флавоноидов спектрофотометрическим методом. Методика обладает хорошей воспроизводимостью, относительная ошибка метода, при доверительной вероятности 95 %, не превышает 2,59 %.

Ключевые слова: пион уклоняющийся, пион садовый, флавоноиды, спектрофотометрический метод**DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOIDS IN THE GRASS OF THE PION****Smirnova M.M., Yaborova O.V., Nakaryakova N.I., Lyust E.N., Oleshko O.A.***Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, e-mail: smirnova-m@pfa.ru*

Flavonoids are an important group of biologically active substances, providing a wide range of pharmacological action of many plants. They possess sedative, anti-inflammatory, hemostatic, and other effects. We isolated and identified flavonoids (rutin and quercetin) from a herb peony and peony garden by the Rf value using qualitative reaction and a method of chromatographic analysis on a paper. The absorption spectrum of extracts from herb of peony garden has a maximum close to the spectrum of the routine, so it was selected as the dominant by which later were recalculated in the quantitative analysis. We determined the optimal conditions for the quantitative analysis of raw peony of garden varieties and we developed a technique for determining flavonoids by spectrophotometry. The technique has good reproducibility, the relative error of the method, at 95% confidence level, does not exceed 2,59%.

Keywords: peony, peony garden, flavonoids, spectrophotometric method

Флавоноиды являются важной группой биологически активных веществ, присутствующей во всех видах лекарственного растительного сырья. Они обуславливают наличие у растений широкого спектра фармакологического действия: седативного, противовоспалительного, кровоостанавливающего, противоязвенного, желчегонного, капилляроукрепляющего. В то же время известно, что флавоноиды практически нетоксичны [1].

Известно, что химический состав травы пиона уклоняющегося (*Paeonia anomala* L.) представлен группами биологически активных веществ (БАВ): монотерпеновыми гликозидами, флавоноидами, дубильными веществами и др. [2].

Недостаточные объемы заготовок пиона уклоняющегося обуславливают целесообразность проведения исследований по внедрению в медицинскую практику нового вида лекарственного сырья – травы пиона садовых сортов.

Целью нашей работы являлась разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пиона садового.

Материалы и методы исследования

Для анализа использовали 1 образец травы пиона уклоняющегося и 6 образцов травы пиона садовых со-

ртов, заготовленные: в Пермском крае, в Челябинской, Свердловской областях и в Удмуртской Республике.

Для проведения качественного анализа навеску измельченного до размера частиц 1 мм воздушно-сухого сырья заливали 70% этанолом в соотношении 1:10 и кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Полученное извлечение охлаждали, фильтровали через бумажный фильтр и использовали для проведения характерных для флавоноидов качественных реакций: проба Синода, проба Брианта, реакция с 2% раствором хлорида алюминия, 1% раствором ацетата свинца основного, 10% раствором натрия гидроксида.

В качестве отправной точки для разработки методики количественного определения флавоноидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садового использовали методику количественного определения суммы флавоноидов в траве зверобоя спектрофотометрическим методом, по реакции комплексообразования с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида [3].

Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым методикам ГФ XII издания и с помощью программы Microsoft Excel [5].

**Результаты исследования
и их обсуждение**

В результате проведения качественных реакций получены характерные результаты реакций во всех изучаемых образцах, подтверждающие присутствие флавоноидов.

При исследовании всех образцов методом бумажной хроматографии на хромато-

граммах в видимом свете окрашенные зоны отсутствуют. В ультрафиолетовом свете выявлено 5 пятен с голубой, фиолетовой, светло-коричневой, темно-коричневой флюоресценцией при хроматографировании в системе уксусная кислота:вода (15:85) и 3 пятна с фиолетовой, светло- и темно-коричневой флюоресценцией – в системе бутанол : уксусная кислота:вода (4:1:2). Флюоресценция усиливалась после обработки хроматограмм 25% раствором аммиака. Окрашивание пятен 1, 2, 3 в желтый цвет после обработки 2% спиртовым раствором алюминия хлорида при хроматографирова-

нии в системе уксусная кислота : вода и 2, 3 – в системе бутанол : уксусная кислота : вода показало, что пятна имеют флавоноидную природу. Пятна 4, 5 не изменили своей окраски. Для полученных пятен рассчитывали значения Rf. Пятно 3 со значением $R_f = 0,68 \pm 0,03$ идентифицировано относительно свидетеля как рутин ($0,67 \pm 0,03$), а пятно 1 со значением $R_f = 0,10 \pm 0,03$ идентифицировано относительно свидетеля как кверцетин ($0,09 \pm 0,03$). Хроматографическая характеристика водно-спиртовых извлечений из травы пиона садовых сортов приведена в табл. 1.

Таблица 1

Хроматографическая характеристика водно-спиртовых извлечений из травы пиона садовых сортов в системе растворителей уксусная кислота:вода (15:85)

№ пятна	Значение Rf	В УФ-свете	В УФ-свете после обработки парами аммиака	После обработки раствором алюминия хлорида
1	0,10	светло-коричневая	желто-коричневая	желтая
2	0,42	темно-коричневая	желто-коричневая	желтая
3	0,68	светло-коричневая	желто-коричневая	желтая
4	0,75	фиолетовая	ярко-фиолетовая	фиолетовая
5	0,83	голубая	ярко-голубая	голубая

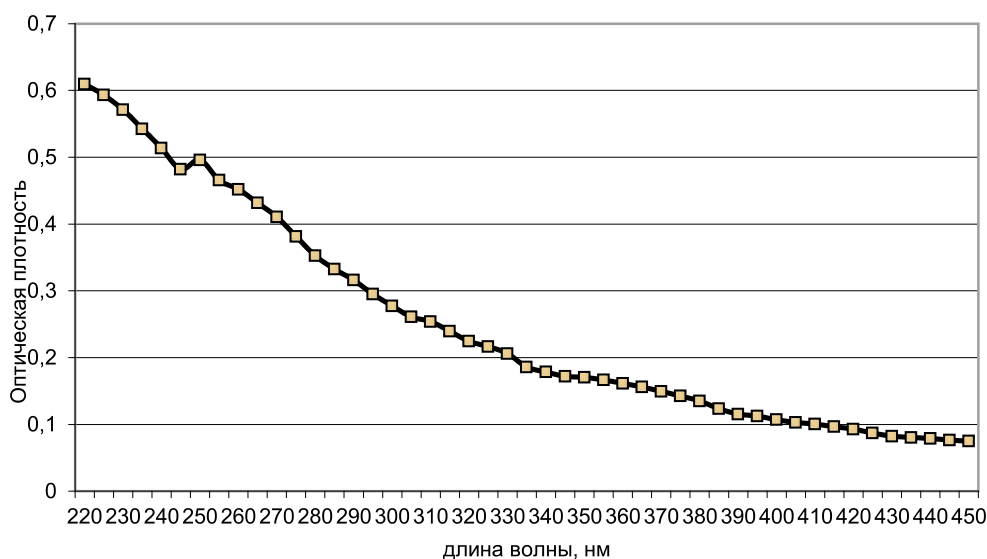


Рис. 1. Спектр поглощения спиртового извлечения травы пиона садового

Исследования показали, что в системе бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:2) пятна флавоноидов не имели четких границ и интенсивной флюоресценции в отличие от хроматографической картины в системе уксусная кислота:вода (15:85).

Таким образом, оптимальным условием для хроматографирования является система растворителей уксусная кислота:вода (15:85). По значениям Rf нами идентифи-

цированы рутин и кверцетин. Установлена идентичность люминесцентно-хроматографических характеристик извлечений из травы пиона уклоняющегося и пиона садового.

Для проведения количественного определения биологически активных веществ спектрофотометрическим методом предварительно определена длины волны (λ_{max}) с максимальным значением оптической плотности исследуемого раствора.

Реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в слабокислой среде наиболее избирательна, специфична и дает стабильные результаты, в частности, при определении сложных растительных объектов, содержащих окрашенные сопутствующие вещества [4]. Эта реакция положена в основу разрабатываемой нами методики количественного определения суммы флавоноидов в надземной части пиона садового.

В результате определения спектральной характеристики извлечений из травы пиона садового, полученных исчерпываю-

щей экстракцией 70% этанолом, установлено, что максимум находится в области 255 нм (рис. 1).

Для установления аналитической длины волны получали комплекс извлечения из травы пиона с 2% раствором хлорида алюминия, максимум поглощения наблюдается при $\lambda_{\text{max}} = 405$ нм. Близкий по значению максимум поглощения (λ_{max}) комплекса рутина с 2% раствором хлорида алюминия позволяет выбрать его в качестве стандартного образца. Спектры поглощения комплекса с алюминия хлоридом флавоноидов и рутина представлены на рис. 2.

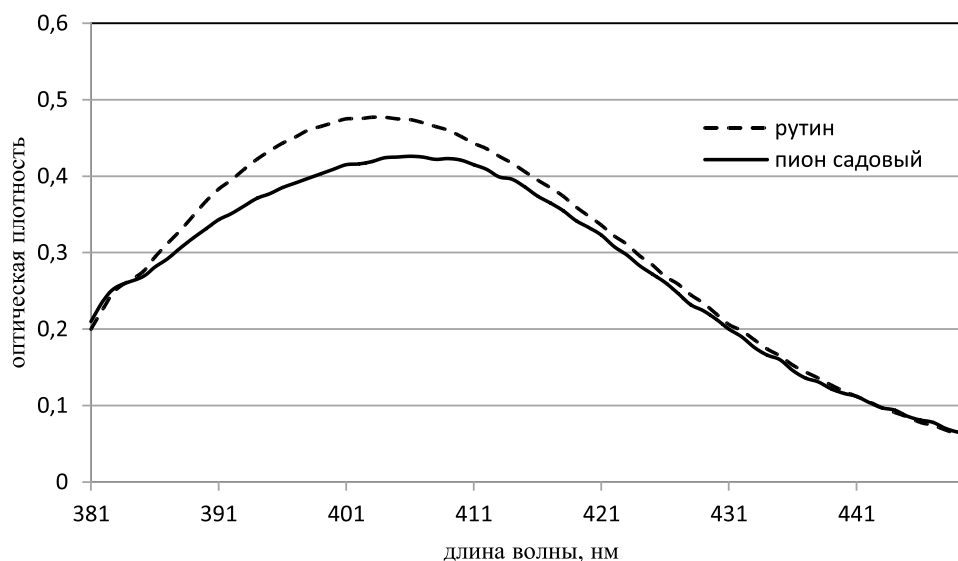


Рис. 2. Спектр поглощения комплекса флавоноидов травы пиона садового и ГТО рутин с алюминия хлоридом

Таблица 2

Результаты определения оптимального экстрагента для извлечения флавоноидов из травы пиона садового

Экстрагент	Содержание флавоноидов, %
Вода	$1,10 \pm 0,02$
20% этанол	$1,37 \pm 0,03$
30% этанол	$1,39 \pm 0,05$
40% этанол	$1,48 \pm 0,03$
50% этанол	$1,53 \pm 0,02$
70% этанол	$1,73 \pm 0,05$
90% этанол	$1,70 \pm 0,03$

В методиках количественного определения большинства флавоноидов и других биологически активных веществ для извлечения используются водно-спиртовые растворы различной концентрации. Нами в качестве экстрагента использованы вода и водно-спиртовые растворы 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% концентрации. В ходе

эксперимента установлено, что оптимальным экстрагентом является 70% этанол. Результаты представлены в табл. 2.

Размер частиц так же оказывает влияние на процесс экстрагирования, т.к. от него зависит поверхность раздела фаз между сырьем и экстрагентом. Нами изучена степень измельчения сырья от 0,5 до 3 мм. Результаты показали, что наиболее полный выход флавоноидов происходит из сырья с размером частиц 1 мм ($1,94 \pm 0,05$).

Следующим фактором, влияющим на степень извлечения флавоноидов из сырья, является соотношение «твердое тело – жидкость». Исследование проводили при соотношениях сырья и экстрагента 1:5, 1:10, 1:15, 1:20. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что максимальный выход флавоноидов наблюдается при соотношении 1:10 ($1,82 \pm 0,04$ %).

Для определения продолжительности экстракции изучено время наступления рав-

новесной концентрации в системе сырье-экстрагент. Для этого серию навесок сырья травы пиона садового настаивали с учетом ранее установленных параметров до прекращения прироста концентрации флавоноидов. Определение проводили через каждые 10 минут. Результаты исследований показали, что равновесная концентрация устанавливается через 30 минут.

С целью максимального извлечения биологически активных веществ из растительного материала, проводили определение количества ступеней экстракции и времени наступления равновесной концентрации на каждой из них. Равновесная концентрация на второй и третьей ступени наступала также через 30 минут.

При проведении спектрофотометрического определения величина оптической плотности должна находиться в пределах от 0,2 до 0,7. Поэтому нами изучено соотношение извлечения и 2% раствора алюминия хлорида. Разведения готовили в мерной колбе вместимостью 25 мл в соотношениях 1:1, 1:2, 1:3 (табл. 3).

Таблица 3

Зависимость оптической плотности от соотношения объема извлечения и 2% раствора алюминия хлорида

Соотношение	Оптическая плотность	Содержание суммы флавоноидов, %
1:1	0,175	1,82
1:2	0,223	2,37
1:3	0,180	1,90

Из данных таблицы следует, что оптимальным является соотношение извлечения и 2% раствора алюминия хлорида 1:2.

Таблица 4

Изменение оптической плотности комплекса с раствором алюминия хлорида во времени

Время	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %
10 мин	0,204	2,13
20 мин	0,205	2,14
30 мин	0,212	2,22
40 мин	0,211	2,21
50 мин	0,211	2,21
60 мин	0,211	2,21
1,5 часа	0,206	2,15

Для определения времени устойчивости комплекса измеряли величину оптической

плотности фотометрируемого раствора через каждые 10 минут в течение 1 часа с момента получения комплекса, а также через 1,5 часа. Как показывают данные, представленные в табл. 4, стабильность эффекта реакции наблюдается через 40 минут с момента получения комплекса флавоноидов с хромогенным реагентом и сохраняется в течение часа, через 1,5 часа она незначительно изменяется. Изменение величины оптической плотности, очевидно, связано с окислительно-восстановительными процессами, но на результаты анализа не оказывающими существенного влияния.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве пиона: сырье измельчают до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70% этанола. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через ватный тампон в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтр с попавшими на него частицами сырья помещают в колбу для экстрагирования. Экстракцию повторяют еще дважды в тех же условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят до метки 70% этанолом и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этаноле, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки 95% этанолом. Через 40 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл извлечения (раствор А) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% этанолом до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутин, приготовленного аналогично испытываемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - W)'}.$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m – масса сырья в граммах; m_0 – масса ГСО рутин в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения относительной ошибки метода проводили серию опытов по приведенной выше методике. Результаты статистической обработки полученных данных представлены в табл. 5.

Таблица 5

Метрологические характеристики количественного определения суммы флавоноидов в траве пиона садового

N	X	S ²	S	S _x	P, %	T(P,f)	Σ, %
10	2,403	0,000757	0,02751	0,008699	95	2,26	2,59

Относительная ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95 % составляет 2,59 %. Результаты проведенных исследований подтверждают воспроизводимость методики.

Выводы

1. В результате проведения качественных реакций в образцах травы пиона садовых сортов подтверждено присутствие флавоноидов. Методом бумажной хроматографии в системе уксусная кислота:вода (15:85) идентифицированы рутин и кверцетин.

2. На основании проведенных исследований установлена возможность оценки качества травы пиона по сумме флавоноидов в пересчете на рутин. Определены условия проведения количественного анализа травы пиона: экстрагент 70 % этанол, степень измельчения сырья 1 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:10, трехкратная экстракция по 30 минут. Оптимальное значение оптической плотности при длине волны $\lambda_{\max} = 405$ нм наблюдается при соотношении извлечения и 2 % раствора хлорида алюминия 1:2, время устойчивости комплекса от 40 до 60 минут.

3. Разработана методика количественного определения флавоноидов в сырье спектрофотометрическим методом. Методика обладает хорошей воспроизводимостью. Относительная ошибка метода, при доверительной вероятности 95 %, не превышает 2,59 %.

Список литературы

1. Беликов В.В., Точкова Т.В., Колесник Н.Т. Избирательный метод анализа флавоноидов и фито-химических препаратов. ВНИИХ – ТЛС. // Сб. Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств. – М., 1991. – Т. 2, Ч. 2. – С. 13.

2. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 333 с.

3. Государственная фармакопея СССР: В.2 т., Т. 1. – 11 изд., перераб. и доп. – Москва: Медицина, 1990. – 334 с.

4. Государственная фармакопея СССР: В.2 т., Т. 2. – 11 изд., перераб. и доп. – Москва: Медицина, 1987. – 398 с.

5. Государственная фармакопея Российской Федерации – XII изд. – Изд-во научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.

References

1. Belikov V.V., Tochkova T.V., Kolesnik N.T. Izbiratelnyy metod analiza flavonoidov i fito-chimicheskikh preparatov [Selective method for the analysis of flavonoids and phyto – chemicals]. Moscow, 1991. p. 13.

2. Georgievskiy V.P. Biologicheski aktivnye veshstva lekarstvennykh rasteniy [Biologically active substances of medicinal plants]. Novosibirsk: Science. Siberian Branch, 1990. 333 p.

3. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. Kn. 1. Edition 11 [State Pharmacopoeia of the USSR. Vol.1. Ed. 11]. Moscow: Medicina Publ., 1990, 334 p.

4. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. Kn. 2. Edition 11 [State Pharmacopoeia of the USSR. Vol.2. Ed. 11]. Moscow: Medicina Publ., 1987, 398 p.

5. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. Edition XII [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Ed. XII]. Research Center of Expertise of Medical Products Publ., 2008, 704 p.

Рецензенты:

Пулина Н.А., д.фарм.н., доцент, заведующая кафедрой фармацевтической технологии, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России», г. Пермь;

Белоногова В.Д., д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России», г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 05.12.2014.