

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. В.В. Петренко

УДК 547.972.3:543.42

ПОРІВНЯННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ

© М.Б. Чубка, Л.В. Вронська, Л.Т. Котляренко

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

Резюме: проведено порівняльне дослідження можливостей спектрофотометричних методик кількісного визначення суми флавоноїдів. Показано, що для аналізу спиртових лікарських форм флавоноїдів доцільно застосовувати методику без попереднього гідролізу, тоді як при аналізі ЛРС – методику з попереднім гідролізом флавоноїдів.

Ключові слова: флавоноїди, спектрофотометричне визначення, кількісний аналіз, порівняльна характеристика.

Вступ. Відсутність у Державній фармакопеї України монографій на ряд рослин, які застосовуються для виготовлення лікарських засобів, вимагає від виробників лікарських засобів рослинного походження створення власної АНД на сировину і готові лікарські засоби. Вибір показників доброякісності дуже часто зупиняється на ідентифікації і кількісному визначенні флавоноїдів [1-5], оскільки ця група сполук широко представлена в хімічному складі рослин, а також має різнопланову біологічну активність.

Серед методик, які найчастіше зустрічаються для кількісного визначення суми флавоноїдів, можна виділити три групи. Першу групу методик становлять прямі спектрофотометричні методики з розрахунком через питомі показники поглинання після попереднього розділення чи хроматографічного виділення флавоноїдів з сировини, екстракту чи готового лікарського засобу [6-8]. Ці методики є працездатними, довготривалими, вони є дуже актуальними для фітохімічних досліджень нової лікарської сировини, оскільки дозволяють визначати окремі підкласи сполук і часто встановити власне видову приналежність тієї чи іншої рослинної сировини, звичайно, після попереднього хроматографічного розділення класів БАР. Такі методики практично не мають значення при створенні АНД на сировину чи готові лікарські засоби.

Друга група методик – це методики із застосуванням диференціальної спектрофотометрії [2-4, 6, 9], які одразу мають суттєву перевагу порівняно з першими – експресність, малу працездатність і мінімум стадій пробопідготовки, що є дуже важливим при виконанні серійних аналізів у відділах контролю якості виробників чи лабораторіях контролю якості Державних інспекцій, як з позицій часу, витраченого на аналіз, так і з позицій точності аналізу. Такі методики донедавна постійно застосовувались при

розробці АНД чи МКЯ на ЛРС і ГЛЗ рослинного походження.

Третя група методик базується також на використанні диференційної спектрофотометрії, проте попередньо проводиться гідроліз усіх форм флавоноїдів до агліконів, а потім, для отримання забарвленого продукту, використовують реакцію комплексоутворення алюмінію хлориду з виділеними (відокремленими шляхом екстракції етилацетатом) агліконами. Ця методика застосовується для контролю якості ЛРС відповідно до вимог діючої ДФУ [11].

Мета роботи – дослідження можливостей спектрофотометричних методик кількісного визначення суми флавоноїдів та вивчення умов їх застосування.

Методи дослідження. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Carry – 50 М. Розчин стандартних речовин рутину (Sigma, каталожний номер 125143), кверцетину (Fluka, каталожний номер 83370) готували на 70 і 95 % етиловому спирті відповідно.

3 % розчин алюмінію хлориду готували так: 3 г алюмінію хлориду $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ поміщали в мірну колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл 70 % спирту етилового, розчиняли і доводили об'єм розчину цим же розчинником до позначки, перемішували.

Інші використовувані розчини реактивів готували відповідно до вимог ДФУ [10, 11].

Для відпрацювання і оптимізації методик використовували дві групи об'єктів:

1) настойки глоду і нагідок виробництва одного вітчизняного підприємства – об'єкти, які практично стандартизуються за вмістом флавоноїдів;

2) фіточай "Сили природи" вітчизняного виробника, який містив ЛРС: насіння розторопші, траву парила, квіти цмину, квіти ромашки, квіти нагідок, листя м'яти, плоди горобини, траву кропиви собачої, листя смородини – об'єкт, який

містить комплекс лікарських рослин з різним набором сполук – представників класу флавоноїдів.

Спиртові витяги з сировини фіточаю отримували за наступною методикою: 2 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали у конічну колбу місткістю 100 мл з притертим шліфом, додавали 40 мл спирту необхідної концентрації (30, 40, 50, 60, 70, 80, 95 %) і нагрівали зі зворотним холодильником протягом 30 хв на киплячому водяному огрівнику. Після охолодження спиртового вилучення його фільтрували в мірну колбу місткістю 50 мл, промивали колбу спиртом, за допомогою якого отримували вилучення, долучаючи отримані розчини до фільтрату. Отриманий фільтрат спиртового витягу аналізували за двома методиками.

Методика кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів з використанням диференційної спектрофотометрії (1 методика).

Аліквотну частину досліджуваного спиртового витягу або його розчину чи настойки, достатню для отримання в кінцевому розчині оптичної густини в межах 0,400 - 0,600, поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 3,00 мл 3 % розчину алюмінію хлориду і доводять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим до позначки, перемішують і залишають стояти 45 хв. Знімають спектри поглинання в діапазоні 350 – 500 нм і вимірюють оптичну густину отриманих розчинів в максимумі поглинання, використовуючи як розчин порівняння розчин, підготовлений аналогічно досліджуваному, крім додавання розчину алюмінію хлориду.

Для розрахунку кількісного вмісту використовували метод стандарту, використовуючи значення оптичної густини стандартного розчину рутину.

Методика кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів після попереднього гідролізу з використанням диференційної спектрофотометрії (2 методика).

Вихідний розчин. Аліквотну частину досліджуваного спиртового витягу чи настойки поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 1 мл розчину 5 г/л гексаметилентетраміну Р, 25 мл ацетону Р і 7 мл кислоти хлористоводневої Р1. Одержану суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і переносять у мірну колбу місткістю 100 мл.

25 мл отриманого розчину поміщають у ділильну ліжку місткістю 250 мл, додають 20 мл води Р і струшують з однією порцією 20 мл, потім з двома порціями, по 15 мл кожна, етилацетату Р протягом 15 хв щоразу. Етилацетатні витяги збирають разом в іншу ділильну ліжку місткістю 250 мл. Одержане етилацетатне вилучення промивають двома порціями, по 50 мл кожна, води Р, відкидаючи кожного разу водну фазу. Органічний шар фільтрують через паперовий

фільтр з 10 г натрій сульфату безводного Р, попередньо змоченого етилацетатом Р, у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм фільтрату етилацетатом Р до позначки і перемішують.

Випробуваний розчин. 10 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 1 мл реактиву алюмінію хлориду Р і доводять розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р до позначки та перемішують.

Компенсаційний розчин. 10 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р до позначки та перемішують.

Оптичну густину випробуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 425 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм відносно компенсаційного розчину.

Для розрахунку кількісного вмісту суми флавоноїдів використовують питомий показник поглинання, характерний для гіперозиду в даних умовах кількісного визначення ($E=500$) [11].

Результати й обговорення. При комплексуванні алюмінію хлориду з флавоноїдами у спиртовому середовищі (1 методика) спостерігається утворення забарвленої сполуки, яка в диференційному спектрі має максимум поглинання, довжина хвилі якого залежить від: концентрації спирту у вимірюваному розчині, природи сполуки, а саме глікозидна чи агліконна форма комплексує йон алюмінію, наявності/відсутності ацетатної кислоти, (рис. 1, 2).

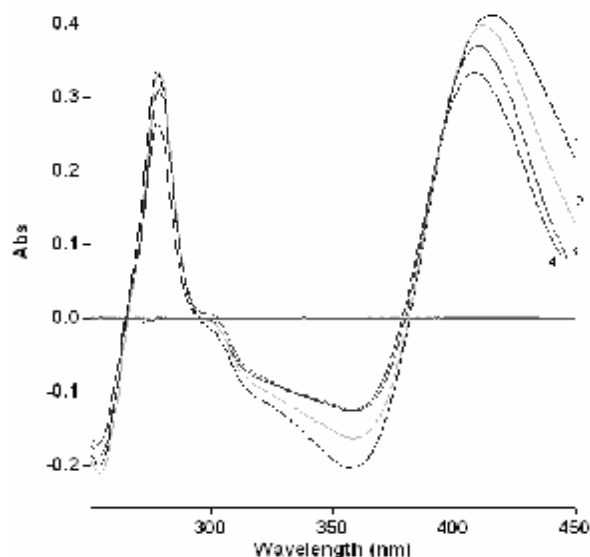


Рис. 1. Диференційні електронні спектри поглинання розчинів рутину (16,97 мкг/мл) з алюмінію хлоридом у середовищі: 1 – 70 % етанолу ($\lambda_{\text{макс.}} = 415 \text{ нм}$); 2 – 95 % етанолу ($\lambda_{\text{макс.}} = 411 \text{ нм}$); 3 – 95 % етанолу в присутності ацетатної кислоти ($\lambda_{\text{макс.}} = 410 \text{ нм}$); 4 – 70 % етанолу в присутності ацетатної кислоти ($\lambda_{\text{макс.}} = 408 \text{ нм}$).

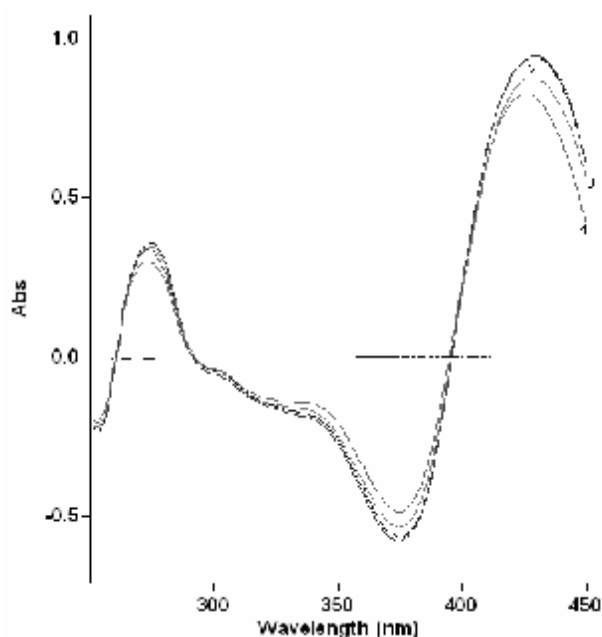


Рис. 2. Диференційні електронні спектри поглинання розчинів кверцетину (12,76 мкг/мл) з алюміній хлоридом у середовищі: 1 – 95 % етанолу ($\lambda_{\text{макс.}} = 429 \text{ нм}$); 2 – 95 % етанолу в присутності ацетатної кислоти ($\lambda_{\text{макс.}} = 429 \text{ нм}$); 3 – 70 % етанолу ($\lambda_{\text{макс.}} = 429 \text{ нм}$); 4 – 70 % етанолу в присутності ацетатної кислоти ($\lambda_{\text{макс.}} = 425 \text{ нм}$).

Отримані дані (рис. 1, 2) вказують, що рутин і кверцетин (аглікон рутину) з алюміній хлоридом утворюють комплекси з різними довжинами хвиль максимумів поглинання: 429 і 411 нм відповідно у середовищі 95 % спирту. Оскільки у ЛРС та лікарських засобах з неї флавоноїди перебувають як у формі глікозидів, так і агліконів, то виникає проблема вибору як довжини хвилі вимірювання оптичної густини, так і вибору стандартної речовини для кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів, оскільки загальноприйнято проводити вимірювання оптичної густини випробуваного розчину і розчину стандарту при одній довжині хвилі.

Застосування 2 методики для аналізу ЛРС, з цього погляду, є більш виправданим, оскільки у випробуваному розчині уже міститимуться лише агліконні форми – це дозволить стандартизувати умови вимірювання оптичної густини та вибір стандартної речовини як маркера для перерахунку кількісного вмісту суми флавоноїдів.

Аналізуючи вплив концентрації спирту у кінцевому вимірюваному розчині, можна зробити висновки: зниження концентрації спирту з 95 до 70 % не впливає на положення максимуму поглинання комплексу алюмінію з кверцетином, проте впливає на положення максимуму погли-

нання комплексу з рутином – спостерігається незначне багатохромне зміщення – 4 нм. В обох випадках спостерігається коливання значень оптичних густин: для кверцетину при зменшенні концентрації спирту – зменшується більше, ніж на 6 %, для рутину незначно зростає. Очевидно, що при застосуванні методики 1 необхідно контролювати вміст спирту у кінцевому вимірюваному розчині, а саме він повинен бути однаковим як у досліджуваному розчині, так і стандартному розчині. Оскільки об'єми і концентрації спирту в аліквотах розчинів стандарту та досліджуваного розчинів, взятих для аналізу, як правило, на практиці різні, то в кінцевому випадку маємо відмінні концентрації спирту у вимірюваних стандартному та досліджуваному розчинах, а це, в свою чергу, позначається на правильності визначеного кількісного вмісту суми флавоноїдів.

В окремих випадках при визначенні суми флавоноїдів за методикою 1 практикують додавання ацетатної льодяної кислоти в об'ємі 0,5 мл на 25 мл вимірюваного розчину. Як впливає з рисунків 1, 2, наявність ацетатної кислоти у середовищі 95 % спирту не змінює довжини хвилі максимуму поглинання комплексів кверцетину і рутину з алюміній хлоридом, проте у випадку рутину суттєво (більш ніж на 6 %) зменшується оптична густина. Натомість наявність ацетатної кислоти у середовищі 70 % спирту приводить до гіпсохромного зміщення довжини хвилі максимуму поглинання комплексів з алюміній хлоридом для кверцетину (з 429 до 425 нм) і для рутину (з 415 до 408 нм), разом з цим для обох сполук зменшується оптична густина – більш ніж на 6 і 15 % відповідно. Оскільки самі настойки, які піддаються аналізу, та часто і вилучення з твердих лікарських форм готуються на спиртах з вмістом значно нижчим 95 %, то при кількісному визначенні флавоноїдів у ГЛЗ на основі ЛРС застосовують у більшості випадків 70 % спирт як середовище визначуваного розчину. Виходячи з цього слід, очевидно, виключити додавання льодяної ацетатної кислоти при визначенні суми флавоноїдів на 70 % спирті в зв'язку із значною втратою чутливості спектрофотометричної реакції при її наявності.

У таблиці 1 наведені результати визначення суми флавоноїдів у настоянках глоду та нагідок при використанні 95 % і 70 % спирту, в присутності та без льодяної ацетатної кислоти. Розрахунок кількісного вмісту проведено з використанням значень оптичної густини стандартних розчинів рутину в умовах повністю аналогічних до умов випробуваних розчинів.

Як впливає з результатів аналізу, якщо для розрахунку кількісного вмісту використовувати

Таблиця 1. Результати спектрофотометричного визначення суми флавоноїдів у настояйках

Умови середовища вимірюваного розчину	Вміст суми флавоноїдів, в перерахунку на рутин, %	
	Настойка глоду	Настойка календули
95 % спирт	0,010	0,071
95 % спирт + льодяна ацетатна кислота	0,011	0,072
70 % спирт	0,010	0,071
70 % спирт + льодяна ацетатна кислота	0,011	0,072

метод одного стандарту, а пробопідготовку випробуваного і стандартного розчинів, виконувати строго однаково, то на кількісному вмісті флавоноїдів не позначаються окремі умови проведення реакції. Проте зазначимо, що слід виключити при використанні цієї методики застосування методу питомого коефіцієнта світлопоглинання, оскільки його абсолютне значення, як було показано при дослідженні стандартних розчинів флавоноїдів, залежить від умов, що створюються при отриманні забарвленого продукту.

На рисунку 3 наведені диференційні спектри поглинання деяких флавоноїдів при використанні методики з попереднім гідролізом (методика 2).

Закономірно, що після гідролізу глікозидних форм флавоноїдів, вилучених з ЛРС, їхні аглікони, виділені шляхом екстракції етилацетатом, матимуть у спектрах поглинання максимуми практично у дуже вузькому діапазоні варіації довжин хвиль, що дозволяє уніфікувати методики для стандартизації і закласти перерахунок на один вибраний стандарт, як це зроблено в ДФУ. Поряд з такою очевидною перевагою цієї методики (методика 2) закономірною є також і виникаюча одразу проблема, а саме – для аналізу необхідно брати або дуже великі наважки настоек чи інших ГЛЗ, у яких вміст флавоноїдів незначний, або вимушено виміряти, неможливі, з точки зору, спектрофотометричних вимірювань, малі значення оптичних густин. В результаті, зокрема останнього, спостерігається сутте-

ва різниця по розрахунку вмісту флавоноїдів з використанням методик 1 і методик 2. Результати аналізу спиртових витягів із фіточаю “Сили природи” наведені у таблиці 2.

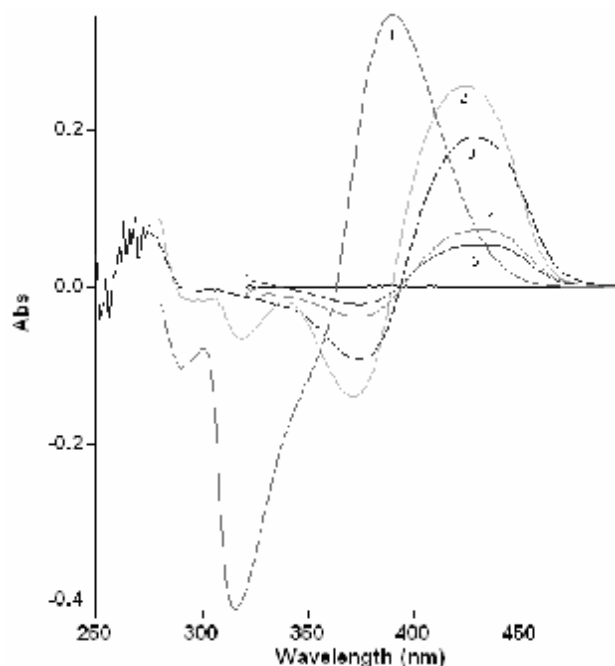


Рис. 3. Диференційні електронні спектри поглинання розчинів з алюміній хлоридом (в умовах спектрофотометричного визначення за методикою 2): 1 – апігенін ($\lambda_{\text{макс.}} = 390$ нм); 2 – кемпферол ($\lambda_{\text{макс.}} = 423$ нм); 3 – кверцетин ($\lambda_{\text{макс.}} = 427,9$ нм); 4 – рутин ($\lambda_{\text{макс.}} = 431$ нм); 5 – гіперозиду ($\lambda_{\text{макс.}} = 429,9$ нм).

Таблиця 2. Вміст суми флавоноїдів у спиртових витягах з фіточаю “Сили природи”

Вміст спирту в екстрагенті, який використовували для отримання витягу, %	Вміст суми флавоноїдів, %	
	За методикою 1, в перерахунку на рутин	За методикою 2, в перерахунку на гіперозид
30	0,031	0,0074
40	0,032	0,0080
50	0,032	0,0120
60	0,034	0,0135
70	0,042	0,0138
80	0,039	0,0139
90	0,041	0,0142

Для визначення за методикою 1 відбиралась аліквота 2,0 мл, а для гідролізу і наступної пробопідготовки по методиці 2 відбиралась алік-

вота 20,0 мл спиртового витягу. Однак навіть у 10 разів більша аліквота не дозволила отримати оптичну густину вимірюваного кінцевого роз-

чину більшу, ніж 0,25. Розрахунок вмісту за першою методикою розраховувався за методом одного стандарту з використанням стандартного розчину рутину, а за другою методикою – з використанням питомого показника поглинання гіперозиду, наведеного у ДФУ-методиці. На нашу думку, внаслідок малих кількостей флавоноїдів в отриманих спиртових витягах методика 2 не дозволяє їх повно вилучати і визначати, в зв'язку з чим їх вміст, визначений за другою методикою, є значно меншим. Цю різницю неможливо списати на різницю молярних мас рутину і гіперозиду, оскільки вони незначно відрізняються, через що їхні питомі показники також не мали б дуже відрізнятися і ця різниця не може значно впливати, у кінцевому випадку, на результат аналізу.

Висновки. 1. Проведені нами дослідження вказують на необхідність застосування методики 1 для аналізу ГЛЗ, які є спиртовими витягами або екстрактами з ЛРС чи іншими лікарськи-

ми формами з невеликим вмістом флавоноїдів. Використання диференційного прийому вимірювання дозволяє забезпечити необхідну селективність визначення флавоноїдів при наявності інших класів БАР.

2. При визначенні вмісту суми флавоноїдів за методикою 1 можна застосовувати середовище 70 і 95 % спирту, в присутності і без льодяної ацетатної кислоти, але розрахунки вмісту при цьому виконувати тільки з використанням стандартних розчинів флавоноїдів, виготовлених у строго однакових з випробуванням розчином умовах.

3. Методика 2 може використовуватись для аналізу ЛРС, зборів, фіточаїв, оскільки, по-перше, вміст флавоноїдів буде суттєвим і, по-друге, максимум поглинання у диференційному спектрі відповідатиме більш вузькому діапазону хвиль через комплексоутворення з хлоридом алюмінію лише агліконних форм флавоноїдів, що полегшуватиме вибір критеріїв стандартизації таких об'єктів.

Література

1. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / Под ред. В.Л. Багировой, В.А. Северцева. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2001. – 223 с.
2. Кабишев К. Э. Количественное определение суммы флавоноидных соединений в интраназальных лекарственных формах препарата «Оксифил» с полиэкстрактом из надземной части *Oxytropis oxurphylla* (Pall.) DC. / К. Э. Кабишев, Е. Н. Саканян // Растительные ресурсы. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 120-127.
3. Смирнова Л. П. Количественное определение суммы флавоноидов в желчегонном сборе / Л. П. Смирнова, Л. Н. Первых // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33, № 3. – С. 37-39.
4. Григорчук О. Ю. Ідентифікація та кількісне визначення діючих речовин шишок хмелю / О. Ю. Григорчук, О. І. Тихонов, Л. В. Вронська // Вісник фармації. – 2002. – № 1. – С. 17-20.
5. Редченкова В. Н. Анализ требований некоторых Фармакопей, предъявляемых к экстрактам / В. Н. Редченкова, О. М. Хишова // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 37-40.
6. Кемертелидзе Э. П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения / Э. П. Кемертелидзе,

В. П. Георгиевский. – Тбилиси: изд-во «Мецниереба», 1976. – С. 116 – 127.

7. Оценка содержания суммы флавоноидов в настойке / Е. К. Слеува, Е. Н. Жукович, Л. А. Шарикова [и др.] // Фармация. – 2003. – № 1. – С. 13 – 15.

8. Клыков А. Г. Сезонная динамика содержания рутинна и репродуктивность надземной фитомассы у трех видов *Fagopyrum Mill.*, выращиваемых в приморском крае / А. Г. Клыков, Л. М. Моисеенко, П. Г. Горовой // Раст. ресурсы. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 77 – 82.

9. Котова Э. Э. Стандартизация плодов боярышника и лекарственных препаратов на их основе по показателю «Количественное определение» / Э. Э. Котова, А. Г. Котов, Н. П. Хованская // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 35-41.

10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

11. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗНЫХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ

М.Б. Чубка, Л.В. Вронска, Л.Т. Котляренко

Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского

Резюме: проведено сравнительное исследование возможностей спектрофотометрических методик количественного определения суммы флавоноидов. Показано, что для анализа спиртовых лекарственных форм флавоноидов целесообразно использовать методику без предварительного гидролиза, тогда как при анализе ЛРС – методику с предварительным гидролизом флавоноидов.

Ключевые слова: флавоноиды, спектрофотометрическое определение, количественный анализ, сравнительная характеристика.

COMPARISON OF DIFFERENT SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUES POSSIBILITIES USE FOR FLAVONOIDS DEFINITION

M.B. Chubka, L.V. Vronska, L.T. Kotlyarenko

Ternopil State Medical University by I.Ya. Horbachevsky

Summary: comparative research of spectrophotometric techniques possibilities for the sum of flavonoids quantitative definition is carried out. It is shown, that for the alcoholic medicinal forms of flavonoids analysis it is expedient to use a technique without preliminary hydrolysis, whereas at analysis medicinal herbal substances (MHS) - a technique with preliminary hydrolysis of flavonoids.

Key words: flavonoids, spectrophotometric definition, the quantitative analysis, the comparative characteristic.