



УДК 615.322:582.948.25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДУНИЦЫ НЕЯСНОЙ

В.С. КАЗАНОВА
О.О. НОВИКОВ
Д.И. ПИСАРЕВ
Н.Н. ШЕСТОПАЛОВА
Д.А. ФАДЕЕВА

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: kazakova@bsu.edu.ru

В статье приведены результаты качественного состава флавоноидов листьев медуницы неясной методом бумажной хроматографии. С достоверными образцами, идентифицированы рутин и цинарозид. Подобраны оптимальные условия и разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях медуницы неясной спектрофотометрическим методом. Установлено, что содержание суммы флавоноидов составляет 0,33%-0,48%.

Ключевые слова: флавоноиды, медуница неясная, рутин, цинарозид.

Введение. Актуальность использования лекарственных средств на основе растительного сырья неизмеримо возросла в последние десятилетия. Лечение растениями и фитопрепаратами прошло испытание временем и в настоящее время получило признание в медицине во всем мире. Существенным преимуществом растений перед синтезированными лекарственными средствами является наличие в них естественного комплекса биологически активных веществ в наиболее доступной и усвояемой форме, а также наиболее благоприятного для организма человека соотношения основных компонентов, свойственных живой природе в целом.

Это и предопределило резкое увеличение потребности в растительном лекарственном сырье, вызвало необходимость более пристального изучения естественных ресурсов, химического состава растительного сырья и рационального использования лекарственных растений в лечебных целях.

Наиболее продуктивным способом расширения номенклатуры лекарственного растительного сырья является исследование с доказательством возможности медицинского применения малоизученных видов растений, к числу которых относится медуница неясная (*Pulmonaria obscura* L.).

Медуница неясная (*Pulmonaria obscura* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Бурачниковые (*Boraginaceae*) высотой 8-30 см, с толстым бурым корневищем и многочисленными придаточными корнями. Листья цельнокрайние, заостренные, короткожестковолосистые, иногда с беловатыми пятнами. Цветки на коротких цветоножках собраны в немногочетковые, часто парные завитки, иногда собранные на верхушке стебля в щиток. Плод – сухой, состоящий из четырех орешков, заключенных в колокольчатую чашечку. Широко распространено в областях Центральной России, является официальной в ряде стран и используется в качестве отхаркивающего, смягчающего, вяжущего антигеморрагического средств [4, 6].

На территории Центральной России произрастают медуница неясная, медуница узколистная, химический состав которых практически не изучен [5].

Целью настоящей работы явилось обоснование возможности использования листьев медуницы неясной в качестве перспективного источника флавоноидных соединений.

Для реализации поставленной цели необходимо было изучить качественный состав флавоноидов и определить их содержание в выбранном объекте.

Методики исследования. Объектом исследования служили прикорневые листья медуницы неясной (*Pulmonaria obscura* Dumort.)

На первом этапе исследований нами было проведено изучение качественного состава флавоноидов медуницы неясной. Для выделения суммы флавоноидов измель-

чѐнное воздушно-сухое сырьѐ листьев медуницы неясной в количестве 50,0 г экстрагировали методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета до полного истощения сырья. Полученное извлечение сгущали под вакуумом с помощью ротационного испарителя ИР-1, остаток растворяли в 4-кратном количестве воды очищенной и оставляли в холодильнике на 72 часа. Выпавший осадок липофильных веществ, отфильтровывали и полученную сумму обрабатывали в делительной воронке хлороформом. Маточник после экстрагирования хлороформом обрабатывали этилацетатом до обесцвечивания этилацетатного слоя. В дальнейшем для изучения флавоноидного состава использовали этилацетатное извлечение, которое упаривали под вакуумом в ротационном испарителе ИР-1. Полученный остаток растворяли в минимальном количестве спирта этилового 96% и сумму флавоноидов переосаждали хлороформом. Состав флавоноидов изучали методом бумажной хроматографии. Хроматографирование проводили на бумаге хроматографической Filtrek FN-11 в системах растворителей: 15% раствор кислоты уксусной, н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2), бензол – этилацетат – кислота уксусная ледяная (50:50:1) с достоверными образцами свидетелей флавоноидов. В качестве проявителя использовали пары аммиака и 2% раствор циркония хлорокиси в спирте этиловом 96% (реактив Херхаммера). [1]. Таким образом, было установлено наличие 4 веществ с R_f 0,05, R_f 0,10, R_f 0,21, R_f 0,31 в виде пятен с желтой флуоресценцией, отнесенных к флавоноидным соединениям. С достоверными образцами идентифицировали лютеолин-7-гликозид или цинарозид и рутин (рис. 1).

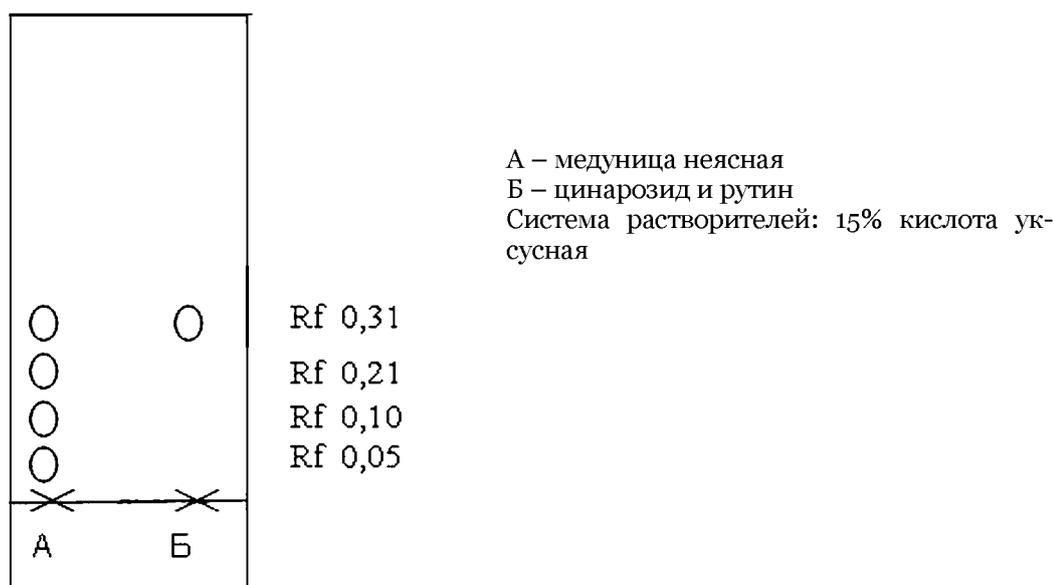


Рис. 1. Схема бумажной хроматограммы спирто-водных извлечений из листьев медуницы неясной

Присутствие данных компонентов в составе листьев медуницы неясной подтверждено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на основании совпадения времени удерживания анализируемых образцов и достоверно известных свидетелей флавоноидов.

В основу количественного определения флавоноидов в сырье в пересчете на лютеолин-7-гликозид положен метод спектрофотометрического анализа в непосредственном извлечении из сырья, основанный на химическом взаимодействии флавоноидов с алюминия хлоридом безводным в среде кислоты хлористоводородной разведенной с образованием окрашенных продуктов – хелатных комплексов. При этом максимум поглощения первой полосы смещается на 35-50 нм к видимой области (батохромный сдвиг), по сравнению с исходным флавоноидом. При добавлении кислоты хлористоводородной нестабильные комплексы в орто-дигидроксигруппах разрушаются, а



комплексы между карбонильной группой при С4 и гидроксильными группами при С3 и С5 сохраняются [3].

У спиртовых извлечений из исследуемых образцов максимум поглощения при добавлении $AlCl_3 + HCl$ находился при 400 нм (рис. 2).

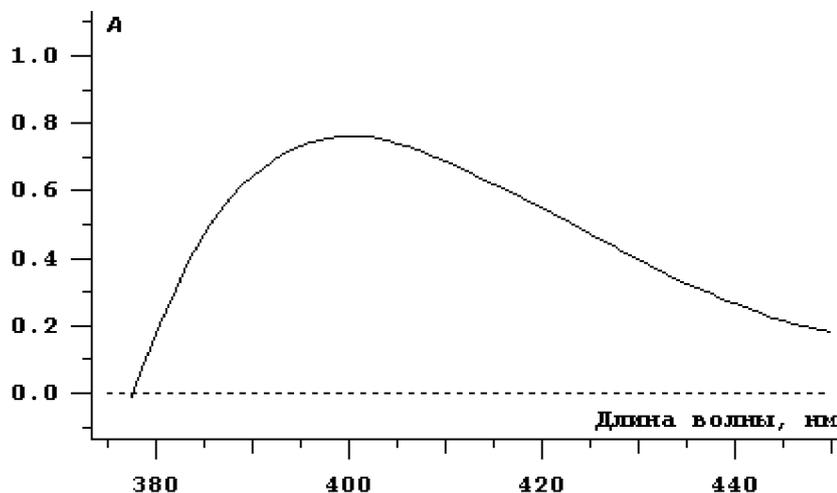


Рис. 2. УФ-спектр комплекса спиртового извлечения из листьев медуницы неясной с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида

Аналогичный максимум поглощения отмечен для комплекса ГСО лютеолин-7-гликозида (цинарозида) с $AlCl_3 + HCl$ [2].

Изучены условия извлечения флавоноидов из сырья, установлено, что оптимальным экстрагентом является спирт этиловый 70%. Соотношение сырья и общего объема экстрагента 1:100, время четырехкратного извлечения на кипящей водяной бане 120 минут.

Точную навеску сырья в количестве 1,0 г, измельченного до размера частиц 1-3 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 25 мл спирта этилового 70%, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и содержимое фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Далее указанным выше способом экстракцию повторяли ещё 3 раза тем же экстрагентом. Извлечения фильтровали в ту же мерную колбу. Объем фильтрата доводили до метки 70% спиртом. Полноту извлечения флавоноидов из сырья подтверждали отрицательной цианидиновой пробой.

2,5 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 96% и 2 капли разведенной кислоты уксусной. Объем раствора доводили спиртом этиловым 96% до метки и оставляли на 45 минут. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,5 мл извлечения, 2 капель разведенной кислоты уксусной, и доводили спиртом этиловым 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

С целью пересчета содержания суммы флавоноидов на цинарозид использован удельный показатель поглощения, заимствованный из литературных источников. Согласно найденным данным удельный показатель поглощения комплекса раствора ГСО цинарозида с алюминия хлоридом при аналитической длине волны 400 нм составляет $145,0 \pm 2,3$. На этом основании в формулу расчета включено теоретическое значение $E_{1\%}^{1cm} = 145$.



Расчет полученных результатов вели по формуле:

$$X = \frac{A_x \times W \times W_2}{E_{\%}^{1\text{мг}} \times m \times V_a}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; W, W_2 – разведения, мл; E – удельный показатель поглощения стандартного раствора цинарозида, равный 145; m – масса навески исследуемого сырья, г; V_a – объем аликвоты, мл.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты статистической обработки данных 7 параллельных измерений показали, что содержание флавоноидов в листьях медуницы неясной в пересчете на лютеолин-7-гликозид (цинарозид) составило $0,485 \pm 0,016\%$, ошибка единичного определения при доверительной вероятности 95% находилась в пределах $\pm 3,4\%$ (см. табл.).

Таблица

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в листьях медуницы неясной в пересчете на лютеолин-7-гликозид

$X(\%)$	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
0,47	0,015	0,000225	$\bar{X} = 0,485\%$ $\sum(\bar{X} - X)^2 = 0,001775$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,0065$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,016$ $\varepsilon = 3,44\%$
0,49	0,005	0,000025	
0,49	-0,005	0,000025	
0,51	-0,025	0,000625	
0,46	0,025	0,000625	
0,50	-0,015	0,000225	
0,48	0,005	0,000025	
$X = 0,485$		$\Sigma = 0,001775$	

Таким образом, на данном этапе химических исследований листьев медуницы неясной удалось установить наличие двух флавоноидов – лютеолин-7-гликозида (цинарозида) и рутина методом бумажной хроматографии, что нашло подтверждение в результатах высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определено количественное содержание флавоноидов в исследуемом сырье в пересчете на лютеолин-7-гликозид, которое составило $0,485 \pm 0,016\%$.

Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать о перспективности данного сырья как источника флавоноидов и рекомендовать его для дальнейших химических и фармакологических испытаний.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, Государственный контракт № П425 от 12 мая 2010 г., тема проекта: «Разработка методик выделения и определения полифенольных соединений классов флавоноидов, каротиноидов и антоцианов и технологии создания лекарственных форм на их основе».

Литература

1. Бандюкова, В.А. Тонкослойная хроматография флавоноидов / В.А. Бандюкова, А.А. Шинкаренко // Химия природных соединений. – 1983. – №1. – С.20
2. Беликов, В.В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов / В.В. Беликов, Т.В. Точкова // Фенольные соединения и их физиологические свойства. – Алма-Ата, 1973. – С. 168-172.
3. Беликов В.В. Методы анализа флавоноидных соединений / В.В. Беликов, М.С.Шрайбер // Фармация. – 1970. – № 1. – С. 68-72.



4. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Кисилева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. – М. : Тов-во науч. изданий КМК, Ин-т технолог. исследований, 2002. – Т.3. – С.104-105.
5. Полуянов, А.В. Сосудистые растения Курской области : учебное пособие/ А.В. Полуянов, Н.А. Прудников. – Курск : КГУ, 2005. – 80 с.
6. British Herbal Pharmacopoeia – Bournemouth, ВПМА, 1983. – 212 p.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF PULMONARIA OBSCURA'S FLAVONOID COMPOUNDS

V.S. KAZAKOVA
O.O. NOVIKOV
D.I. PISAREV
N.N. SHESTOPALOVA
D.A. FADEEVA

*Belgorod National
Research University*

e-mail: kazakova@bsu.edu.ru

Qualitative composition of flavonoids of *Pulmonaria obscura*'s leaves was studied by paper chromatography. Rutin and cinarozide were identified there. Optimum conditions and methodology to quantify the amount of flavonoids in leaves of *Pulmonaria obscura* by spectrophotometric method are selected. It is estimated that the amount of flavonoids is 0,33% - 0,48%.

Key words: flavonoids, *Pulmonaria obscura*, rutin, cinarozide.