



УДК: 615.322:54.062:543.42

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ И СУММЫ ПОЛИФЕНОЛОВ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ВОЛОДУШКИ ЗОЛОТИСТОЙ

А.В. ГЛУЩЕНКО
В.А. ГЕОРГИЯНЦ
Н.Ю. БЕВЗ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

e-mail: alla_glush@mail.ru

В статье описан метод количественного определения флавоноидов и суммы полифенольных соединений в надземной части володушки золотистой. Определение флавоноидов проведено спектрофотометрическим методом при длине волны 411 нм методом стандарта, полифенольные соединения исследованы методом стандарта при длине волны 460 нм. Установлено, что в надземной части володушки золотистой содержится до 2,14% флавоноидов в пересчете на рутин и до 1,41% полифенольных соединений в пересчете на пирогаллол. Результаты исследования будут использованы для разработки методик контроля качества на анализируемое сырье.

Ключевые слова: володушка золотистая, флавоноиды, полифенольные соединения, спектрофотометрическое определение.

Многочисленные и разнообразные по своей структуре природные флавоноиды все больше привлекают внимание ученых. Интерес к этой группе можно объяснить повсеместным распространением в природе и широким спектром биологической активности, среди которой отмечается мочегонное, противовирусное, кардиотоническое, гипотензивное, капилляроукрепляющее, противоопухолевое и другие действия [1, 2]. Особого внимания удостоивает положительное влияние флавоноидов на функцию печени: усиливают ее желчегонное, антиоксидантное действие, улучшает окислительно-восстановительные процессы [3-5].

Интерес вызывало изучить володушку золотистую (ласковець золотистий, заячья капуста, боярская сныть, полевая сельдерея, собачья трава, солнечноца, недужница, печеночница, золотница, желчица) (семейство Сельдереяные) – *Bupleurum aureum* Fisch. (Ariaceae), богатую содержанием флавоноидов (кверцетин, изорамнетин, рутин, нарциссин) и применяющуюся с давних времен в народной и традиционной медицине для лечения патологий гепатобилиарной системы [6, 7].

Целью нашей работы явилось установление количественного содержания флавоноидов и полифенольных соединений в надземной части володушки золотистой, которая, с нашей точки зрения, может стать перспективным сырьем для создания нового гепатозащитного препарата.

Экспериментальная часть. Количественное содержание флавоноидов и суммы полифенолов в 1,0 г сырья определяли спектрофотометрическим методом, рекомендованным ГФУ [8].

Объектом служила воздушно-сухая измельченная надземная часть володушки золотистой. Сырье заготовлено в 2011 году в Барнауле в период массового цветения растений. Спиртовое извлечение из растительного сырья, приготовленное на 30% спирте этиловом в соотношении 1:20.

Для работы использовали мерную посуду класса А и реактивы, отвечающие требованиям ГФУ, аналитические весы «AXIS», спектрофотометр Evolution 60S, тонкослойные пластинки со слоем силикагеля GF₂₅₄.

Результаты и их обсуждение. Наличие флавоноидов определяли в этилацетатных фракциях, полученных для проведения количественного определения и в спиртовом извлечении из володушки золотистой характерными реакциями идентификации и тонкослойной хроматографией. Положительные реакции цианидиновой пробы, с 2% раствором алюминия хлорида и 10% раствором натрия гидроксида свидетельствуют о наличии флавоноидов в анализируемом сырье.

Идентификацию флавоноидов методом тонкослойной хроматографии проводили в системе растворителей бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2) с использованием для проявления 5% спиртового раствора алюминия хлорида. Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после проявления реактивом. В качестве стандарта использовали рутин.



Исследуемый раствор. 1 мл спиртового извлечения володушки золотистой помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до объема 96% спиртом.

Раствор сравнения. 0,050 г СО рутин Р помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл 96% спирта Р при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора 96% спиртом до метки, перемешивают.

На линию старта хроматографической пластинки размером 20 x 20 наносят в виде полос длиной 2 см 20 мкл исследуемого раствора и 20 мкл (10 мкг) раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе 15 мин, помещают в камеру со смесью растворителей бутанол Р – кислота уксусная ледяная Р – вода Р (4:1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе 30 мин, опрыскивают 5% раствором алюминия хлорида Р в спирте Р, высушивают в потоке теплого воздуха и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме исследуемого раствора должно проявляться не менее 6 пятен – полоса желтого цвета на уровне полосы раствора сравнения, три полосы выше полосы раствора сравнения и две полосы ниже полосы раствора сравнения. Допускается наличие других пятен разного размера и окраски.

В результате хроматографического анализа в володушке золотистой в УФ - свете при длине волны 254 нм обнаружено не менее 6 веществ в виде темных пятен и пятен с фиолетовой флуоресценцией, отнесенных к флавоноидным соединениям.

Для оценки качества сырья и производства на его основе препаратов необходимо было провести стандартизацию, составной частью которой является количественное определение. Среди методов количественного определения флавоноидов достаточно распространенным и удобным является метод дифференциальной спектрофотометрии [9-15]. В литературе описаны методики спектрофотометрического определения флавоноидов в растительном сырье, при которых к исследуемому раствору добавляют раствор алюминия хлорида. Основным преимуществом данного метода является возможность избирательного определения флавоноидов в сложных смесях полифенольных соединений, в частности в извлечениях из растительного сырья, без предварительного разделения. При этом наблюдается батохромный сдвиг первой полосы поглощения флавоноидов, который позволяет исключить влияние других биологически активных веществ фенольной структуры [16-18].

Исходя из вышеизложенного, для количественного определения флавоноидов использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования с солями алюминия.

Согласно ГФУ, количественное определение флавоноидов в растительном сырье проводится спектрофотометрическим методом после кислотного гидролиза, извлечения этилацетатом и проведения реакции с раствором алюминия (III) хлорида. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид проводят методом определения удельного показателя поглощения. В результате проведенных исследований нами установлено, что абсорбционный спектр поглощения полученного окрашенного раствора характеризуется максимумом при длине волны 425 нм (рис. 1), флавоноидов в пересчете на гиперозид содержится 1,65%.

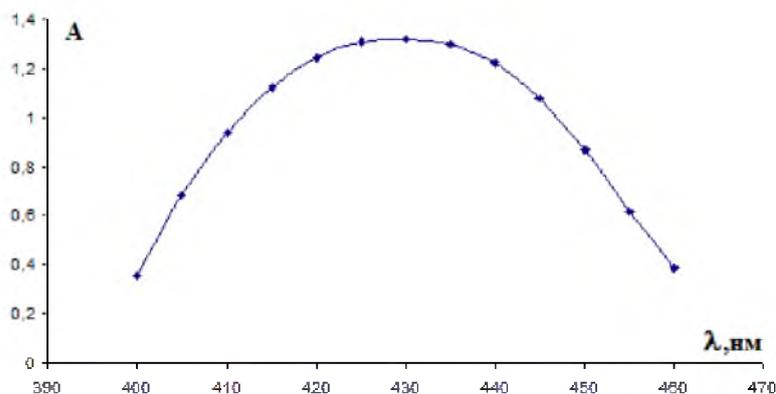


Рис. 1. Адсорбционный спектр поглощения извлечения из сырья после реакции с раствором алюминия (III) хлорида

Содержание флавоноидов в спиртовом извлечении определяли также спектрофотометрическим методом, основанным на реакции образования комплексных соединений с раствором алюминия (III) хлорида. Для этого нами были приготовлены спиртовые извлечения из сырья,



проведена реакция с раствором алюминия хлорида в уксуснокислой среде и записан адсорбционный спектр поглощения полученного раствора (рис. 2).

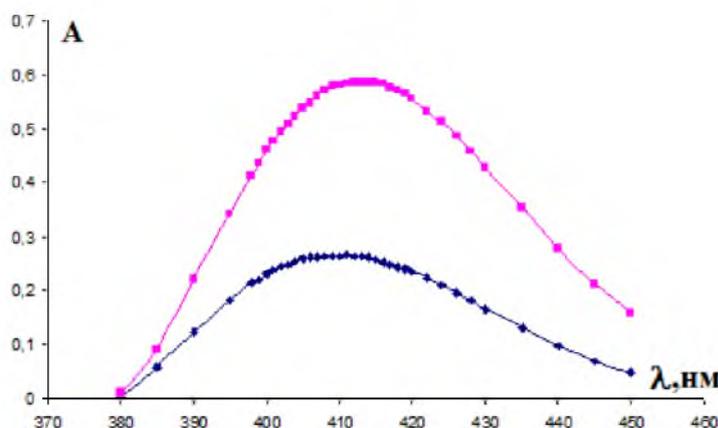


Рис. 2. Адсорбционный спектр поглощения 1 – исследуемого спиртового извлечения, 2 – СО рутина после реакции с раствором алюминия хлорида в уксуснокислой среде

Как видно из приведенного спектра, максимум поглощения исследуемого раствора более интенсивный, полностью совпадает с максимумом поглощения рутина и наблюдается при длине волны 411 нм.

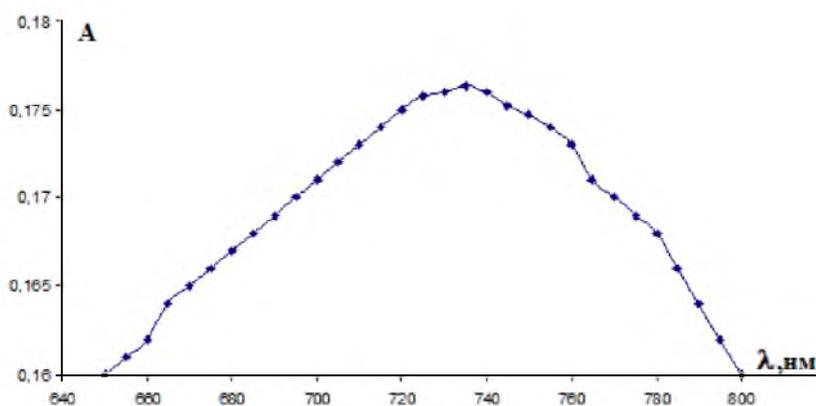


Рис. 3. Спектр поглощения исследуемого раствора

Количественное определение флавоноидов в спиртовом экстракте володушки золотистой проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 411 нм методом стандарта по следующей методике: 1,0 мл спиртового экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 5% растворе кислоты уксусной ледяной в этаноле и перемешивают. Через 10 мин доводят объем раствора 5% раствором кислоты уксусной в спирте этиловом до метки и перемешивают.

Параллельно в тех же условия проводят реакцию с 1 мл спиртового раствора рутина.

Через 30 мин записывают адсорбционный спектр исследуемого раствора и раствора стандартного образца рутина на спектрофотометре в области от 395 до 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора использовали раствор следующего состава: 1,0 мл спиртового экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 5% раствора кислоты уксусной в спирте этиловом, через 10 мин доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Приготовление раствора СО рутина. Около 0,02 г (точная навеска) СО рутина растворяют в 30 мл 96% спирта при нагревании на водяной бане, охлаждают и доводят объем раствора тем же растворителем до 50 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин составляет 2,14%.

Известно, что флавоноидные соединения содержат в своей структуре свободные гидроксильные и карбонильные группы, поэтому целесообразно было определить сумму полифенольных соединений.

При определении суммы полифенолов установлено, что абсорбционный спектр поглощения водного извлечения из сырья с последующим добавлением фосфорномолибденово-вольфрамового реактива в области от 650 нм до 800 нм характеризуется максимумом поглощения при длине волны 760 нм, совпадающий с максимумом поглощения раствора сравнения – пирогаллола (рис. 3). Содержание полифенольных соединений в пересчете на пирогаллол составляет 1,41%.

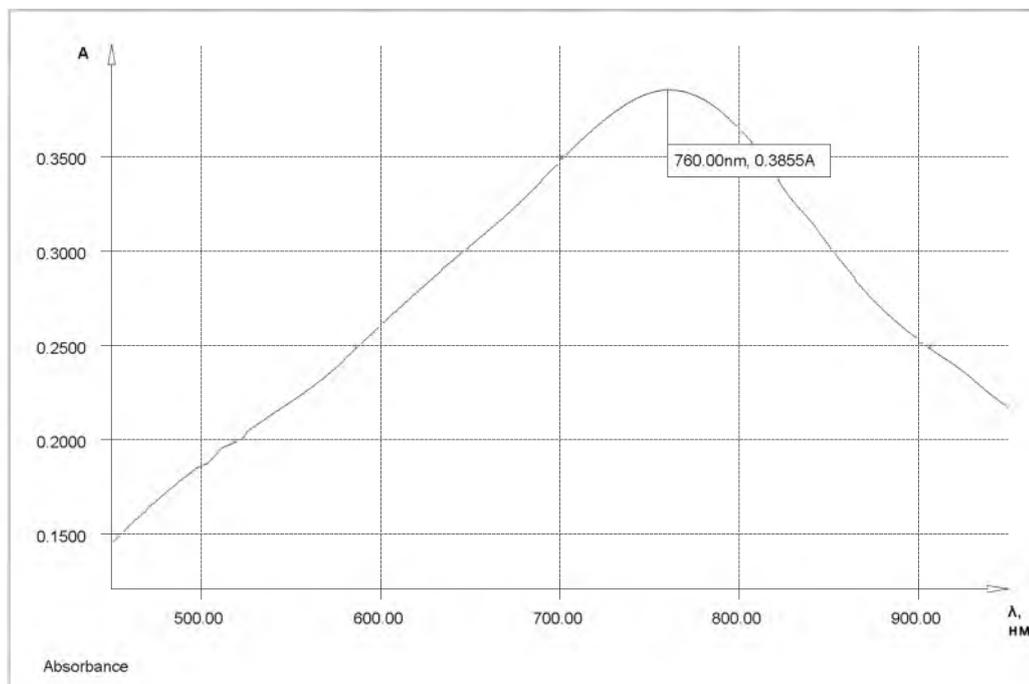


Рис. 4. Спектр поглощения раствора пирогаллола

Выводы: В результате проведенных исследований установлено, что в надземной части володушки золотистой в пересчете на рутин содержится до 2,14% флавоноидов и до 1,41% полифенольных соединений в пересчете на пирогаллол. Полученные результаты будут использованы для разработки методик контроля качества на анализируемое сырье.

Литература

1. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols / L. Wang, Yi-Chen Tu, Tzi-Wei Lian et al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol. 54, № 26. P. 9798-9804.
2. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs / Giulia Di Carlo, Nicola Mascolo, Angelo A. Izzo et al. // *Life Sciences*. 1999. Vol. 65, Issue 4. P. 337-353.
3. Доркина Е.Г. Гепатопротекторные свойства флавоноидов (фармакодинамика и перспективы клинического изучения): диссертация доктора биологических наук: 14.03.06. Волгоград, 2010. 296 с.
4. Active oxygens generation by flavonoids / Y.H. Miura, I. Tomita, T.Watanabe et al. // *Biol. Pharm. Bull.* 1998. Vol. 21, № 2. P. 93-96.
5. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis / A. Pavanato M., J. Tunon, S. Sanchez-Campos et al. // *Dig. Dis. Sei.* 2003. Vol.48, №4. P.824-829.
6. Башнирова Р. М. Применение растений рода володушка *Vulpurum* в гепатологии / Р.М. Башнирова, А.М. Мингажева, Р.С. Мингазов // *Практическая фитотерапия*. 2003. № 3. С. 4-6.
7. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine: wedelia chinensis on three hepatotoxin-induced hepatotoxicity / S.C. Lin, CC. Lin, YH Lin et al. // *Am. J. Chin. Med.* 1994. Vol. 22, №2. P. 155-168.
8. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Х.: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. 620 с.
9. Серета П.І. Фармакогнозія. Лікарська рослинна сировина та фітозасоби / П.І. Серета, Н.П. Максютіна, Л.Л. Давтян. Вінниця: вид. «Нова книга», 2006. 346 с.
10. Kovalev S. V. Flavonoids from *Lotus ucrainicus* and *L. arvensis* // *Chemistry of Natural Compounds*. 2009, Vol. 45, Issue 4. P. 550-551.
11. Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomeea carnea*/ Khatiwora Elija, Adsul Vaishali B., Kulkarni Manik M. et al. // *International Journal of Chem.Tech.Research*. 2010. Vol. 2 Issue 3. P. 1698-1701.



12. Flavonoid Content Assay: Prevalidation and Application on *Plantago L. Species*. Grubeic Renata Juric, Vukovic Jadranka, Kremerb Dario et al. *Acta Chim. Slov.* 2007. Vol. 54. P. 397-406.
13. Jiang Xiu-Juan / Visible Spectrophotometric Determination of Total Flavonoids in *Capparis spinosa L.* Buds / Jiang Xiu-Juan, Tang Jin-Cheng, Bai Hong-Jin // *Food Science*. 2010. Vol. 31, № 18. P. 252-254.
14. Yujie Chen. Determination of total flavonoids in three *Sedum* crude drugs by UV-Vis spectrophotometry / Yujie Chen, Jing Wang, Dingrong Wan // *Pharmacogn. Mag.* 2010. Vol. 6, №24. P. 259-263.
15. Использование физико-химических методов для определения содержания флавоноидов в траве овса посевного / А.Ю. Саенко, М.Ф. Маршалкин, М.В. Гаврилин и др. // *Современные наукоемкие технологии*. 2004. №1. С. 29-30.
16. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения / О.М. Маркова, В.А. Карпенко, А.С. Саушкина и др. // *Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация*. 2003. №1. С. 99-100.
17. Криворучко О.В. Кількісне визначення флавоноїдів і полісахаридів у лікарських засобах з листя смородини чорної / О.В. Криворучко, О.Ю. Ткаченко, В.С. Кисличенко // *Фармацевтичний журнал*. 2003. №4. С. 76-78.
18. Количественное определение суммы флавоноидов в черных листьях *Bergenia crassifolia L.* / П.Б. Лубсандоржиева, Т.Л. Даргаева, А.В. Патудин и др. // *Растительные ресурсы*. 1996. №3. С. 92-95.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND SUM OF POLYPHENOLS IN THE ABOVE-GROUND OF BUPLEURUM AUREUM

A.V. GLUSHCHENKO
V.A. GEORGIYANTS
N.Y. BEVZ

*National Pharmaceutical
University, Kharkiv*

e-mail: alla_glush@mail.ru

In the review the method of quantitative determination of flavonoids and sum of polyphenols in the above-ground of *Bupleurum aureum* has been presented. The determination of flavonoids has been carried out by spectrophotometric method at wavelength set 411 nm by method of standards. Polyphenol compounds have been studied by method of standard at wavelength set 411 nm. To 2,14% of flavonoids and 1,41% of polyphenol compounds in the above-ground of *Bupleurum aureum* have been founded. Results of this investigation will be used for the development of qualities' methods of control for the raw materials that we analyzed.

Key words: *Bupleurum aureum*, flavonoids, polyphenol compounds, spectrophotometric determination.