

УДК 547.565, 615.072

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ЗЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО (*Solidago canadensis* L.)

А.Н. Кузьменко*, О.В. Нестерова, Ф.Ш. Сулейманова, А.А. Матюшин, И.И. Краснюк (мл.)

(ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России;

*e-mail: kuzmenko.mma@mail.ru)

Модифицирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве золотарника канадского методом дифференциальной спектрофотометрии. Выбраны оптимальные условия извлечения флавоноидов из травы золотарника канадского в зависимости от концентрации экстрагента, степени измельчения сырья и концентрации комплексообразователя. Проведена валидация методики по правильности, воспроизводимости, повторяемости и линейности.

Ключевые слова: рутин, количественное определение, спектрофотометрия, золотарник канадский, трава.

Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.) из семейства астровых (*Asteraceae*) – многолетнее травянистое растение, издавна применяемое в традиционной и народной медицине многих стран [1, 2]. Анализ литературных данных по исследованию травы золотарника канадского показал, что основными действующими веществами являются совместно присутствующие в ней изофлавоноиды, флавоноиды и гидроксикоричные кислоты [1]. Поскольку содержание действующих веществ считается одним из важных нормируемых показателей качества любого растительного сырья, необходимо проводить исследование по разработке методики количественного определения данных групп биологически активных веществ. По литературным данным, трава золотарника канадского содержит кемпферол, кверцетин, изорамнетин, астрагалин, рутин, изорамнетин-3-О-рутинозид, кемпферол-3-О-глюкорамнозид, кверцетин-3-О-глюкопиранозид и др. [1, 3–5].

В нормативной документации для травы золотарника канадского указывается количественное содержание флавоноидов [6]. Имеются также литературные данные по усовершенствованию методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в этом сырье [4]. При использовании модифицированной методики для собранной и высушенной в 2017 г. травы возникла проблема, связанная с тем, что величина поглощения оказалась больше 2, что неприемлемо для спектрофотометрического анализа. Цель нашей работы со-

стояла в разработке модификации дифференциальной спектрофотометрической методики количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин в траве золотарника канадского. Экстрагирование флавоноидов из сырья изучали с учетом экстрагента, степени измельченности сырья, времени экстрагирования, а также соотношения сырья и экстрагента. Статистическую обработку результатов осуществляли по общепринятой методике [7].

Объекты и методы исследований

Для разработки методики количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин 2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-3-[α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозилокси]-4Н-хромен-4-он (рис. 1) использовали траву золотарника канадского, собранную в фазу цветения и плодоношения (2017 г., Московская обл.). Спектрофотометрическое иссле-

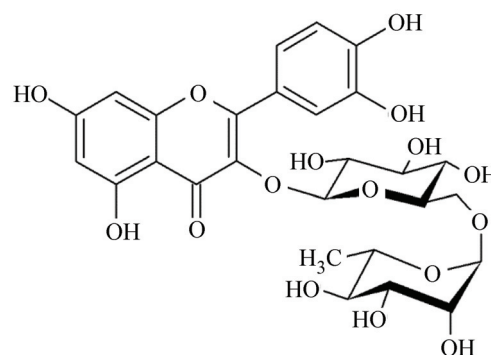


Рис. 1. Структурная формула рутина

дование было выполнено на приборе «SPECORD 250 Analytik Jena AG» (Германия) в кварцевых кюветках (толщина слоя 10 мм) в диапазоне длин волн 240–500 нм. Статистическую обработку осуществляли по методике, описанной в ГФ РФ. Валидация проведена по линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности методики.

Обсуждение результатов

По литературным данным, основной флавоноид в траве золотарника канадского – рутин [5]. В ходе эксперимента нами изучены условия экстракции флавоноидов в зависимости от экстрагента, степени измельченности, времени экстрагирования, соотношения сырья и экстрагента. При выборе оптимальной концентрации экстрагента использовали этанол, концентрация которого составляла 50, 60, 70, 80 и 96%. Приблизительно 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл спирта этилового и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали при умеренном кипении на водяной бане в течение 1 ч при периодическом встряхивании. Извлечение охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы спиртом, концентрация которого соответствовала используемой для экстракции. Затем продукт фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы не попали на фильтр, и отбрасывали первые 10 мл экстракта (раствор А). В две мерные колбы (25 мл) помещали по 1 мл

раствора А. В первую добавляли 2 мл 2%-го раствора $AlCl_3$, доводили объем до метки в обеих колбах подкисленным 96%-м этанолом и перемешивали (раствор Б). В качестве раствора сравнения использовали раствор из первой колбы (без добавления раствора $AlCl_3$). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре «Analytik Jena» при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) рассчитывали по формуле:

$$X, \% = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 50 \times 25 \times 2 \times (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б; 100, 50 и 25 – объем используемых при анализе мерных колб (мл); A_0 – удельный показатель поглощения рутина при длине волны 410 нм; a – навеска сырья (г); 1 и 2 – объем извлечения, взятый соответственно для анализа рутина и раствора Б (мл); W – влажность сырья, равная 10%. Наибольший выход флавоноидов отмечен нами в случае использования 80%-го этилового спирта.

При определении оптимальной степени дисперсности сырья траву золотарника канадского измельчали, просеивали через сито и брали навески с определенным размером частиц, мм: менее 0,25; 0,25–0,4; 0,4–1,0; 1–3; 3–4 и более 4. Далее использовали методику, описанную выше. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Обнаружено, что наибольший выход флавоноидов наблюдался при размере частиц сырья

Т а б л и ц а 1

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве золотарнике канадского

Концентрация спирта, %	50	60	70	80	96
Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,115 \pm 0,102	3,473 \pm 0,103	3,721 \pm 0,009	4,068 \pm 0,012	3,798 \pm 0,029

Т а б л и ц а 2

Зависимость содержания флавоноидов в траве золотарника канадского от дисперсности сырья

Размер частиц, мм	<0,25	0,25–0,4	0,4–1	1–3	3–4
Содержание фенолкарбоновых кислот, %	7,474 \pm 0,029	6,833 \pm 0,019	6,249 \pm 0,033	3,007 \pm 0,018	0,634 \pm 0,014

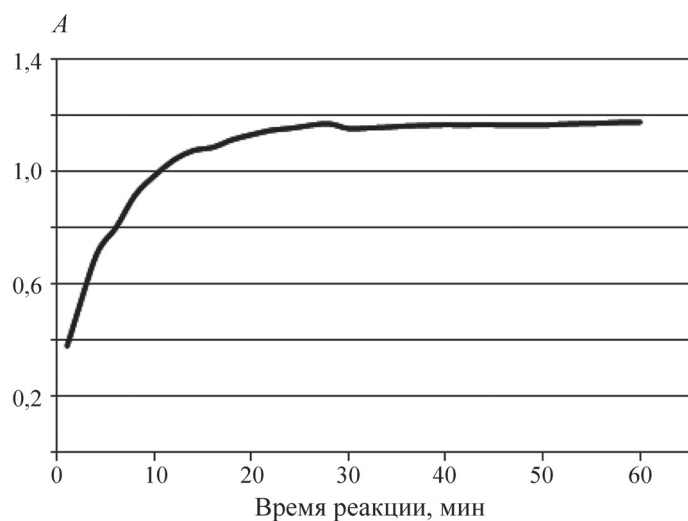


Рис. 2. Зависимость оптической плотности извлечения от времени реакции при добавлении комплексообразователя

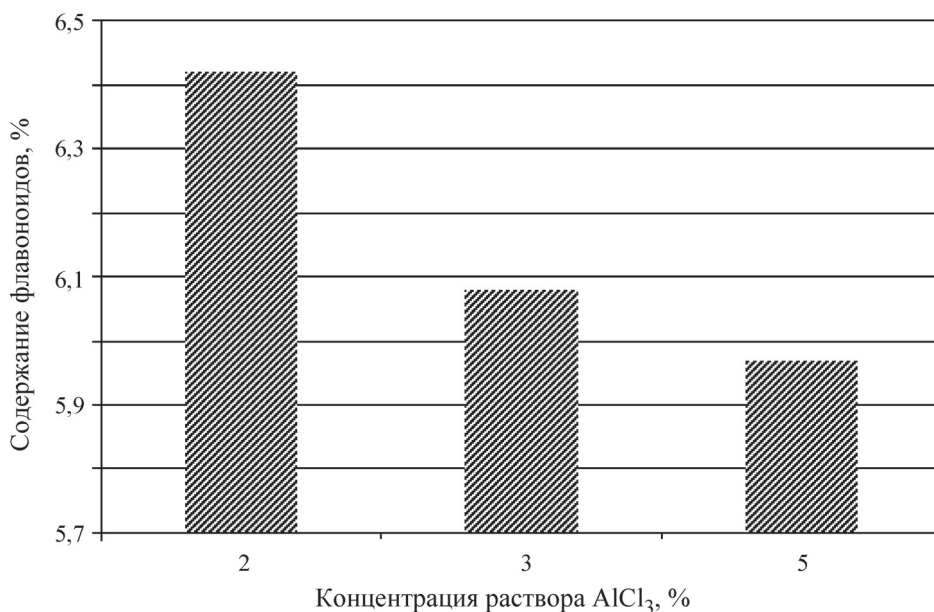


Рис. 3. Влияние концентрации комплексообразователя на результаты определения флавоноидов

менее 0,25 мм. Оптимальный размер частиц сырья для определения суммы флавоноидов составляет 1 мм.

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности растворы были проанализированы в течение 1 ч после добавления комплексообразователя. Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 25 мин и сохраняется в течение наблюдаемого периода (рис. 2).

Согласно экспериментальным данным, для получения наиболее стабильных результатов следует использовать в качестве комплексообразующе-

го реагента 2%-й спиртовой раствор алюминия хлорида при соотношении экстракта и комплексообразователя 1:2 (рис. 3).

Для того чтобы предлагаемая методика заняла достойное место при определении качества травы золотарника канадского, была проведена ее валидация. Линейность определяли на пяти экспериментальных точках (уровнях концентрации). Растворы готовили путем увеличения аликвотной доли по описанной выше методике. Аликвотные доли были равны 0,75; 1,0; 2,0; 2,5 и 3,0 мл соответственно (табл. 3). На рис. 4 представлена зависимость значения оптической

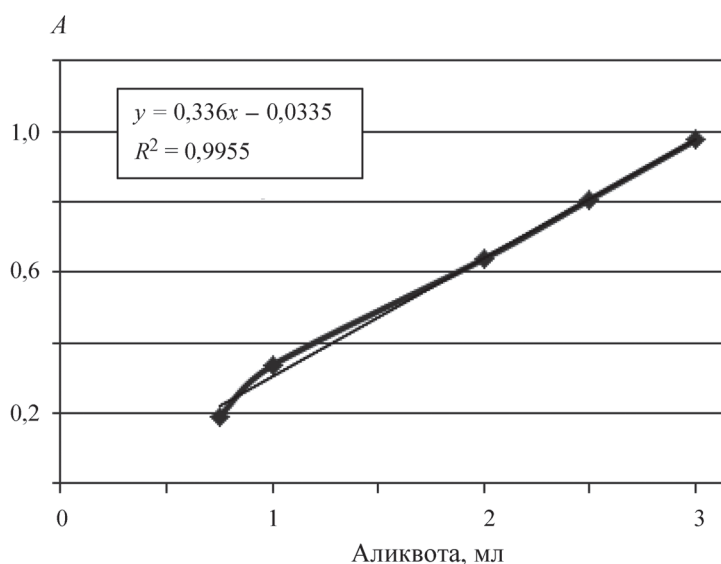


Рис. 4. Результаты определения линейности методики

плотности полученных извлечений от содержания флавоноидов в навеске сырья. Коэффициент корреляции, являющийся критерием приемлемости линейности, составил 0,9955, что близко к 1 и свидетельствует о линейной зависимости значения оптической плотности от содержания действующих веществ.

При установлении повторяемости проводили шесть параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (S) и относительного стандартного отклонения ($S_{\text{отн.}}$) (табл. 4). Относительное стандартное отклонение составило 2,43% (не более 10%), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях по-

Т а б л и ц а 3

Результаты определения линейности методики

Номер образца	Аликвотная доля, мл	Оптическая плотность, A
1	0,75	0,1909
2	1,00	0,3360
3	2,00	0,6384
4	2,50	0,8064
5	3,00	0,9750

Т а б л и ц а 4

Результаты оценки повторяемости методики

Номер образца			1	2	3	4	5	6
Содержание флавоноидов, %			4,063	4,223	4,308	4,069	4,165	4,070
f	X_{cp}	S^2	S	ΔX	ΔX_{cp}	$t(99\%)$	$\varepsilon, \%$	RSD, %
5	4,150	0,0102	0,1009	0,4066	0,1818	4,03	4,38	2,43

Обозначения: f – число степеней свободы, X_{cp} – среднее значение выборки, S^2 – дисперсия, S – стандартное отклонение, ΔX – полуширина доверительного интервала единичного определения, ΔX_{cp} – полуширина доверительного интервала, t – критерий Стьюдента, ε – относительная ошибка, RSD – величина относительного стандартного отклонения.

Т а б л и ц а 5

Результаты оценки воспроизводимости методики

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве золотарника канадского, %		
	образец 1	образец 2	образец 3
1	4,068	4,078	4,063
2	4,083	4,181	4,213
3	4,059	4,133	4,165
X_{cp}	4,071	4,131	4,147
RSD, %	0,30	1,24	1,85

Т а б л и ц а 6

Результаты определения правильности методики

Номер образца	Суммарное содержание флавоноидов в пробе, г	Добавлено РСО рутин, г	Содержание		Открываемость, %
			ожидаемое, г	полученное, г	
1	0,0430	0,010	0,0530	0,0519	97,92
	0,0430	0,020	0,0630	0,0635	100,79
	0,0430	0,030	0,0730	0,0711	97,40
2	0,0584	0,010	0,0684	0,0657	96,05
	0,0584	0,020	0,0784	0,0817	104,21
	0,0584	0,030	0,0884	0,0855	96,72
3	0,0487	0,010	0,0587	0,0568	96,76
	0,0487	0,020	0,0687	0,0710	103,35
	0,0487	0,030	0,0787	0,0805	102,29
Метрологическая характеристика: $X_{cp} = 9,499\%$. RSD = 3,172%					

вторяемости. Воспроизводимость определяли два аналитика на трех образцах в трех повторностях. Критерии приемлемости не превышали 5%, что указывает на удовлетворительную воспроизводимость методики (табл. 5).

Правильность оценивали путем добавления к исследуемому извлечению известного количества раствора стандартного образца рутин с использованием девяти определений при трех значениях концентрации, охватывающих требуемый диапазон. Из приведенных данных (табл. 6) следует, что относительное стандартное отклонение не превышает 5%. Это свидетельствует об отсутствии систе-

матической ошибки разработанной нами методики.

Таким образом, разработана методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в траве *Solidago canadensis* L. Установлены оптимальные параметры экстракции: сырье диаметром частиц не более 1 мм, экстрагент – 80%-й раствор этанола, концентрация комплексообразователя ($AlCl_3$) 2%. Разработанная методика валидирована по следующим показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность. Результаты показали, что предлагаемая методика высокочувствительна, правильна и воспроизводима.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федотова В.В., Челомбитько В.А. // Научные ведомости. 2012. № 16 (135). Вып. 19. С. 136.
2. European Pharmacopoeia 8.0 – EDQM. Strasbourg, 2015. P. 1264.

3. Федотова В.В., Челомбитько В.А., Постникова Н.В. // Медицинский альманах. 2013. № 1 (25). С. 185.
4. Тохтабаева Г.М., Баслинов С.Л., Копылова И.Е., Сокольская Т.А., Бурова А.Е. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 10. С. 4.
5. Apati P., Szentmihalyi K., Balazs A., Baumann D., Hamburger M., Kristo T.Sz., Szöke E., Kery A. // Chromatographia. 2002. N 56. P. 65.
6. ФС 42-2777-91. Фармакопейная статья «Трава золотарника канадского».
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М., 2015.

Поступила в редакцию 12.03.18

После доработки 15.04.18

Принята к публикации 05.09.18

MODIFICATION OF QUANTITATIVE METHOD OF FLAVONOID DETERMINATION IN GOLDENROD CANADENSIS (SOLIDAGO CANADENSIS) HERB

A.N. Kuzmenko*, O.V. Nesterova, F.Sh. Suleymanova, A.A. Matyushin, I.I. Krasnyuk (Jr.)

(Sechenov First State Medical University, *e-mail: kuzmenko.mma@mail.ru)

The technique of quantitative determination of the sum of flavonoids in terms of rutin in the Canadian Goldenrod herb has been modified by the method of differential spectrophotometry. Optimal conditions for the extraction of flavonoids from the Canadian Goldenrod herb are chosen depending on the concentration of the extractant, the degree of crushing of the raw materials, and the concentration of the complexing agent. Validation of the method for correctness, reproducibility, repeatability and linearity was carried out.

Key words: rutin, quantitative determination, spectrophotometry, herbs, Solidago canadensis L.

Сведения об авторах: Кузьменко Алексей Николаевич – профессор кафедры аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (kuzmenko.mma@mail.ru); Нестерова Ольга Владимировна – профессор кафедры общей химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (olganesterova9297@mail.com); Сулейманова Фидан Ширин кызы – ассистент, аспирант кафедры общей химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (suleymanovafidan5@gmail.com); Матюшин Алексей Аркадьевич – доцент кафедры общей химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. фарм. наук (foralan79@mail.ru), Краснюк Иван Иванович (мл.) – зав. кафедрой аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук.