

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 615.322.07:582.681.26

Мартынов А.М.¹, Даргаева Т.Д.²

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ФИАЛКИ ОДНОЦВЕТКОВОЙ

¹ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал
ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»
Минздрава России, Иркутск, Россия

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических
растений», Москва, Россия

Разработана методика спектрофотометрического количественного определения флавоноидов в траве фиалки одноцветковой. Проведённые валидационные исследования подтверждают специфичность, прецизионность (сходимость), линейность, правильность и диапазон применения предложенной методики. При апробировании данной методики на шести партиях сырья получены воспроизводимые результаты. Это свидетельствует о том, что предлагаемая методика может использоваться в количественном анализе флавоноидов фиалки одноцветковой.

Ключевые слова: фиалка одноцветковая, флавоноиды, спектрофотометрия, количественное определение

PROCEDURE OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL FLAVONOID CONTENT IN THE UNIFLOROUS VIOLET

Martynov A.M.¹, Dargaeva T.D.²

¹ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical
Academy of Continuing Professional Education, Irkutsk, Russia

² All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russia

The object of the study was the aerial part of flowered violet (*Viola uniflora* L.), harvested at flowering time in the Irkutsk region. The herb contains flavonoids, phenolic acids, coumarins, tannins, polysaccharides, fatty acids and amino acids, as well as macro- and microelements. During the development of methods of quantitative determination of flavonoid compounds we experimentally established optimum conditions for their extraction from vegetable raw materials: the degree of grinding – 2 mm, extractant – 70% ethyl alcohol, the ratio of raw material – extractant 1:50 total extraction duration – 1 hour (twice), time complexation reaction with a 5% ethanolic solution of aluminum chloride is 30 minutes. Stability of the complex was maintained for 1.5 hours. Quantitation of flavonoid compounds in the raw material were determined by differential spectrophotometry based on rutin. The optical density of the solution was measured on a recording spectrophotometer "Lambda 35 UV/VIS" Perkin Elmer instruments (USA) at a wavelength of 409 ± 2 nm in a cell with a working thickness of 10 mm. The content of flavonoids in terms of rutin in different samples ranged from 1.66 to 2.03 %. The developed method of quantitative spectrophotometric determination of the amount of flavonoids in *Viola uniflora* grass validated in terms of specificity, precision (convergence), linearity, accuracy and set its range of applications. According to the results of validation techniques quantification procedure of flavonoids *Viola uniflora* grass it has been found that the technique is reproducible and can be used in quantitative analysis.

Key words: uniflorous violet, flavonoids, spectrophotometry, quantitative determination

Фиалка одноцветковая (*Viola uniflora* L.) довольно широко распространённый на территории Сибири вид. Растение используют в народной медицине при нервных болезнях, в качестве наружного противовоспалительного средства [8]. В траве содержатся флавоноиды, фенольные кислоты, полисахариды, кумарины, дубильные вещества, жирные кислоты и аминокислоты [5, 7]. В составе группы флавоноидных соединений преобладают кверцетин, рутин и ряд других соединений [6]. При изучении элементного состава объекта установлено большое содержание калия (до 5,5–6 %). Кроме того, обнаружено значительное количество фосфора и других важных макро- и микроэлементов

[7]. Проведёнными нами исследованиями установлено, что водно-спиртовые и водные извлечения *V. uniflora* обладают антиоксидантными, противовоспалительными, гастропротекторными и отхаркивающими свойствами [4]. Эти фармакологические свойства обусловлены преимущественно группой фенольных соединений. Поэтому мы сочли целесообразным оценку качества данного растительного объекта проводить по содержанию флавоноидов (в пересчёте на рутин).

Цель работы: разработать методику количественного определения флавоноидов в траве фиалки одноцветковой для дальнейшего её использования при подготовке проекта ФСП «Фиалка одноцветковой трава».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила надземная часть фиалки одноцветковой. Образцы сырья заготавливались в период цветения в 2013–2014 гг. в Иркутской области, Красноярском крае и в Республике Бурятия.

Количественное определение флавоноидов проводили методом спектрофотометрии на приборе СФ-46 в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм и на регистрирующем спектрофотометре «Lambda 35 UV/VIS» (Perkin Elmer Instruments, США). При разработке методики количественного определения флавоноидных соединений был использован метод дифференциальной спектрофотометрии [3].

Известно, что в основе этого метода положена реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия, в результате которой происходит bathochромный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 до 390–430 нм. Эта методика позволяет проводить непосредственное спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов с хлоридом алюминия, извлечения их из сырья, без дополнительных стадий очистки.

Полученные нами спиртоводные извлечения из травы фиалки при взаимодействии с 5%-м раствором хлорида алюминия показали максимум поглощения при длине волны 409 нм, что совпадало с максимумом поглощения государственного стандартного образца (ГСО) рутина с хлоридом алюминия (рис. 1). Таким образом, при количественной оценке сырья в качестве стандарта использовали рутин.

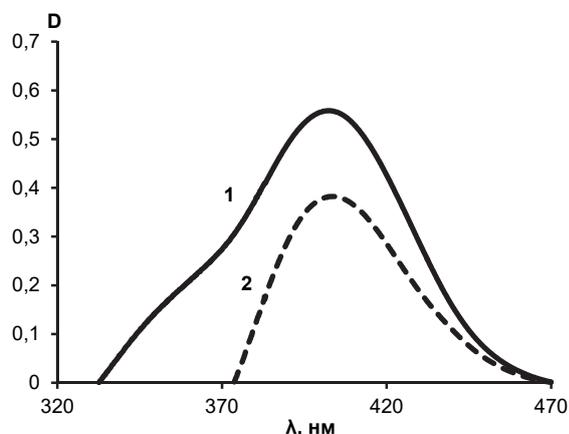


Рис. 1. УФ-спектр поглощения комплекса стандартного образца (СО) рутина (1) и комплекса суммы флавоноидов фиалки одноцветковой (2) с 5%-м спиртовым раствором хлорида алюминия.

В ходе разработки методики количественного определения флавоноидных соединений экспериментально установлены оптимальные условия их извлечения из растительного сырья: степень измельчения – 2 мм; экстрагент – 70%-й спирт этиловый; соотношение сырье – экстрагент 1 : 50; общая продолжительность экстракции – 1 час (двукратно); время реакции комплексообразования с 5%-м спиртовым раствором хлоридом алюминия – 30 мин. Стабильность комплекса сохранялась на протяжении 1,5 часов. Количественную оценку флавоноидных соединений в сырье проводили в пересчёте на рутин.

Методика количественного определения флавоноидов. Около 1 г (точная навеска) сырья, измельчённого до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 50 мл 70%-го этилового спирта. Колбу соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 мин при периодическом встряхивании для смывания со стенок частиц сырья. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, не допуская попадания частиц сырья на фильтр. К остатку в колбе прибавляли 30 мл этилового спирта той же концентрации. Экстракцию повторяли в течение 15 мин и фильтровали в ту же мерную колбу. После охлаждения объём извлечения в колбе доводили до метки 70%-м этиловым спиртом и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл раствора А, затем прибавляли 2 мл 5%-го раствора хлорида алюминия в 70%-м этиловом спирте, через 10 мин – 0,2 мл 3%-го раствора уксусной кислоты и доводили этим же спиртом до метки (раствор Б). Через 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на регистрирующем спектрофотометре «Lambda 35 UV/VIS» (Perkin Elmer Instruments, США) при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. Для того чтобы исключить возможное влияние окрашенных сопутствующих соединений на ход количественного анализа, в качестве раствора сравнения использовали раствор, включающий 1 мл извлечения (раствор А), 0,2 мл 3%-го уксусной кислоты и доведённый 70%-м этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца (РСО) рутин с хлоридом алюминия, приготовленного аналогично испытываемым растворам.

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

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора комплекса СО рутин; m – масса сырья (г); m₀ – масса СО (стандартный образец) рутин (г); W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Приготовление раствора СО рутин: около 0,05 г (точная навеска) рутин (Sigma, кат. № 2303), предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, растворяли в 85 мл 70%-го этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводили объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Срок годности приготовленного раствора – 3 месяца.

Приготовление 5%-го спиртового раствора хлорида алюминия: 5 г хлорида алюминия (ГОСТ 3759-75) растворяли в 50 мл 70%-го этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивали.

Валидацию методики проводили с использованием метода математической статистики по показателям: правильность, специфичность, прецизионность (воспроизводимость) [1, 2].

Оценку правильности методики количественного определения устанавливали на модельных смесях ГСО рутин. Для этого готовились растворы рутина пяти концентраций в процентах к его исходной концентрации (50 %; 75 %; 100 %; 125 %; 150 %). Далее анализ проводился с 5%-м спиртовым раствором хлорида алюминия по методике количественного определения. Зависимость оптической плотности (y) от концентрации рутина (x) выражается уравнением $y = 271,8x + 0,0156$; коэффициент корреляции $R = 0,999710$ (рис. 2).

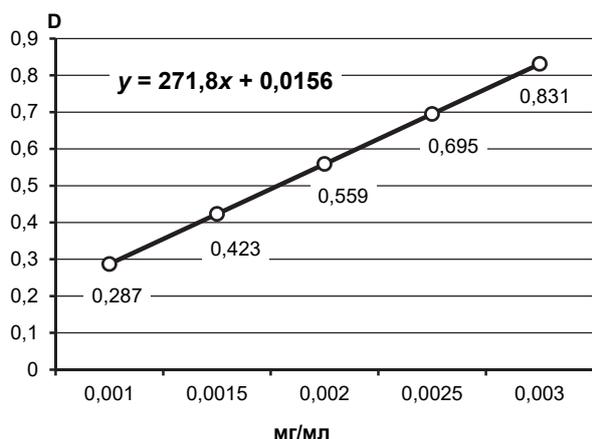


Рис. 2. График зависимости оптической плотности растворов рутина от концентрации.

Результаты количественных определений свидетельствуют о том, что данная методика имеет линейный характер в изучаемом интервале концентраций.

Специфичность методики подтверждается путём доказательства способности к светопоглощению флавоноидных соединений при определённой длине волны и сравнивается с аналогичными свойствами стандартного образца. Установлено, что УФ-спектр

поглощения комплекса ГСО рутин с 5%-м раствором алюминия хлорида и УФ-спектр поглощения комплекса суммы флавоноидов фиалки одноцветковой с этим же реактивом имеют максимум поглощения при длине волны 409 ± 2 нм и практически совпадают, следовательно, предлагаемая методика специфична.

Определение интервала применения методики проводили в извлечениях фиалки различной концентрации, полученных с использованием 70%-го этилового спирта. Из полученного извлечения готовили разведения в процентах к его исходной концентрации (50 %; 75 %; 100 %; 125 %; 150 %). Полученные результаты, как и при определении линейности стандартного образца рутина, обрабатывали с использованием метода наименьших квадратов. Зависимость оптической плотности извлечений (y) от массы навески сырья (x) представлена уравнением: $y = 2,663x + 0,081$; коэффициент корреляции $R = 0,99962$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в пределах измеряемых концентраций зависимость оптической плотности спиртовых извлечений от количественного содержания суммы флавоноидов имеет линейный характер.

Определение сходимости методики устанавливали в 6 повторностях на одном и том же образце сырья. Результаты количественной оценки суммы флавоноидных соединений в исследуемом объекте в пересчёте на рутин приведены в таблице 1.

Таблица 1
Результаты количественного определения суммы флавоноидных соединений в сырье фиалки одноцветковой в пересчёте на рутин

№ анализа	Содержание суммы флавоноидов, %	Метрологические характеристики
1	1,83	$\bar{X} = 1,84$ $S^2 = 0,00224$ $SD = 0,0473286$ $\Delta X = 0,049$ $\bar{X} \pm \Delta X = 1,84 \pm 0,05$ $RSD = 2,57 \%$
2	1,79	
3	1,82	
4	1,92	
5	1,87	
6	1,81	

Таблица 2
Результаты опытов с добавками рутина к навеске сырья фиалки одноцветковой

Сумма флавоноидов в аликвоте в пересчёте на рутин, мг	Добавлено ГСО рутин, мг	Расчётное содержание флавоноидных соединений, мг	Найдено флавоноидных соединений, мг	Открываемость R, %	Метрологические характеристики
0,181	0,025	0,206	0,203	98,54	$\bar{X} = 99,84$ $S^2 = 0,88555$ $SD = 0,9410366$ $\Delta X = \pm 0,81$ $\bar{X} = 99,84 \pm 0,81$ $RSD = 0,94 \%$
0,181	0,025	0,206	0,205	99,51	
0,181	0,025	0,206	0,208	100,97	
0,181	0,050	0,231	0,233	100,86	
0,181	0,050	0,231	0,229	98,70	
0,181	0,050	0,231	0,232	100,43	
0,181	0,075	0,256	0,255	99,61	
0,181	0,075	0,256	0,258	100,78	
0,181	0,075	0,256	0,254	99,22	

Количественное содержание флавоноидов в траве фиалки одноцветковой

№ образца	Место заготовки	Дата заготовки	Содержание суммы флавоноидов, %
1	Иркутская область, Иркутский сельский район	05.2014	1,88 ± 0,05
2	Иркутская область, Качугский район, окрестности с. Манзурка	05.2014	1,66 ± 0,06
3	Иркутская область, окрестности ст. Слюдянка	06.2013	1,84 ± 0,07
4	Республика Бурятия, Тункинский район, пос. Аршан, верховья р. Кынгарги	06.2013	1,89 ± 0,05
5	Иркутская область, Ангарский район, окрестности с. Савватеевка	05.2013	1,75 ± 0,07
6	Красноярский край, Канский район, п. Зелёный луг	05.2013	2,03 ± 0,05

Установлена величина стандартного отклонения (SD) и показатель относительного стандартного отклонения (RSD), который составлял 2,57 % при возможном предельном максимуме 10 %.

Правильность методики количественного определения флавоноидов в траве устанавливали с использованием добавок ГСО рутин трёх концентраций. Исследование проводилось на одном образце сырья. При воспроизведении разработанной методики процент восстановления варьировал от 98,54 до 100,97 %, средняя величина составляла 99,84 % (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика количественного определения с использованием дифференциальной спектрофотометрии валидна и может быть использована для определения флавоноидных соединений в траве фиалки одноцветковой. Данная методика апробирована на шести партиях сырья. Количественное содержание суммы флавоноидов (в пересчёте на рутин) варьировало от 1,66 до 2,03 % (табл. 3).

Методика количественного определения суммы флавоноидных соединений использована при разработке проекта ФСП «Фиалки одноцветковой трава».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в траве фиалки одноцветковой. Валидационные исследования подтверждают специфичность, прецизионность (сходимость), линейность, правильность и диапазон применения предложенной методики.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
Beregovykh VV (ed.). (2008). Validation of analytical methods for drug manufacturers: standard user manual for the drug production enterprise [Validatsiya analiticheskikh metodik dlya proizvoditeley lekarstv: tipovoe rukovodstvo predpriyatiya po proizvodstvu lekarstvennykh sredstv]. Moskva, 132 p.
2. ГОСТ ИСО 5725-3-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели пре-

цизионности стандартного метода измерений. – М.: Госстандарт, 2002. – 28 с.

GOST ISO 5725-3-2002. (2002). Accuracy (propriety and precision) of measurement methods and results. Part 3. Intermediate parameters of precision of the standard measurement method [Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmereniy. Chast' 3. Promezhtochnyye pokazateli pretsizionnosti standartnogo metoda izmereniy]. Moskva, 28 p.

3. Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С. Флавоноиды растений. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 218 с.

Klyshev LK, Bandyukova VA, Alyukina LS. (1978). Plant flavonoids [Flavonoidy rasteniy]. Alma-Ata, 218 p.

4. Мартынов А.М., Коротыч Л.И., Колбовская Т.М., Семенов Н.В. Исследование гастропротекторного действия спиртового и полисахаридного экстрактов фиалки одноцветковой // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 4. – С. 120–123.

Martynov AM, Korytov LI, Kolbovskaya TM, Semenov NV. (2012). Investigation of gastroprotective action of spirituous and polysaccharide extracts of uniflorous violet [Issledovanie gastroprotektornogo deystviya spirtovogo i polisakharidnogo ekstraktov fialki odnotsvetkovoy]. Bulletin' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra, (4), 120-123.

5. Мартынов А.М., Пупыкина К.А., Даргаева Т.Д. Состав высших жирных кислот, выделенных из травы *Viola uniflora* L. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. – 2011. – № 2. – С. 96–99.

Martynov AM, Pupykina KA, Dargaeva TD. (2011). Composition of higher fatty acids extracted from herb *Viola uniflora* L. [Sostav vysshikh zhirnykh kislot, vydelennykh iz travy *Viola uniflora* L.]. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Geografiya. Geoekologiya, (2), 96-99.

6. Мартынов А.М., Собенин А.М. Полифенольные соединения и аминокислоты надземной части *Viola uniflora* L. // Растительные ресурсы. – 2011. – № 2. – С. 118–122.

Martynov AM, Sobenin AM. (2011). Polyphenolic compounds and amino acids in the overground parts of *Viola uniflora* L. [Polifenol'nye soedineniya i aminokisloty nadzemnoy chasti *Viola uniflora* L.]. Rastitel'nye resursy, (2), 118-122.

7. Мартынов А.М., Чупарина Е.В. Содержание и состав полисахаридных комплексов, макро- и микро-

элементов *Viola uniflora* L. (Violaceae) // Растительные ресурсы. – 2009. – № 4. – С. 67–73.

Martynov AM, Chuparina EV. (2009). Content and composition of polysaccharide complexes of macro- and micronutrients of *Viola uniflora* L. (Violaceae) [Soderzhanie i sostav polisakharidnykh kompleksov, makro- i mikroelementov *Viola uniflora* L. (Violaceae)]. *Rastitel'nye resursy*, (4), 67-73.

8. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав и использование: Семейства Thymelaeaceae-Paeoniaceae. – Л.: Наука, 1986. – С. 20–29.

Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition and use. Families Thymelaeaceae-Paeoniaceae [*Rastitel'nye resursy SSSR. Tsvetkovyye rasteniya, ikh khimicheskiy sostav i ispol'zovanie: Semeystva Thymelaeaceae-Paeoniaceae*] (1986). Leningrad, 20-29.

Сведения об авторах
Information about the authors

Мартынов Альберт Михайлович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиала ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (664041, г. Иркутск, Юбилейный, 100; тел.: (3952) 46-53-86; e-mail: martinov_irk@mail.ru)

Martynov Albert Mikhailovich – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Science of Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (664079, Irkutsk, Yubileyniy, 100; tel.: (3952) 46-53-86; e-mail: martinov_irk@mail.ru)

Даргаева Тамара Даризжаповна – доктор фармацевтических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (117216, г. Москва, ул. Грина, 7; тел.: (495) 382-73-77; e-mail: dvnslava@rambler.ru)

Dargaeva Tamara Darizhapovna – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Chief Research Officer at All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (117216, Moscow, Grin str., 7; tel.: (495) 382-73-77; e-mail: dvnslava@rambler.ru)