

УДК [615.356:577.164.3].074

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ФЛАВОНОИДОВ В ПЛОДАХ ЧЕРЕМУХИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Е.В. Бекетов*, А.А. Абрамов, О.В. Нестерова*, С.В. Кондрашев*

(кафедра радиохимии; e-mail: aaa@radiochem.msu.ru)

Проведено изучение флавоноидного состава плодов черемухи обыкновенной методом тонкослойной хроматографии. Определены оптимальные параметры экстракции суммы флавоноидов из плодов черемухи и проведена количественная оценка методом спектрофотометрии. На основании полученных экспериментальных данных разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной.

В последние годы наряду с поиском новых лекарственных растений проводится углубленное изучение сырья, традиционно применяемого в медицине. Эти исследования направлены прежде всего на определение строения биологически активных веществ и разработку современных и объективных методик стандартизации растительного сырья.

Черемуха обыкновенная издавна известна как ценное пищевое и лекарственное растение, широко распространенное в Евразии. Ее плоды, цветки, листья, побеги, кора, древесина используются в лекарственных, пищевых, хозяйственных и декоративных целях. Официальным видом, разрешенным к применению в медицинской практике, является черемуха обыкновенная *Padus avium Mill.* Лекарственным сырьем являются плоды (*Fructus padi*).

Плоды черемухи практически не изучали с конца 50-х годов, хотя химический состав входящих в нее веществ достаточно интересен: это и дубильные вещества, которые обеспечивают основной фармакологический эффект, флавоноиды и органические кислоты (яблочная, лимонная), гликозиды (амигдонитрогликозид, пруназид), фитонциды, аминокислоты [1,2]. На сегодняшний день черемуха является перспективной лекарственно-технической культурой, поэтому необходимо более детальное изучение ее сырья. Цель нашего исследования состояла в том, чтобы подтвердить наличие в плодах черемухи обыкновенной флавоноидов и разработать методику их количественного определения.

Экспериментальная часть и обсуждение результатов

Для качественного анализа плодов черемухи обыкновенной (*P. avium Mill*) использовали метод тонко-

слойной хроматографии (ТСХ). Фитохимическое исследование проводили путем экстрагирования образцов сырья 50%-м этиловым спиртом при нагревании на водной бане с последующим хроматографированием в тонком слое сорбента (система – *n*-бутанол:ледяная уксусная кислота:вода = 5:1:1).

На линию старта пластинки фирмы «Merck» размером 15×10 см со слоем силикагеля марки «Kieselgel G60 F₂₄₅» наносили микропипеткой по 30 мкл исследуемого экстракта и по 10 мкл 1%-х растворов свидетелей (рутина, кверцетин, лютеолина, лютеолина-7-гликозида). Хроматографическую пластинку помещали в камеру, которую предварительно насыщали парами элюэнта в течение 6 ч, а затем хроматографировали восходящим способом. Когда фронт элюэнта проходил 12 см, пластинку вынимали, сушили на воздухе до исчезновения запаха растворителей и рассматривали в видимом и УФ-свете при длине волны 254 нм. В видимом свете обнаружено 5 зон желтого цвета, в УФ-свете они проявляются в виде пятен с синей флуоресценцией. Затем пластинки опрыскивали 0,1%-м раствором ванилина в концентрированной серной кислоте, нагревали 3 мин при 80°C и рассматривали в видимом свете. На хроматограмме обнаружены зоны, для которых значения R_f совпадают с таковыми для рутина ($R_f = 0,31$) и лютеолина ($R_f = 0,85$). Зон, соответствующих кверцетину и лютеолину-7-гликозиду, не обнаружено.

Для количественного определения суммы флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной была изучена возможность использования метода спектрофотометрии. Результаты изучения условий экстракции показывают, что оптимальным условием для выделения суммы флавоноидов из плодов черемухи обыкновен-

ной является двукратная экстракция (по 45 мин) 50%-м этиловым спиртом при соотношении сырья и экстрагента 1:30 (табл. 1).

Изучение УФ-спектров водно-спиртовых экстрактов из плодов черемухи обыкновенной показало, что максимум поглощения наблюдается при длине волны 365 нм. При использовании данной длины волны (прямая спектрофотометрия) сопутствующие вещества влияют на определение оптической плотности, что выражается в завышении результатов анализа. Для решения этой проблемы была использована реакция комплексообразования с раствором $AlCl_3$ – эта реакция является селективной для фенольных соединений и дает bathochromный сдвиг спектра в длинноволновую область, что позволяет отделить флавоноидные соединения [3, 4].

При регистрации спектра поглощения продуктов реакции суммы флавоноидов черемухи обыкновенной с раствором алюминия хлорида величина максимального светопоглощения составляет 414 ± 2 нм. Максимальная оптическая плотность растворов достигается при использовании 5 мл экстракта плодов черемухи и 5 мл 2%-го раствора алюминия хлорида.

С целью выбора аналитической длины волны, т.е. решения узловой проблемы при разработке методики,

были изучены УФ-спектры спиртовых растворов исследуемого экстракта, а также стандартных образцов рутина и лютеолина с добавлением алюминия хлорида. Установлено, что максимумы поглощения окрашенных продуктов реакции суммы флавоноидов черемухи обыкновенной с рутином и лютеолином составляют 412 ± 4 и 392 ± 4 нм соответственно (рисунок). Поэтому в качестве стандартного образца целесообразно использовать рутин. Для предотвращения гидролиза флавоноидов реакцию комплексообразования проводили в присутствии 33%-й уксусной кислоты [5, 6].

При изучении стабильности продуктов реакции суммы флавоноидов черемухи обыкновенной с 2%-м раствором $AlCl_3$ во времени установлено, что оптическая плотность достигает максимума через 30 мин и остается стабильной в течение 8–10 мин.

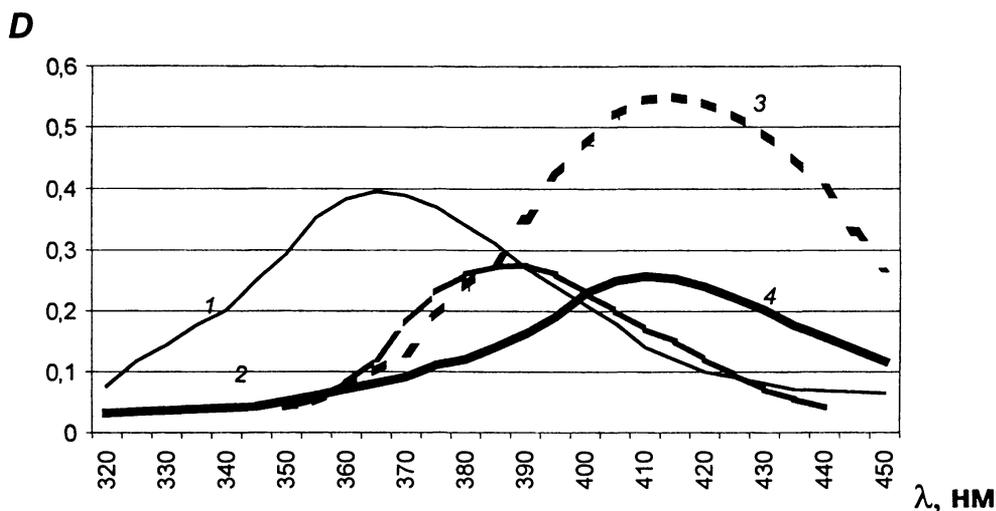
Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной

В круглодонную колбу с притертой пробкой вместимостью 50 мл помещают 5 г (точная навеска) измельченных плодов черемухи обыкновенной (частицы, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм), прибавляют 30 мл 50%-го этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагрева-

Таблица 1

Факторы оказывающие влияние на выход суммы флавоноидов из плодов черемухи обыкновенной

Концентрация этанола, об.%	Соотношение сырья и экстрагента	Кратность экстракции	Продолжительность экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов, %
40	1:20	1	45	1,35
50	1:20	1	45	1,87
70	1:20	1	45	1,69
50	1:30	1	45	2,20
50	1:40	1	45	2,22
50	1:50	1	45	2,23
50	1:30	2	45, 45	2,44
50	1:30	3	45, 45, 45	2,41



Спектры поглощения растворов: 1 – 50% этанольное извлечение из плодов черемухи; 2 – 50% этанольное извлечение из плодов черемухи после взаимодействия с раствором $AlCl_3$ (на фоне извлечения); 3 – стандартный раствор рутина (+ $AlCl_3$ на фоне стандартного раствора рутина); 4 – стандартный раствор лютеолина (+ $AlCl_3$ на фоне стандартного раствора лютеолина)

ют на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Затем экстракт фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в мерную колбу вместимостью 50 мл. Операцию выделения флавоноидов повторяют с 20 мл 50%-го этилового спирта в течение 45 мин. Полученную выжимку фильтруют в ту же колбу и доводят ее объем до метки 50%-м этанолом.

В мерную колбу (25 мл) помещают 5 мл профильтрованного водно-спиртового экстракта из плодов черемухи, добавляют 5 мл 2%-го раствора алюминия хлорида, 0,5 мл 33%-го раствора уксусной кислоты и доводят объем колбы 90%-м этанолом до метки. Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца (PCO) рутина при длине волны 414 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из 5 мл исследуемого экстракта, который помещают в мерную колбу (25 мл), добавляют 0,5 мл 33%-го раствора уксусной кислоты и доводят объем колбы 90%-м этанолом до метки. Одновременно измеряют оптическую плотность PCO рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

Приготовление раствора PCO рутина

0,070 г (точная навеска) PCO рутина, высушенного в течение 3 ч при температуре $135^{\circ}C$, растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96%-го этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл и после охлаждения доводят объем раствора 96%-м этанолом до метки.

Содержание флавоноидов (%) в плодах черемухи вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_x \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m_x \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где D_x – оптическая плотность исследуемого раствора, D_0 – оптическая плотность PCO рутина, m_x – масса сырья (г), m_0 – масса рутина в PCO (г), W – потеря в массе при высушивании (%).

Разработанная методика была апробирована на образцах плодов черемухи обыкновенной. Полученные результаты представлены в табл. 2, из которой видно, что относительная погрешность определения при доверительной вероятности 0,95% не превышает $\pm 5,4\%$

Выводы

Определены оптимальные условия экстракции, позволяющие получить высокий выход веществ флавоноидной природы из плодов черемухи обыкновенной.

Методом ТСХ идентифицированы рутин и лютеолин в плодах черемухи обыкновенной.

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии. Относительная погрешность определения содержания суммы флавоноидов по разработанной методике при доверительной вероятности 95% не превышает $\pm 5,4\%$.

Таблица 2

Результаты количественного определения флавоноидов в плодах чермухи обыкновенной

Номер образца	Добавлено рутина, мг	Найдено флавоноидов в пересчете на рутин	Метрологические характеристики			
			найден рутин, мг	<i>S</i>	Δx	<i>E</i> ,%
1	40	31,7	71,1	0,93	2,8	5,05
2	30	26,4	55,9	1,00	3,0	5,26
3	25	23,2	57,8	1,25	3,8	5,35

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Фадеева Н.В., Рубчевская Л.П., Репях С.М.* // Химия растительного сырья. 1998. № 2. С. 49.
2. *Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D.* // *Fitoterapia*. 2004. 75. N 1. P. 77.
3. *Беликов В.В., Точкова Т.В.* Реакция комплексообразования в анализе флавоноидов. Фенольные соединения и их физиологические свойства. Алма-Ата, 1973. С. 168.
4. *Блажей А., Шутый Л.* Фенольные соединения растительного происхождения. М., 1977.
5. *Гринкевич Н.И., Сафронович Л.Н. и др.* Химический анализ лекарственных растений. М., 1983. С. 130.
6. *Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B.* The systematic identification of flavonoids. N.Y., 1970.

Поступила в редакцию 07.09.04

IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN FRUITS OF A BIRD CHERRY

E.V.Beketov, A.A. Abramov, O.V.Nesterova, S.V. Kondrashev

(Division of Radiochemistry)

Flavonoids composition of bird cherry fruits has been studied by method of thin layer chromatography. Optimal condition were selected and methods of quantitative determination of total amount of flavonoids in fruits of a bird cherry by spectrophotometry was developed.