

1 – ФГАОУ ВПО
«Российский университет
дружбы народов», 117198,
Россия, г. Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 6

2 – ГБОУ ВПО
Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России, 119991,
Россия, г. Москва,
ул. Трубецкая, 2, стр. 1

1 – Peoples' Friendship
University of Russia, 6,
Miklukho-Maklaya str.,
Moscow, 117198, Russia

2 – I.M. Sechenov First
Moscow State Medicinal
University, 2/1,
Trubeckaya str., Moscow,
119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: agentcat85@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

ПРИМЕНЕНИЕ ПРИНЦИПА СКВОЗНОЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ В АНАЛИЗЕ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ ПУСТЫРНИКА И ПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

А.И. Марахова^{1*}, А.А. Сорокина², Я.М. Станишевский¹

Резюме. В статье представлены данные по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пустырника и экстракционных препаратах спектрофотометрическим методом. Показаны особенности и возможности применения дифференциальной фотометрии в «сквозной» стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Обосновано подкисление растворов для образования комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом в соотношении 1:1.

Ключевые слова: трава пустырника, настойка и настой травы пустырника, спектрофотометрия, флавоноиды.

APPLICATION OF THROUGH STANDARDIZATION PRINCIPLE IN THE ANALYSIS OF FLAVONOIDS MOTHERWORT (*LEONURUS*, L.) HERB AND IT'S PREPARATION

A.I. Marakhova^{1*}, A.A. Sorokina², Ya.M. Stanishevskiy¹

Abstract. The article presents data on the development of methods of quantitative determination of total flavonoids in the motherwort (*Leonurus*, L.) herb, infusion and tincture spectrophotometric method. The features and applications of differential photometry "through" standardization of medicinal plants and drugs based on it. It is proved, that adding acid leads to the formation of complexes of flavonoids with aluminum chloride in a ratio of 1:1.

Keywords: motherwort herb, tincture and the infusion of herbs *Leonurus*, spectrophotometry, flavonoids.

ВВЕДЕНИЕ

В отечественной нормативной документации (НД) [1] трава пустырника стандартизуется по содержанию суммы экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом, и сумме иридоидов. Европейская Фармакопея (ЕФ) предполагает определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид посредством дифференциальной фотометрии после реакции с алюминия хлоридом [4].

Методика является достаточно трудоемкой и длительной в исполнении, предполагает использование нескольких агрессивных органических растворителей. Кроме того, методика ЕФ не применима для сквозной стандартизации сырья и препаратов, т.к. не воспроизводится в анализе водных и водно-спиртовых извлечений. В связи с этим следующей задачей стала разработка более простой и универсальной методики [6].

Как известно из литературных данных, пустырник содержит флавоноиды, составляющие значительную долю метаболизма его экстракционных препаратов [2]. Поэтому флавоноиды могут быть рассмотрены как вторая группа БАВ, по которой возможна стандартизация сырья, используемого для производства водно-спиртовых извлечений.

Согласно принципу сквозной стандартизации [3] установление содержания одной и той же группы БАВ в сырье и препаратах должно проводиться с использованием одного и того же метода.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы стала разработка методики количественного анализа флавоноидов в траве пустырника и его лекарственных препаратах.

Исследование проводилось с использованием промышленного образца травы пустырника фирмы-производителя ЗАО «Здоровье» серии 04583, настойки и настоя пустырника, полученных согласно методикам ГФ XI издания [1]. Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометрах Specord M40 (Specord, Германия) и Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, США).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с использованием промышленного образца травы пустырника фирмы-производителя ЗАО «Здоровье» серии 04583, настойки и настоя пустырника, полученных согласно методикам ГФ XI издания [1]. Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометрах Specord M40 (Specord, Германия) и Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения присутствия флавоноидов были проведены качественные реакции с водным и спиртовым извлечением из травы пустырника (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты качественных реакций на флавоноиды с извлечениями из травы пустырника и настойкой пустырника

Анализируемый образец	Реакция			
	С раствором алюминия хлорида	Проба Chinoda	С раствором свинца ацетата	С реактивом Вильсона
1 Спиртовое извлечение из травы пустырника	+	+	+	-
2 Водное извлечение из травы пустырника	-	-	+	-
3 Настойка пустырника	+	+	+	+

Примечание: «+» – положительный результат реакции;
«-» – отрицательный результат реакций.

Результаты реакций показали присутствие в пробах 1 и 3 флавоноидов, в том числе флавонолов и флавонол-3-гликозидов и флавоноидов, содержащих орто-гидроксильные группы. Однако реакция с ацетатом свинца не является достаточно специфичной, а реакция с реактивом Вильсона дает положительный результат только с настойкой пустырника, поэтому универсальными методами подтверждения присутствия флавоноидов в рамках сквозной стандартизации могут служить общегрупповая реакция с алюминия хлоридом и проба *Chinoda*.

При разработке методики определения суммы флавоноидов в траве пустырника подбирали оптимальные параметры, такие как концентрация спирта, соотношение сырья и экстрагента, время экстракции, время реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом, соотношение количества извлечения и 5% раствора алюминия хлорида. Результаты представлены в таблицах 2–5.

Таблица 2.

Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из травы пустырника (n=5; P=0,95)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырья : экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстрагент			
30	3:100	20	0,12±0,01
40			0,15±0,02
50			0,16±0,01
60			0,18±0,03
70			0,23±0,02
80			0,20±0,02
Соотношение сырья : экстрагент			
70	1:100	20	0,22±0,01
	2:100		0,22±0,02
	3:100		0,23±0,01
	4:100		0,19±0,03
	5:100		0,20±0,03
Время экстрагирования			
70	3:100	20	0,19±0,01
		30	0,20±0,03
		40	0,23±0,03
		50	0,23±0,01
		60	0,24±0,02

Таблица 3.

Влияние времени на полноту образования комплекса флавоноидов календулы с алюминия хлоридом (n=5; P=0,95)

Время	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,12±0,02	0,14±0,03	0,16±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01

Таблица 4.

Влияние соотношения аликвоты извлечения (2 мл) и объема 5% раствора алюминия хлорида на образование комплекса (n=5; P=0,95)

Объем раствора AlCl ₃ , мл	0,5 мл	1 мл	2 мл	3 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,15±0,02	0,21±0,03	0,23±0,01	0,23±0,01

Спектр поглощения комплекса флавоноидов календулы с алюминия хлоридом в диапазоне длин волн 350-450 нм представлен на рисунке 1. Содержания суммы флавоноидов в траве пустырника в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье составило 0,23±0,03%.

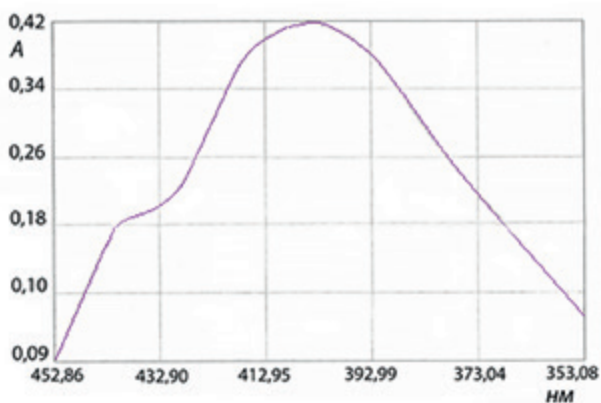


Рисунок 1. Спектр поглощения комплекса флавоноидов травы пустырника с алюминия хлоридом

Полученные данные были использованы при разработке методики определения содержания суммы флавоноидов в траве пустырника.

Методика. Навеску сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, массой около 3 г (точная навеска) помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, приливают 100 мл 70% спирта этилового, нагревают с обратным холодильником на плитке в течение 40 мин, периодически перемешивая для удаления частиц сырья со стенок колбы. Затем содержимое колбы охлаждают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки 70% спиртом этиловым (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 2 мл раствора А, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной

разведенной, 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят до метки 70% спиртом этиловым. Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов травы пустырника с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 403±2 нм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл раствора А, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят 70% спиртом этиловым до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного раствора рутина с алюминия хлоридом. Для этого около 0,05 г (точная навеска) рутина, предварительно высушенного до постоянной массы, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта этилового с концентрацией 96%, доводят до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки 96% спиртом. В качестве раствора сравнения используют 1 мл раствора А и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доведенные 96% спиртом в мерной колбе вместимостью 25 мл до метки.

Содержание в траве пустырника суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (X) в % рассчитывают по формуле:

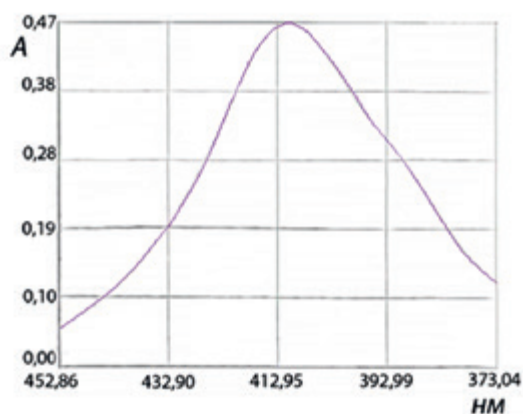
$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья, г; m₀ – масса ГСО рутина, г; W – влажность сырья, %.

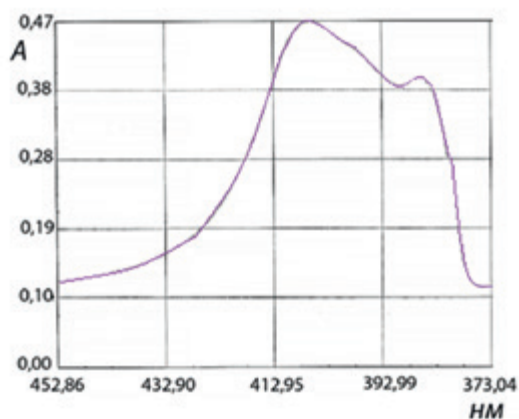
Для доказательства возможности применения дифференциальной спектрофотометрии в сквозной стандартизации травы пустырника и его препаратов по содержанию суммы флавоноидов были разработаны методики для настоя и настойки пустырника.

Определение суммы флавоноидов в настойке пустырника

Предварительно в диапазоне длин волн 370–450 нм были получены абсорбционные спектры комплексов флавоноидов настойки травы пустырника с алюминия хлоридом с добавлением кислоты уксусной и без добавления (рисунки 2 и 3 соответственно). Сравнительный анализ спектров показывает, что без добавления кислоты происходят процессы диссоциации флавоноидов, так как в этом случае, помимо ос-



а



б

Рисунок 2. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов настойки пустырника с алюминия хлоридом: а – в присутствии кислоты; б – полученный без кислоты

нового максимума поглощения, присутствует «плечо». Это может свидетельствовать о том, что реакция между флавоноидами и алюминия хлоридом протекает в соотношении более чем один к одному, то есть в реакции принимают участие фенольные гидроксилы кольца В [5]. Таким образом, более рациональной является методика с добавлением кислоты. Положение максимума поглощения дифференциального спектра флавоноидов настойки пустырника с хлоридом алюминия приходится на 411 ± 2 нм, что позволяет проводить пересчет суммы на рутин.

Методика. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл настойки пустырника, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят до метки 70% спиртом этиловым. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 411 ± 2 нм.

Для получения раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл настойки, добавля-

ют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки 70% спиртом этиловым.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мг/мл (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000}{A_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A₀ – оптическая плотность раствора ГСО рутина с алюминия хлоридом; m₀ – масса рутина в граммах.

Содержание в настойке пустырника суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило 0,065 мг/мл. Метрологические характеристики разработанной методики представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в настойке травы пустырника (n=5; P=0,95)

X _{ср}	S	S ²	±Δx	ε %
0,065	0,0011	1,25E-06	1,13E-05	1,7

Определение суммы флавоноидов в настое травы пустырника

Далее был проанализирован настой травы пустырника на возможность определения в нем флавоноидов аналогичным методом.

Настой готовили согласно инструкции по применению. Навеску сырья массой 3 г помещали в эмалированную посуду объемом 500 мл, приливали 200 мл доведенной до кипения воды и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин, затем настаивали при комнатной температуре 45 мин и фильтровали через ватно-марлевый фильтр.

При добавлении спиртового раствора алюминия хлорида к настою травы пустырника происходит выпадение осадка, что не дает возможности проведения спектрофотометрического анализа. Подбор разбавлений и соотношения объема аликвоты настоя и раствора алюминия хлорида, а также воды и спирта результатов не дали. Поэтому было решено использовать сухой алюминия хлорид и создавать кислую среду для подавления гидролиза. Также понадобилось добавление натрия ацетата для создания буферности, потому что сдвиг значения pH среды приводил к неустойчивости раствора (выпадению осадка).

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 5 мл настоя, добавляли 0,2 г сухого алюминия хло-



Agilent Cary Eclipse

рида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 0,2 г натрия ацетата и доводили 70% спиртом этиловым до метки (рабочий раствор). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 5 мл настоя, 0,2 г натрия ацетата, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводили 70% спиртом этиловым до метки (раствор сравнения). Через 40 мин снимали абсорбционный спектр комплекса соединений настоя травы пустырника с алюминия хлоридом. Максимум поглощения, характерный для комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом, отсутствовал, что свидетельствовало о том, что при данных условиях получения настоя флавоноиды пустырника в воду не переходят. Однако на абсорбционном спектре присутствовал ярко выраженный максимум при длине волны 348 ± 2 нм. При добавлении алюминия хлорида не наблюдалось пожелтение раствора. Длина волны и визуальная оценка результата протекающей в настое реакции при добавлении алюминия хлорида дает возможность предположить, что максимум поглощения обусловлен оптическими свойствами комплекса фенолкарбоновых кислот с алюминия хлоридом.

Таким образом, проведенные исследования показали, что дифференциальная спектрофотометрия для определения суммы флавоноидов может быть использована при стандартизации травы пустырника и настойки. При этом аналитическая длина волны в первом случае составляет 403 ± 2 нм, а во втором – 411 ± 2 нм. Обе длины волны позволяют проводить пересчет содержания флавоноидов на рутин. Флавоноиды пустырника в водное извлечение практически не переходят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве пустырника и настойке пустырника методом дифференциальной фотометрии. Показано, что данная методика применима в сквозной стандартизации травы пустырника

ка и его водно-спиртовых извлечений. В настое травы пустырника флавоноидная фракция достоверно не обнаружена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., вып. 1,2 – М.: Медицина, 1987, 1990. 336 с., 400 с.
2. Д.М. Попов, Е.В. Пашинская, Л.И.Коваленко. Контроль качества сырья и препаратов пустырника спектрофотометрическим методом // Фармация. 1992. № 4. С. 27–31.
3. И.А. Самылина. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств // Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты: материалы I Международного научного конгресса. – М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ, 1994. С. 254.
4. European Pharmacopoeia, 7th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2009.
5. C.G. Heijnen. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups // Toxicol. In Vitro. 2001. V. 15. № 1. P. 3-6.
6. A.I. Marakhova, E.V.Sergunova, A.A.Sorokina. Theoretical and experimental approaches to the development of spectrophotometric methods of analysis of phenolic compounds in herbal raw material and preparations based on it // International journal of applied and fundamental research: электронный научный журнал. 2015. № 1. URL: <http://www.science-sd.com/460-24763> (дата обращения 23.12.2015).

