

УДК 543.422.3:615.322.073

Колдаев В.М., Зорикова О.Г., научные работники
Горно-Тажная станция им В.Л. Комарова ДВО РАН, Россия

ОЦЕНКА СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ШЛЕМНИКЕ БАЙКАЛЬСКОМ

Ключевые слова: флавоноиды, байкалин, шлемник байкальский, спектрофотометрия

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi, сем. Губоцветных – Labiatae Juss.) – многолетнее травянистое растение, традиционное для восточной медицины. Препараты корней шлемника проявляют гипотензивные, седативные и противосудорожные свойства, характерную Р-витаминную активность, сосудукрепляющее и антиоксидантное действие. Показаниями к применению настойки шлемника служат гипертоническая болезнь, функциональные расстройства нервной системы, сердечнососудистые неврозы, миокардиты, острый суставной ревматизм, воспаление легких, коклюш и различные кровотечения [3]. Широта фармакологических эффектов корней шлемника обусловлена богатым набором биологически активных соединений, включающим кумарины, дубильные вещества, эфирные масла, флавоноиды и многие др. Особенно выделяется группа фенольных соединений, представленных флавонами, флаванонами, флаванолами, халконами и лигнофлавоноидами. Ведущее место среди фенолов шлемника байкальского занимают флавоны, из которых доминирует байкалин [5]. Содержание биологически активных веществ в корнях шлемника зависит от условий произрастания и возраста растения. Для контроля и стандартизации препаратов шлемника требуются простые и достаточно чувствительные методы экспресс-анализа. Флавоноиды шлемника определяют трудоемкими методами аналитической химии. При этом известно, что некоторые кислоты Льюиса, в частности хлорид алюминия, легко образуют с флавоноидами хелатные комплексы. Максимумы комплексов в спектрах поглощения сдвигаются в длинноволновую область – батохромный эффект [6]. Высота батохромного максимума зависит от концентрации флавоноидов, что дает возможность количественного их определения. Поэтому можно воспользоваться спектрофотометрическим методом, позволяющим к тому же исследовать растворы без предварительной подготовки. Разработка спектрофотометрической методики на основе батохромного эффекта для определения суммарного содержания флавоноидов в препаратах шлемника байкальского явилась целью нашей работы.

В опытах использовали настойки корней шлемника байкальского, произрастающего в Приморском крае, растворы сухих экстрактов из его корней, которые готовили по стандартным технологиям [4], а также растворы очищенного байкалина (фирма Vendor World-Way Inc., Южная Корея) и хлорида алюминия в 95%-м этаноле. Спектры поглощения исследуемых веществ регистрировали до и через каждые 5 мин в течение 30 мин после добавления к ним хлорида алюминия на цифровом спектрофотометре UV-2051PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне от 230 до 390 нм. Спектры статистически обрабатывали по предложенной нами ранее методике [1].

Результаты спектрофотометрии показали, что спектры поглощения настойки корней шлемника байкальского и растворов байкалина по характеру довольно близки ($p > 0,05$), включают три максимума в ультрафиолетовой области на волнах 246, 278 и 317 нм (рис. 1, кривые 1 и 2). Первые максимумы спектра байкалина мало выражены, и, по-видимому, связаны с поглощением света внутренним (экранированным) бензольным циклом молекулы байкалина. Вторые максимумы наиболее высокие, скорее всего, обусловлены поглощением «агликоновым» ее фрагментом. Третий максимум имеет среднюю высоту и, вероятно, соответствует поглощению внешней хромофорной группой байкалина. Настойка имеет примерно такие же характерные спектральные черты, как и байкалин, за

исключением того, что третий максимум менее выражен, что связано с маскирующим действием хромофоров других соединений, входящих в состав настойки.

После добавления хлорида алюминия спектрофотометрические максимумы смещаются в длинноволновую область (рис. 1, кривые 3 и 4). Максимальный сдвиг достигается на 20-й мин, поэтому в дальнейшем батохромные эффекты регистрировали спустя именно это время после добавления хлорида алюминия. Исследования в широком диапазоне концентраций байкалина и хлорида алюминия показали, что величина батохромного сдвига максимумов от концентрации не зависит (табл. 1). В дальнейшем для исследований батохромных сдвигов брали 2%-й раствор хлорида алюминия. Средний сдвиг для первого максимума $2\pm 0,27$ и для второго $13\pm 0,36$ нм. Наибольший сдвиг $17\pm 0,18$ нм (рис. 1, *d*) наблюдается для третьего максимума при длине волны 334 нм, которая выбрана в качестве аналитической.

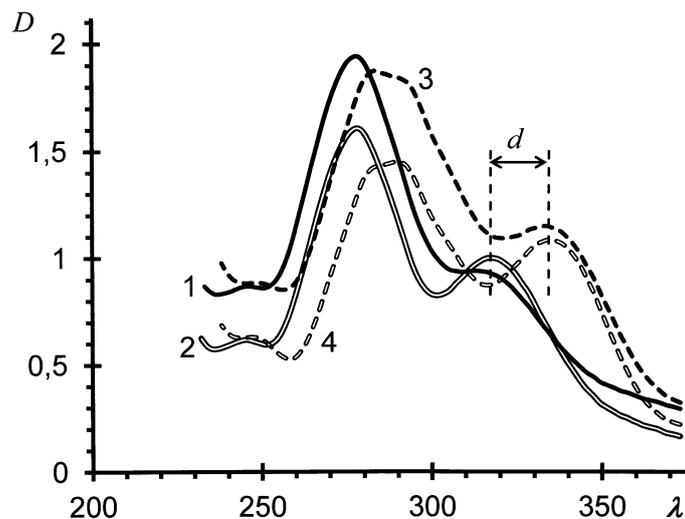


Рис. 1. Спектры поглощения настойки корней шлемника байкальского (1), раствора байкалина (2) до и соответственно (3, 4) через 20 мин после добавления к ним хлорида алюминия, *d* – батохромный сдвиг максимумов. По горизонтали – длина волны в нм; по вертикали – оптическая плотность в усл. ед.

Таблица 1

Батохромный сдвиг максимумов в спектре поглощения байкалина на 20-й мин после добавлении хлорида алюминия в разных концентрациях

Байкалин		Концентрация хлорида алюминия (%)					Среднее
Концентрация (%)	Длина волны максимума (нм)	5	2	1	0,1	0,02	
		Сдвиг (нм)					
0,02	317	17	16	17	18	17	$17\pm 0,3$
	278	14	12	12	14	13	$13\pm 0,4$
	246	2	1	2	3	1	$1,8\pm 0,3$
0,01	317	16	17	17	17	17	$16,8\pm 0,2$
	278	13	14	13	13	14	$13,4\pm 0,2$
	246	3	2	2	2	2	$2,2\pm 0,2$
0,005	317	18	16	17	17	18	$17,2\pm 0,4$
	278	13	12	13	11	14	$12,6\pm 0,5$
	246	2	1	2	3	2	$2\pm 0,3$

Высота батохромного максимума на аналитической длине волны практически линейно зависит от концентрации байкалина (рис. 2, кривая 1), что соответствует закону Бера. На основании этого было получено линейное уравнение, связывающее оптическую

плотность или высоту максимума на аналитической длине волны с концентрацией исследуемого раствора (рис. 2, линия 2). Аналитическое выражение линейного уравнения приведено на рис. 2. Погрешности и практическое использование для определение концентраций флавоноидов полученного линейного уравнения показаны в приводимых ниже примерах.

1). Погрешности линейного уравнения. Готовятся точные растворы байкалина в концентрациях 0,05, 0,1, 0,15 и 0,2 мг/мл. Берется первого раствора 0,5 мл, в которых содержится $0,05/2 = 0,025$ мг байкалина, к этому объему добавляется 2,5 мл 2% раствора хлорида алюминия, суммарный объем равен 3 мл, тогда экспериментально взятая концентрация байкалина составляет $C_x = 0,025/3 = 0,00833$ мг/мл. Для этой концентрации на спектрофотометре при аналитической волне 334 нм определяется оптическая плотность $D_x = 0,4106$. Теперь, используя линейное уравнение, вычисляется теоретическая концентрация:

$$C_t = (D_x - 0,0346)/43,491 = (0,4106 - 0,0346)/43,491 = 0,008645,$$

где 43,491 и 0,0346 – коэффициенты линейного уравнения. Далее находятся разности абсолютная ($C_x - C_t$) и относительная $[(C_x - C_t) \times 100 / C_x]$. Аналогично проводились измерения и расчеты для растворов остальных указанных выше концентраций, экспериментальные и расчетные результаты представлены в табл. 2. Расхождение взятого экспериментально и вычисленного по линейному уравнению содержания байкалина составляет в среднем порядка 2%, что вполне приемлемо.

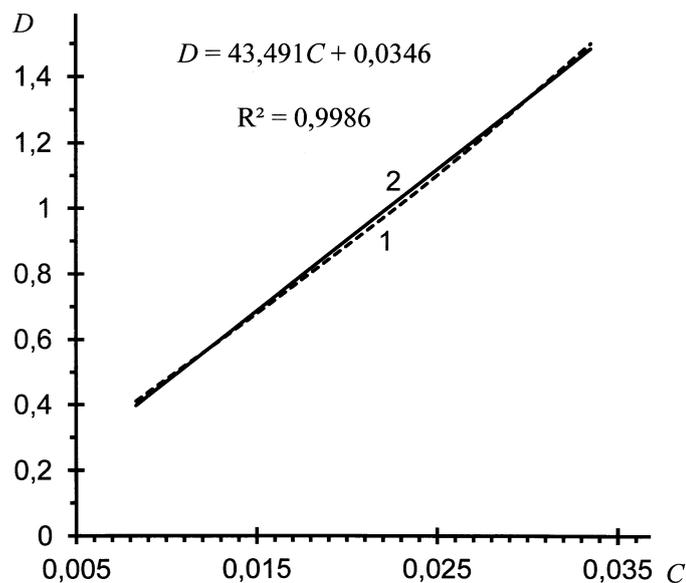


Рис. 2. Зависимость высоты батохромного максимума (334 нм) от концентрации (1) и линия Бера (2) для байкалина. На диаграмме дано аналитическое выражение линейного уравнения и показатель его достоверности R^2 . По горизонтали – концентрация (C), по вертикали – оптическая плотность (D).

Таблиця 2

Результаты вычислений погрешностей полученного линейного уравнения

Экспериментальная концентрация C_x (мг/мл)	Оптическая плотность D_x (усл. ед)	Теоретическая концентрация C_t (мг/мл)	Разность	
			абсолютная (мг/мл)	относительная (%)
0,00833	0,4106	0,008645	0,000315	3,78
0,01667	0,7480	0,016403	0,000267	1,60
0,02500	1,1039	0,024587	0,000413	1,65
0,03333	1,5000	0,033694	0,000364	1,09
Среднее				2,03±0,59

2). Поскольку наибольшая относительная погрешность оказалась для самой малой из исследованных концентраций, что вполне естественно, то для уточнения погрешностей применен метод добавок при концентрации байкалина 0,05 мг/мл. В 0,5 мл этого раствора содержится 0,025 мг, а в 0,1 мл соответственно 0,005 мг. К 0,5 мл раствора байкалина добавляется 2,5 мл 2% хлорида алюминия. Первая строчка таблицы 3 без добавок заполняется аналогично выше приведенного первого примера. Затем в кювету спектрофотометра вносится 0,1 мл раствора байкалина, при этом изменяется объем и концентрация раствора C_x , после чего измеряется оптическая плотность D_x , вычисляется теоретическая концентрация C_t по линейному уравнению, берется относительная разность концентраций C_x и C_t , результаты заносятся во 2-ю строчку табл. 3, и т.д. Как видно из табл. 3 средняя относительная разность оказалась меньше 2%, что весьма удовлетворительно.

Таблица 3

Результаты вычислений погрешностей полученного линейного уравнения методом добавок

Добавка (мл)	Объем (мл)	Внесено (мг)	C_x	D_x	C_t	Разность (%)
0	3	0,025	0,00833	0,3901	0,00817	1,87
0,1	3,1	0,030	0,00968	0,4485	0,00952	1,68
0,2	3,2	0,035	0,01094	0,5015	0,01074	1,87
0,3	3,3	0,040	0,01212	0,5581	0,01204	0,68
0,4	3,4	0,045	0,01323	0,0606	0,01313	0,76
Среднее						1,37±0,27

3). Определение суммы флавоноидов в сухом экстракте из корней шлемника байкальского. Готовится раствор сухого экстракта, например, в концентрации 0,78 мг/мл на 96%-м этаноле, из этого раствора берется 0,25 мл, в которых содержится 0,195 мг, добавляется 2,5 мл 2% хлорида алюминия, концентрация в кювете 0,070909 мг/мл, при этом оптическая плотность на аналитической длине волны составляет 1,1322. Расчет по уравнению дает значение концентрации суммы флавоноидов 0,025237 мг/мл, поскольку только флавоноиды образуют комплексы с хлоридом алюминия, что обеспечивает батохромный эффект. Таким образом, в 1 мл раствора на 0,070909 мг сухого экстракта из корней шлемника байкальского приходится 0,025237 мг суммы флавоноидов, или 35,6% пересчитанных на байкалин. Такой результат для неочищенного, небогатого сухого экстракта из корней шлемника байкальского вполне удовлетворительный и совпадает с данными литературы [2].

4). Определение суммы флавоноидов в корнях шлемника байкальского. Берется точная навеска тщательно измельченного сухого корня 250 мг и помещается в 10 мл 96% этанола, в 1 мл 25 мг, и экстрагируется стандартным методом [4], затем разбавляется этанолом в 10 раз. К 0,5 мл разбавленной настойки добавляется 2,5 мл 2% хлорида алюминия (суммарный объем 3 мл, т.е. разбавление еще в $3/0,5 = 6$ раз). Спектрофотометр на аналитической волне показывает оптическую плотность, равную 0,8464. Расчет по линейному уравнению дает концентрацию $C = (0,8464 - 0,0346)/43,491 = 0,01866$. При обратном перерасчете на исходный раствор получаем: $0,018666 \times 6 \times 10 = 1,119956$ (6 и 10 – разбавления). Если принять, что флавоноиды экстрагировались полностью, то в 1 мл на 25 мг корня приходится 1,119956 мг суммарного количества флавоноидов или 4,48% в пересчете на байкалин. На самом деле степень экстракции вряд ли превышает 80 – 85%. С большой вероятностью можно считать, что содержание суммы флавоноидов порядка 5%, это обычно для корней шлемника байкальского и не противоречит литературным данным [2,5], полученным сложными методами жидкостной хроматографии в условиях изократического и градиентного элюирования.

Таким образом, разработан сравнительно простой и достаточно точный метод спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в препаратах шлемника байкальского. Вычислительная работа легко поддается автоматизации посредством несложных алгоритмов компьютерных программ, что еще упрощает методику и сокращает время получения конечного результата. В заключение следует также заметить, что использование батохромных эффектов на основе образования комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия перспективно для экспресс-анализа не только экстрактов шлемника байкальского, но, учитывая минимальные требования к подготовке проб, и для других извлечений из растений, содержащих флавоноиды, при производстве фитопрепаратов.

Библиография.

1. Колдаев В.М. Спектры поглощения экстрактов из лекарственных растений Приморья / В.М. Колдаев. – М.: Спутник+, 2013. – 128 с.
2. Комарова Е.Л. и др. Оценка подлинности растительных экстрактов как сырья БАД. *Scutellaria baicalensis* Georgi – шлемник байкальский / Е.Л. Комарова, К.И. Эллер, А.М. Власов, А.С. Балусова // Рынок БАД, 2006. – № 1. – С. 38 – 39.
3. Лебеда А.Ф. и др. Лекарственные растения / А.Ф. Лебеда, Н.И. Джуренко, А.П. Исайкина, В.Г. Собко. – М.: АСТ-ПРЕСС КНИГА, 2011. – 496 с.
4. Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
5. Оленников Д.Н., Чирикова Н.К., Танхаева Л.М. Фенольные соединения шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) / Д.Н. Оленников, Н.К. Чирикова, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. 2009. – № 4. – С. 89–98.
6. Петриченко В.М., Голишевская Е.Е. Определение суммы флавоноидов в траве марьяника лугового / В.М. Петриченко, Е.Е. Голишевская // Фармация, 2004. – № 1. – С. 24–25.