



УДК: 615:322:547.56:577.114

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *VIOLA ODORATA* L.

Р.А. Бубенчиков

Курский государственный медицинский университет, 305041, г. Курск, ул. К.Маркса, 3
e-mail: fg.ksmu@mail.ru

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье фиалки душистой (*Viola odorata* L), основанная на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом. Оптимальными условиями для извлечения флавоноидов является степень измельчения 1-2 мм, экстракция 70% спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент (1:100) в течение 45 минут. Содержание суммы флавоноидов в надземной части фиалки душистой колебалось от 1,15 до 3,21%.

Ключевые слова: фиалка душистая (*Viola odorata* L), трава, флавоноиды, спектрофотометрия.

Введение

Фиалка душистая – многолетнее травянистое растение семейства фиалковых (Violaceae), широко распространенное на Европейской части России, Кавказе [7].

Надземная часть фиалки душистой входила в Фармакопеи Нидерландов, Германии, Польши, Турции [5], цветки – в I издание отечественной Фармакопеи, входят в Фармакопеи ряда стран: Аргентины, Бразилии, Франции, Португалии и др. [7].

Изучение химического состава фиалки душистой показало присутствие в них флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, кумаринов, полисахаридов и др. соединений [3, 7].

Фармакологические исследования показали, что одной из групп действующих веществ наряду с полисахаридами являются фенольные соединения, и в частности, флавоноиды. Флавоноиды фиалки душистой представлены гесперидином, витексином, виценином и рутином [3].

Поэтому нами была проведена оценка сырья фиалки душистой по содержанию флавоноидных соединений.

Цель работы заключалась в разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в надземной части фиалки душистой.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служила воздушно-сухая надземная часть фиалки душистой, заготовленная в 2009 г. в Курской области (окр. Г. Курска, ур. Знаменская роща) в период массового цветения растений.

В основу количественного определения положен спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом [1, 6]. В качестве стандартного образца был взят РСО рутин, т.к. он является преобладающим флавоноидным соединением фиалки душистой. Максимумы поглощения комплексов рутина стандарта с алюминия хлоридом и извлечений из травы фиалки душистой 70% спиртом этиловым с алюминия хлоридом совпадают и находятся в области 410 нм.

Нами использован дифференциальный вариант спектрофотометрии, т.е. в качестве раствора сравнения использовали исходный раствор извлечения без алюминия хлорида, что позволяет исключить влияние на результаты анализа сопутствующих растительных веществ, имеющих оптическую плотность в области максимума поглощения извлечений из сырья [2, 6].



При проведении анализа пробы подкисляли уксусной кислотой для перевода флавоноидов и сопутствующих им веществ в недиссоциированную форму с целью улучшения воспроизводимости результатов [2, 6].

Первым этапом наших исследований было изучение влияния степени измельченности на экстракцию флавоноидов. При этом установили, что максимальное извлечение флавоноидов достигается при степени измельчения сырья 1-2 мм (табл. 1).

В качестве экстрагентов использовали этиловый спирт различной концентрации. Наиболее полное извлечение флавоноидов достигалось при экстрагировании 70% этиловым спиртом (табл. 1).

Для обеспечения полноты извлечения суммы флавоноидов навеску сырья нагревали на кипящей водяной бане до наступления равновесия, которое в данном случае наступает через 45 минут [6].

Таблица 1

Влияние условий экстракции на содержание суммы флавоноидов

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов, %
Степень измельченности сырья, мм:	
0,5	2,63
1,0	2,79
2,0	2,83
3,0	2,21
Экстрагент: этиловый спирт, %	
30	2,54
50	2,71
70	3,20
96	2,10
Время экстракции, мин (70% спирт этиловый, соотношение сырье-экстрагент 1:100):	
30	2,60
45	3,20
60	3,21

Методика определения. Аналитическую пробу сырья, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито (ТУ 23.2,2068-89) с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1.0 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта и взвешивают с погрешностью +0,01 г. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

2 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% этиловом спирте и через 10 мин 1 мл 3% раствора кислоты уксусной. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 30 минут.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл извлечения, 1 мл 3% раствора кислоты уксусной и доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца рутин (PCO), приготовленного аналогично испытываемому раствору.

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



$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 100 \cdot (100 - W)} ;$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца (PCO) рутина;

m – масса сырья в граммах;

m₀ – масса PCO рутин в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Статистическая обработка проведена по общепринятой методике [4]. Результаты показали, что ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 3,63% (табл. 2).

Таблица 2

Метрологическая характеристика метода

№ п/п	X	n	X	S ²	S _x	P, %	t(P)	ΔX	E _{отн}
1	2,02	5	2,01	0,00025	0,007	95	2,78	0,044	2,21%
	2,00								
	2,03								
	1,99								
	2,01								
2	2,76	5	2,74	0,00100	0,014	95	2,78	0,089	3,25%
	2,70								
	2,78								
	2,72								
	2,74								
3	1,82	5	1,84	0,00060	0,011	95	2,78	0,067	3,63%
	1,82								
	1,84								
	1,88								
	1,84								
4	2,29	5	2,32	0,00060	0,011	95	2,78	0,067	2,88%
	2,35								
	2,33								
	2,30								
	2,33								
5	2,40	5	2,41	0,00050	0,010	95	2,78	0,061	2,54%
	2,38								
	2,41								
	2,44								
	2,42								

Таблица 3

Опыты с добавками

Содержание суммы флавоноидов в 1 г сырья, мг	Добавлено рутин, мг	Вычислено с добавкой, мг	Найдено, мг	Относительная ошибка, %
15,3	-	15,3	15,30	-
15,3	3,2	18,5	18,34	- 0,87
15,3	7,2	22,5	22,26	- 1,07
15,3	14,4	29,7	30,06	+ 1,21

Проведение опытов с добавками известного количества PCO рутин в извлечение из сырья фиалки душистой показало отсутствие систематической ошибки метода (см. табл. 3).

Предложенной методикой проанализировано 5 партий сырья фиалки душистой. Согласно полученным данным (см. табл. 2), содержание суммы флавоноидов находится в пределах от 1,15 до 3,21%.



Таким образом, по разработанной методике можно оценивать качество сырья фиалки душистой по содержанию флавоноидов.

Выводы

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье фиалки душистой (*Viola odorata* L), основанная на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом. Оптимальными условиями для извлечения флавоноидов является степень измельчения 1-2 мм, экстракция 70% спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент (1:100) в течение 45 минут. Содержание суммы флавоноидов в надземной части фиалки душистой колебалось от 1,15 до 3,21%

Список литературы

1. Беликов В.В., Шрайбер М.С. Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. 1970. №. 1. С. 68-72.
2. Беликов В.В., Точкова Т.В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов // Фенольные соединения и их физиологические свойства. - Алма-Ата, 1973. С. 168-172.
3. Бубенчиков Р.А. Фитохимическое и фармакологическое изучение растений рода Фиалка: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. Купавна, 2002. 24 с.
4. Государственная фармакопея СССР. – 11- изд. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1. –277 с.
5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Раеопiaceae – Thymelaeaceae. Л., 1985.
6. Точкова Т.В., Бубенчикова В.Н. Спектрофотометрический метод количественного определения суммы флавоноидов в цветках липы // Ресурсоведческое и фитохимическое изучение лекарственной флоры СССР. Науч. тр. Т. XXIX. М., 1991. С. 150-155.
7. Флора СССР: В 30-ти т. М., Л: Изд-во АН СССР, 1934-1964. Т. VI, 1941.

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF FLAVONOID CONTENT IN *VIOLA ODORATA*.

R.A. Bubenichov

Kursk State Medical University,
Kursk K. Marks St., 3, 305041

e-mail: fg.ksmu@mail.ru

The technique of quantitative determination of the flavonoid sum in *Viola odorata* L. with the use of differential spectrophotometry is elaborated on the bases of the reaction of complex formation the aluminium chloride solution. The content of flavonoid in plant *Viola odorata* L. in counting again on state standart sample of rutin is in the range of 1,15-3,21%.

Key words: *Viola odorata* L., herb, flavonoid, spectrophotometric