

Рекомендована д-м біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 615.451.16:615.014.24:615.326

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ПЛОДАХ СОФОРИ ЯПОНСЬКОЇ (*SOPHORA JAPONICA L.*)

© О. Ю. Галкін, А. Г. Котов¹

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ
ТОВ «Універсальне агентство «ПРО-ФАРМА», Київ

¹ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» МОЗ України, Харків

Резюме: проведено розробку методик ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів у плодах софори японської. Для проведення якісного аналізу сировини проводили ідентифікацію флавоноїдів методом тонкошарової хроматографії. Для кількісного аналізу плодів софори проводили визначення суми флавоноїдів у перерахунку на рутин. Вивчені валідаційні характеристики методики кількісного визначення (специфічність, діапазон застосування, лінійність і прецизійність) виявилися цілком задовільними для даного виду аналізу. На основі отриманих даних можливе формування відповідних розділів АНД на сировину.

Ключові слова: плоди софори японської, ідентифікація, кількісне визначення, флавоноїди, стандартизація.

Вступ. Препарати плодів софори японської виявляють бактерицидну дію проти золотистого стафілокока і кишкової палички. Настойку плодів рослини призначають при хворобах шлунка і дванадцятипалої кишки, виразковому коліті, хворобах печінки, черевному тифі, геморої, інвазії гельмінтами. Також настойку застосовують при опіках і відмороженнях, травматичних ураженнях, при фурункулах, карбункулах, маститі, трофічних виразках, псоріазі – у формі зрошень, промивань, змазувань, накладання тампонів. Настойку втирають у шкіру голови проти випадання волосся. З неї роблять компреси при ячменях, ванночки при грибкових захворюваннях шкіри та екземі [1-7].

Основною складовою частиною біологічно активних речовин софори японської є рутин, який являє собою глюкорамноглікозид кверцетину, його виявлено в пуп'янках, квітках, молодих листках та плодах рослини. В останніх у період їх дозрівання міститься близько восьми флавоноїдів: окрім рутину, в них ідентифіковано кемпферол-3-софорозид, кверцетин-3-рутинозид, геністеїн-4-софорабіозид тощо [3, 5, 8].

Розробка методик аналізу плодів софори японської є актуальною науковою задачею.

Мета роботи – розробка методик ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів у плодах софори японської (*Sophora Japonica L.*), а також формування рекомендацій щодо відповідних розділів Аналітичної нормативної документації на сировину.

Методи дослідження. Об'єк дослідження – плоди софори японської (*Sophora Japonica L.*),

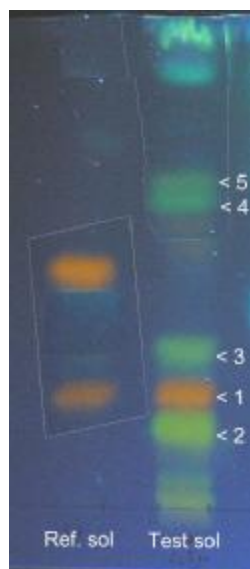
заготовлені у Криму у жовтні 2008 р. Критерії стандартизації для лікарської рослинної сировини (ЛРС) визначені у Державній Фармакопеї України (ДФУ) у загальній монографії «Лікарська рослинна сировина» [9–12]. Одними із найважливіших показників якості ЛРС є ідентифікація та кількісне визначення [9–13].

Результати й обговорення. Оскільки плоди софори при вологості більше 10% практично неможливо подрібнити і просіяти крізь сито (500), перед проведенням аналізу за такими показниками, як «Ідентифікація. Флавоноїди», «Кількісне визначення. Флавоноїди» тощо, сировину перед подрібненням додатково висушують до вмісту вологи 3–6% при температурі 70 °С. Висушену сировину подрібнюють (500) та використовують для проведення контролю якості. При розрахунках враховують загальну втрату в масі при висушуванні.

Ідентифікація (флавоноїди). За літературними даними [3, 6, 7] хімічний склад софори представлений в основному різними флавоноїдами – похідними кверцетину. На стадії підготовки зразків екстракцію сировини проводили метанолом. При хроматографії як випробуваний розчин наносили спиртовий розчин, а як розчин порівняння використовували спиртовий розчин рутину, гіперозиду. Хроматографували в системі розчинників: кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р (10:10:80). Після висушування при температурі від 100 до 105 °С пластинку обприскували розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р. Потім пластинку обприскували розчином 50 г/л

макроголу 400 Р у метанолі Р, сушили на повітрі протягом 30 хвилин. Хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм. Хроматографічний профіль випробовуваного розчину описували відносно рутину і гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину (рис. 1) мають виявлятися: жовтаво-коричнева флуоресцююча зона на рівні зони рутину на хроматограмі роз-

чину порівняння (1); нижче (2) та безпосередньо вище (3) неї – дві жовто-зелені флуоресцюючі зони та дві слабо розділені жовто-зелені флуоресцюючі зони (4, 5), розташовані вище зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння. За результатами проведених експериментів можна зробити висновок, що вибрані умови дозволяють ідентифікувати згадані зони як флавоноїди софори (рис. 1).



гіперозид: жовто-оранжева ФЗ

рутин: жовто-оранжева ФЗ

Розчин порівняння

Верхня частина пластинки

жовто-зелена ФЗ

жовто-зелена ФЗ

жовтаво-зелена ФЗ

жовто-оранжева ФЗ

жовто-зелена ФЗ

Випробовуваний розчин

Рис. 1. Хроматограми випробовуваного розчину і розчину порівняння рутину і гіперозиду (із схемою зон, що обов'язково повинні виявлятися): ФЗ – флуоресцююча зона.

Кількісне визначення (флавоноїди). Як було зазначено вище, основними флавоноїдами даного виду ЛРС є похідні кверцетину (рутин як домінуючий компонент). Тому при розробці методики кількісного визначення за основу обрано методику, описану у Європейській Фармакопеї (ЄФ) (5 вид.) [13] та деяких національних частинах монографій на ЛРС у ДФУ [14, 15], що є уніфікованою для визначення аналогічних флавонолопохідних у таких видах сировини, як трава собачої кропиви, квітки календули, листя берези тощо. Методика полягає в такому: наважку сировини піддають кислотному гідролізу в середовищі ацетону, отримані аглікони флавоноїдів екстрагують етилацетатом і далі вимірюють оптичну густину комплексу агліконів із хлористим алюмінієм у середовищі етилацетат-метанол-оцтова кислота при довжині хвилі 425 нм. У випадку, коли домінуючими компонентами флавоноїдної фракції є похідні кверцетину, максимум поглинання при 425 нм зумовлений здебільшого поглинанням комплексу кверцетину із хлористим алюмінієм.

Відповідно до згаданої методики, вміст суми флавоноїдів розраховують, використовуючи питомий показник поглинання гіперозиду, що в

умовах визначення дорівнює 500. Зважаючи на те, що в плодах софори основним компонентом серед флавоноїдів є рутин, запропоновано вміст зазначених БАР в сировині перераховувати на рутин, для чого в формулу розрахунку введено молекулярні маси гіперозиду і рутину.

При розробці методики, насамперед, вимірювали УФ-спектр випробовуваного розчину сировини і визначений максимум поглинання. У результаті було встановлено, що максимум поглинання знаходиться за довжини хвилі (425 ± 2 нм), що дозволило використовувати методику ЄФ і визначати вміст суми флавоноїдів у плодах софори в перерахунку на рутин (рис. 2).

Для перевірки повноти витягу флавоноїдів із сировини шрот після чотирикратної екстракції ацетоном додатково обробляли тим же розчинником в аналогічних умовах і далі проводили визначення суми флавоноїдів за описаною методикою. Отримані при цьому оптичні густини розчинів (фонове поглинання) мали значення близько 0,004. Таким чином, фонове поглинання в умовах методики мало статистично незначуще значення, що, у свою чергу, свідчило про повноту екстракції визначуваних БАР, а також

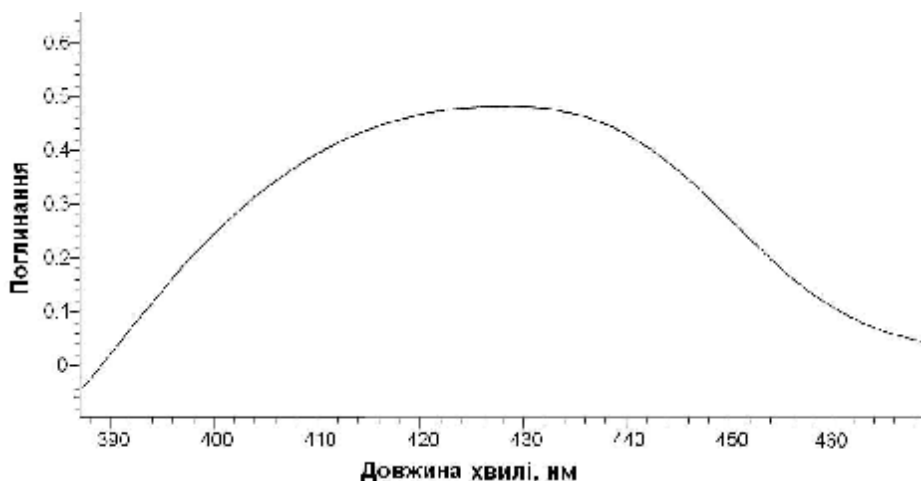


Рис. 2. Спектр поглинання випробовуваного розчину плодів софори, отриманого в умовах визначення.

про те, що методика характеризується достатньою специфічністю.

Для перевірки лінійності методики проведено експеримент. Були отримані ацетонові роз-

чини сировини в інтервалі від -50 до +250 % від номінальної концентрації, і в даних розчинах за розробленою методикою визначено вміст суми флавоноїдів (рис. 3).

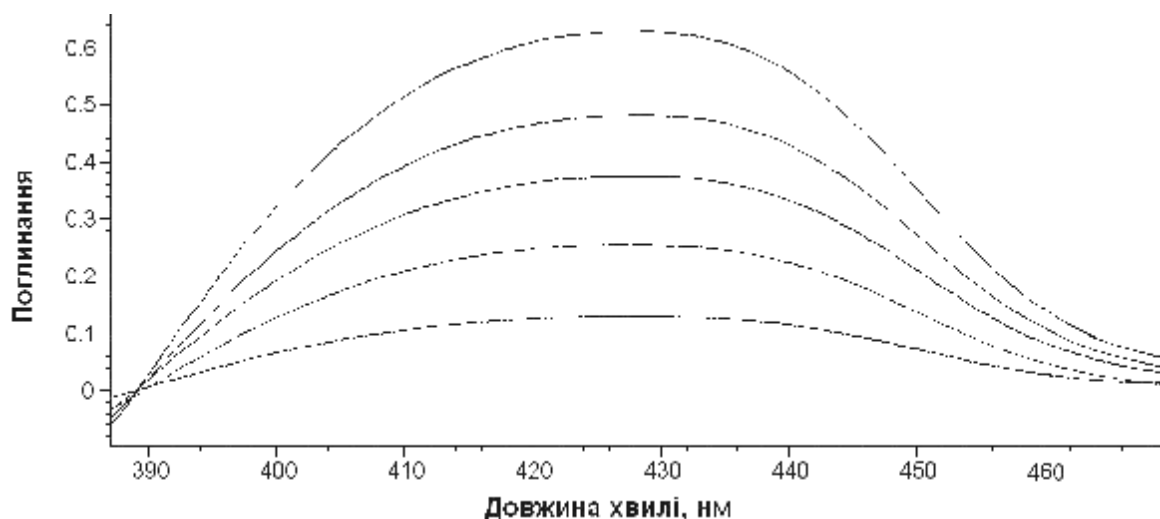


Рис. 3. Спектри поглинання випробовуваних розчинів плодів софори, отримані при визначенні лінійності методики.

Отримана залежність оптичної густини (Y) від концентрації сировини в розчині (X) наведена на рисунку 4 і виражається у вигляді рівняння: $Y = A + B \times X$, де $A = -0,00271$, $B = 0,60811$, з цілком задовільним коефіцієнтом кореляції $R = 0,99961$.

На підставі отриманих даних було встановлено, що в межах вимірюваних концентрацій (2,25 – 11,25 г суми флавоноїдів у 100 г сировини) залежність оптичної густини від концентрації має лінійний характер, тобто дана методика лінійна в діапазоні -50 до + 250 % від знайденого вмісту суми флавоноїдів.

Крім того, отримане значення коефіцієнта

$A (-0,00271)$ статистично незначуще відрізнялося від нуля, що свідчило про незначущий внесок інших компонентів сировини в кількісне визначення флавоноїдів та про достатню специфічність даної методики.

Вивчено прецизійність результатів визначення вмісту суми флавоноїдів у сировині однієї серії паралельно з 5 наважок сировини (результати наведено у таблиці 1). Вміст суми флавоноїдів в сировині в перерахунку на рутин має бути не менше 4,5 % (регламентацію подано відповідно до експериментальних даних, одержаних при аналізі трьох серій сировини ($X_{c.1} = 5,70$ %, $X_{c.2} = 4,85$ %, $X_{c.3} = 4,7$ %)).

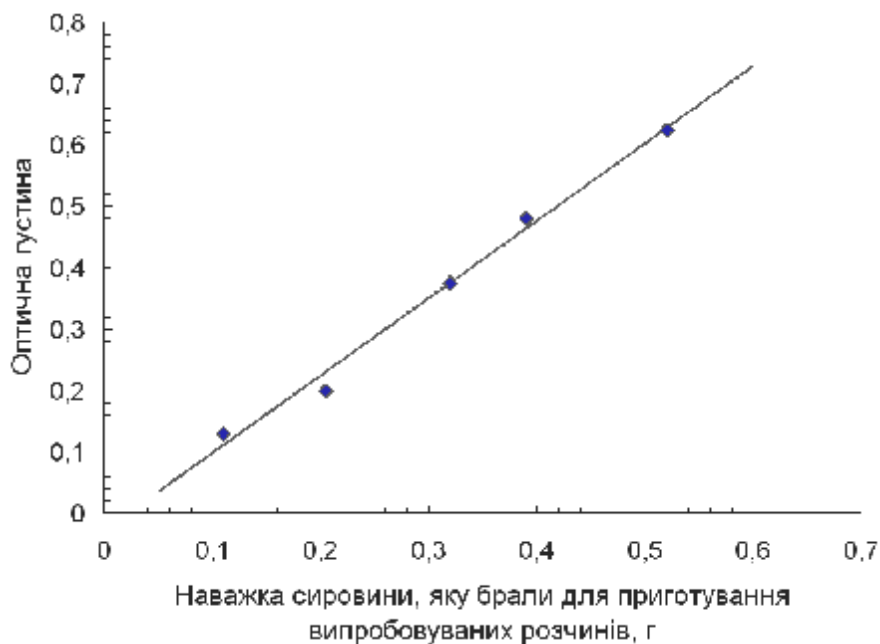


Рис. 4. Графік залежності оптичної густини від концентрації плодів софори при перевірці лінійності методики кількісного визначення суми флавоноїдів.

Таблиця 1. Результати вивчення прецизійності методики кількісного визначення суми флавоноїдів в плодах софори

X, %	f	$X_{\text{ср.}}$	S^2	S	P, %	t (P,f)	$\Delta X, \%$	ΔX	$\epsilon, \%$
5,81	4	5,73	$4,719 \times 10^{-3}$	$6,87 \times 10^{-2}$	95	2,776	$1,907 \times 10^{-1}$	$8,529 \times 10^{-2}$	1,49
5,65									
5,79									
5,73									
5,68									

Висновки. Для якісного аналізу плодів софори японської вирішено проводити ідентифікацію флавоноїдів методом тонкошарової хроматографії. Для проведення кількісного аналізу запропоновано визначати суму флавоноїдів у перерахунку на рутин. Валідаційні характери-

стики методики кількісного визначення (діапазон застосування, специфічність, лінійність і прецизійність) виявився цілком задовільними для даного виду аналізу. На основі отриманих даних можливе формування відповідних розділів АНД на сировину.

Література

1. Визначник рослин України. – К.: Урожай, 1965. – 696 с.
2. Визначник рослин УРСР. – Х.: Комуніст, 1950. – С. 560-561.
3. Ибрагимов Ф. И. Основне лекарственные средства китайской медицины / Ф. И. Ибрагимов, В. С. Ибрагимова. – М.: МЕДГИЗ, 1960. – С. 246-248.
4. Справочник по заготовкам лекарственных растений / Д. С. Ивашин, З. Ф. Катина, И. З. Рыбачук и др. – К.: Урожай, 1983. – С. 223-224.
5. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії

- рослин / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова; за ред. В. М. Ковальова. – Х.: Прапор, 2000. – 703 с.
6. Мамчур Ф. І. Довідник з фітотерапії / Ф. І. Мамчур. – К.: Здоров'я, 1986. – 280 с.
7. Муравьева Д. А. Тропические и субтропические лекарственные растения / Д. А. Муравьева. – М.: Медицина, 1983. – С. 276-277.
8. Mosyakin S. L. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist / S. L. Mosyakin, M. M. Fedoronchuk. – К.: М. G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, 1999. – P. 219-220.

9. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково експертний фармакопейний центр». 1-ше вид. – Х.: PIPEГ, 2001. – 556 с.
10. Державна Фармакопея України. Допов. 1. / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-ше вид. – Х.: PIPEГ, 2004. – 520 с.
11. Державна Фармакопея України. Допов. 2. / Державне п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-ше вид. – Х.: PIPEГ, 2008. – 620 с.
12. Державна Фармакопея України. Допов. 3. / Державне п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-ше вид. – Х.: PIPEГ, 2009. – 280 с.
13. European Pharmacopoeia. 5th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2006. – P. 2723-2724.
14. Котова Э. Э. Вопросы введения в ГФУ монографии «Зверобой» / Э. Э. Котова // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 26-33.
15. Котов А. Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України / А. Г. Котов // Фармаком. – 2009. – № 1. – С. 5-19.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ПЛОДАХ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (*SOPHORA JAPONICA L.*)

О. Ю. Галкин, А. Г. Котов¹

Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Киев
ООО «Универсальное агентство «ПРО-ФАРМА», Киев

¹ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» МЗ Украины, Харьков

Резюме: проведена разработка методик идентификации и количественного определения флавоноидов в плодах софоры японской. Для проведения качественного анализа сырья проводили идентификацию флавоноидов методом тонкослойной хроматографии. Для количественного анализа плодов софоры проводили определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Валидационные характеристики методики количественного определения (диапазон применения, специфичность, линейность и точность) оказались вполне удовлетворительными для данного вида анализа. На основе полученных данных возможно формирование соответствующих разделов АНД на сырье.

Ключевые слова: плоды софоры японской, идентификация, количественное определение, флавоноиды, стандартизация.

DEVELOPMENT OF METHODS OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FLAVONOIDS IN FETUS OF SOPHORA JAPANESE (*SOPHORA JAPONICA L.*)

O. Yu. Halkin, A. H. Kotov¹

National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv
Universal agency «PRO-PHARMA» Ltd., Kyiv

¹SE «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Drugs Quality», Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv

Summary: a development of methods for identification and quantitative analysis of flavonoids in sophora fruits was made. For the qualitative analysis the identification of flavonoids by thin layer chromatography was conducted. For quantitative analysis of sophora fruits determination of the amount of flavonoids in terms of routine was performed. Validation characteristics (range, specificity, linearity and accuracy) of method of the quantitative analysis were quite satisfactory for this type of analysis. It is possible to form relevant sections of Analytical documentation based on the findings.

Key words: sophora fruits, identification, assay, flavonoids, standardization.