

Н. К. Жалалова (асп.), С. Р. Хасанова (д.фарм.н., проф.),
Н. В. Кудашкина (д.фарм.н., проф., зав. каф.)

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ПОБЕГАХ *CRATAEGUS ALMAATENSIS POJARK*

Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России,
кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3; тел. (347)2724173, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

N. K. Zhalalova, S. R. Khasanova, N. V. Kudashkina

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN SHOOTS OF *CRATAEGUS ALMAATENSIS POJARK*

Bashkir state medical University of the Ministry of health of the Russian Federation
3, Lenina Str., 450008, Ufa, Russia; ph. (347)2724173, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

Представлена методика определения содержания флавоноидов в *Crataegus almaatensis* *Pojark* с использованием спектрофотометрического метода. Определены оптимальные критерии экстракции, установлено влияние комплексобразующей добавки (хлорида алюминия), его концентрация, время образования комплекса. На основании данных исследований разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* в пересчете на витексин. Концентрация флавоноидов в среднем составила от $1.51 \pm 0.05\%$ до $1.96 \pm 0.019\%$. В проект фармакопейной статьи рекомендовано включить числовой показатель: содержание флавоноидов – не менее 1%.

Ключевые слова: алюминия хлорид; *Crataegus almaatensis*; витексин; гиперозид; количественное определение; разработка методики; рутин; спектрофотометрия; спирт этиловый; флавоноиды.

Флавоноиды являются одной из самых исследуемых групп природных биологически активных веществ. Это связано с их широким спектром биологической активности и практической нетоксичностью данной группы соединений^{1,2}. Данную группу веществ активно изучают в качестве фармакологически активных соединений в медицине. Флавоноидсодержащее растительное сырье – современный источник отечественных эффективных растительных препаратов^{3–6}. Одним из известных примеров являются препараты из боярышника. У

This article describes the development of a method for determining the content of flavonoids in *Crataegus almaatensis* *Pojark*. A spectrophotometric method was used. The best extraction parameters were determined, and the effect of the complexing additive (aluminum chloride), its concentration, and the time of complex formation was determined. Based on these studies, a method for quantifying the amount of flavonoids in *Crataegus almaatensis* shoots in terms of vitexin was developed. The concentration of flavonoids is from $1.51 \pm 0.05\%$ to $1.96 \pm 0.019\%$. It is recommended to include a numerical indicator in the draft Pharmacopoeia article: flavonoid content – at least 1%.

Key words: aluminum chloride; *Crataegus almaatensis*; hyperoside; quantitative determination; ethyl alcohol; method development; rutin; spectrophotometry; flavonoids; vitexin.

них установлены различные виды биологического действия: от кардиотонического до желчегонного и др.^{7–9}. Действие этих препаратов происходит в основном за счет различных флавоноидов (гиперозида, витексина и др.) и тритерпеновых соединений боярышника⁹. В нашей стране в медицине разрешены к применению около 14 видов боярышников, у которых используются в качестве растительного сырья плоды и цветки. За рубежом кроме цветков и плодов используются побеги и листья боярышника. Сырьевая база боярышников не удовлетворяет потребности медицины. По-

Дата поступления 18.11.20

этому исследование новых видов боярышника является актуальным. Одним из перспективных видов является боярышник алма-атинский — *Crataegus almaatensis* Pojark. Для внедрения нового вида сырья необходимо разработать методики их исследования, одной из которых является методика количественного определения фармакологически активной группы веществ. В отечественной нормативной документации сырье боярышника стандартизируют по содержанию флавоноидов¹⁰. Наиболее интересными, на наш взгляд, являются методики, в основе которых лежат широкодоступные аналитические методы, например, спектрофотометрия¹¹. В настоящее время спектрофотометрия является классическим методом количественного определения флавоноидов, основанным на способности флавоноидов образовывать комплексы с различными комплексобразователями.

Цель исследований — разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis*.

Материалы и методы

Объект исследования — побеги *Crataegus almaatensis*, заготовленные с дикорастущих растений на территории Республики Кыргызстан. Побеги представляли собой верхушки ветвей, содержащие зеленые стебли, листья и соцветия. Растительное сырье было собрано в период цветения растения в мае 2016–2018 гг. и высушено с использованием воздушно-теновой сушки.

В основе разрабатываемой методики использован метод дифференциальной спектрофотометрии. При разработке методики изучены параметры экстракции, чтобы определить лучшие условия выделения флавоноидов. В качестве экстрагента использовали этиловый спирт различных концентраций. Так, 1.0 г побегов *Crataegus almaatensis* Pojark, измельченных от 1 до 4.5 мм, заливали 100–200 мл этилового спирта (используемые концентрации — 40, 50, 60, 70, 80, 95 %) и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Время экстракции варьировалось от 15 до 90 мин. Потом извлечение охлаждали и фильтровали через бумажный беззольный фильтр в мерную колбу на 100–200 мл (в зависимости от используемого соотношения) и доводили до метки этиловым спиртом соответствующей концентрации (раствор А).

Также были определены объем комплексобразователя (хлорида алюминия) и опти-

мальное время образования комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия¹². Для приготовления раствора Б 3 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл спиртового раствора алюминия хлорида (концентрацию использовали от 1 до 5 %), 0.1 мл уксусной кислоты 30% и доводили до метки этиловым спиртом 95%. Оптическую плотность измеряли через каждые 10 мин в течение 2 ч при длине волны, при которой наблюдался максимум поглощения.

Для измерений в эксперименте использовался спектрофотометр «SHIMADZU» UV-1800. Измеряли оптическую плотность исследуемых извлечений в диапазоне от 220 до 450 нм. Статистическая обработка выполнялась с использованием с использованием программы «Statistica 10,0» и ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»¹³.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований необходимо было провести выбор основного флавоноида. По различным, в том числе и нашим, исследованиям основными флавоноидами в различных видах рода *Crataegus* L. являются гиперозид, рутин и витексин⁹. Для проведения сравнительного анализа спектров поглощения были измерены УФ-спектры стандартных образцов этих флавоноидов и водно-спиртового извлечения из побегов *Crataegus almaatensis*. При сравнении спектров поглощения выявлено, что УФ-спектр витексина наиболее близок к кривой поглощения водно-спиртового извлечения из побегов *Crataegus almaatensis* (рис. 1). При добавлении спиртового раствора хлорида алюминия максимумы поглощения витексина и флавоноидов побегов *Crataegus almaatensis* коррелировали между собой и составили 396 ± 2 нм (рис. 2).

Поэтому для разработки методики мы использовали стандартный образец витексина. Далее был проведен подбор концентрации экстрагента: наиболее оптимальным с точки зрения скорости и полноты извлечения флавоноидов являются водно-спиртовые смеси¹⁴. Были получены извлечения с использованием водно-спиртовых смесей следующих концентраций от 40 до 95 % и определены их максимумы и минимумы поглощения с комплексобразователем (рис. 3).

На рис. 3 видно, что 70%-ный этиловый спирт извлекает наибольшее количество флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis*, поэтому данная концентрация этилового спирта является наиболее оптимальной.

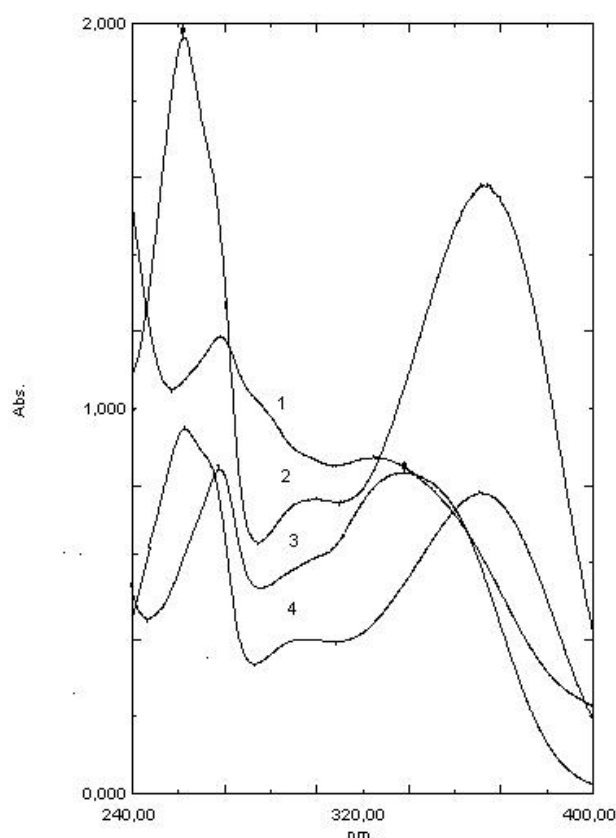


Рис. 1. УФ-спектры исследуемых растворов: 1 – 70% спиртовой экстракт побегов *Crataegus almaatensis*; 2 – гиперозид; 3 – витексин; 4 – рутин

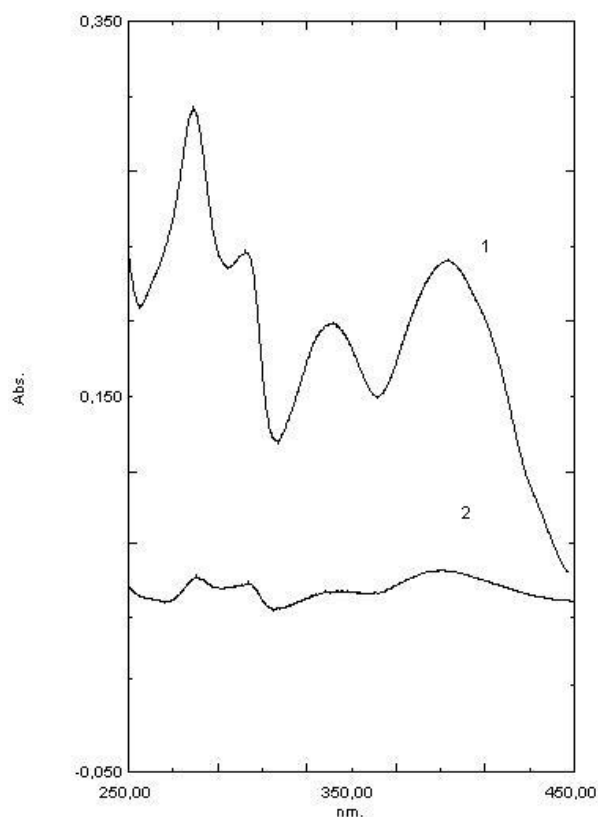


Рис. 2. УФ-спектры извлечения из побегов *Crataegus almaatensis* с добавлением: 1 – 3%-го раствора хлорида алюминия; 2 – раствора витексина с добавлением 3%-го раствора хлорида алюминия

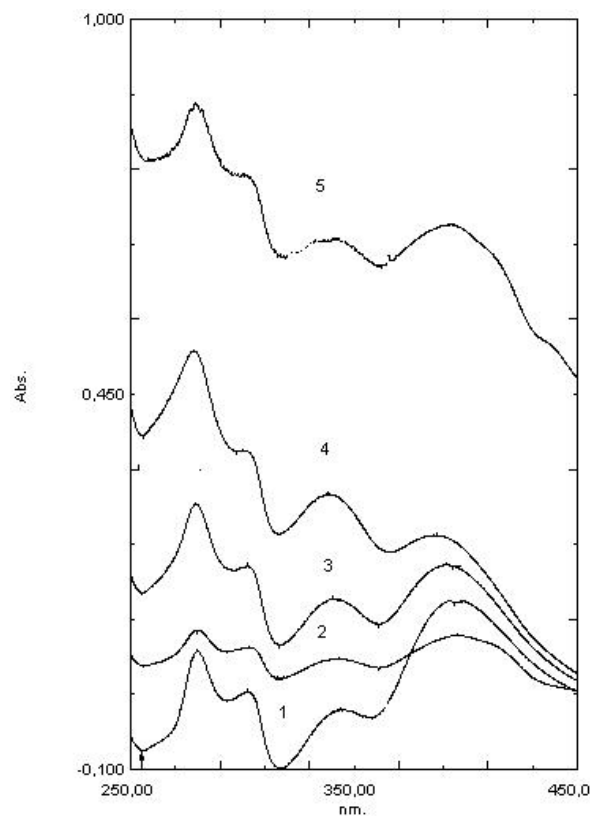


Рис. 3. Спектры поглощения спиртовых экстрактов побегов *Crataegus almaatensis*, полученных на: 1 – 50%; 2 – 95%; 3 – 80%; 4 – 40%; 5 – 70% этиловом спирте с добавлением 3%-го раствора $AlCl_3$

Известно, что измельченность растительного сырья также влияет на процесс экстрагирования⁹. Поэтому следующим этапом было определение данного показателя. По данным табл. 1 видно, что самая высокая концентрация наблюдается при использовании сырья с измельчением до 1 мм.

Таблица 1
Содержание флавоноидов в зависимости от измельченности сырья

Степень измельчения сырья	Содержание флавоноидов, %
1 мм	1.11 ± 0.027
2 мм	0.66 ± 0.011
3 мм	0.75 ± 0.013
4.5 мм	0.74 ± 0.016

Далее изучали влияние времени экстракции на содержание флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* (табл. 2), что оптимальным временем экстракции флавоноидов является 45 мин.

В нормативных документах на растительное сырье в методиках количественного определения используются обычно от одно- до трехкратной экстракции¹⁰. Поэтому исследовано также влияние кратности экстракции на выход флавоноидов (табл. 3). Оказалось, что

увеличение кратности экстракции не влияет на выход флавоноидов.

Таблица 2

Содержание флавоноидов в зависимости от времени экстракции

Время экстракции, мин	Содержание флавоноидов, %
15 мин	0.83 ± 0.012
30 мин	0.85 ± 0.036
45 мин	1.11 ± 0.057
60 мин	0.84 ± 0.050
90 мин	0.65 ± 0.027

Таблица 3

Содержание флавоноидов в зависимости от кратности экстракции

Кратность экстракции	Содержание флавоноидов %
Однократная	1.11 ± 0.057
Двукратная	1.16 ± 0.027
трехкратная	1.18 ± 0.048

Далее изучено влияние различных параметров использования комплексообразователя. При изучении различных концентраций комплексообразователя (от 1 до 5 %), оказалось, что наиболее оптимальным является 2% спиртовой раствор хлорида алюминия (рис.4).

На следующем этапе изучалось влияние времени продолжительности комплекса между хлоридом алюминия и флавоноидами *Crataegus almaatensis* на оптическую плотность раствора (рис. 5).

Оказалось, что оптическая плотность у исследуемого раствора стала наибольшей через 0.5 ч и продолжительность комплекса составила 1,5 ч (рис. 5).

На основании проведенных исследований предлагаются следующие параметры количе-

ственного определения флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* (табл.4.).

Расчет содержания суммы флавоноидов (X) в пересчете на витексин и абсолютно сухое сырье (в%) предлагается проводить по формулам (1) и (2):

1. При использовании стандартного образца витексина

$$X = \frac{D \cdot 200 \cdot C_0 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 3(100 - W)}, \quad (1)$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО витексина;

C_0 – содержание витексина в спектрофотометрируемой пробе, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

2. При использовании удельного показателя поглощения витексина

$$X = \frac{D \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100}{\varepsilon \cdot m \cdot 3(100 - W)}, \quad (2)$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора;

ε – удельный показатель поглощения витексина с хлоридом алюминия, равный 450;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Были проведены измерения с использованием разработанной методики в пяти сериях опытов по 5 образцов в каждой. На основании данных измерений представлена метрологическая характеристика методики (табл. 5). Согласно полученным данным ошибка эксперимента не превышает 5%, что говорит о достоверности результатов полученных исследований.

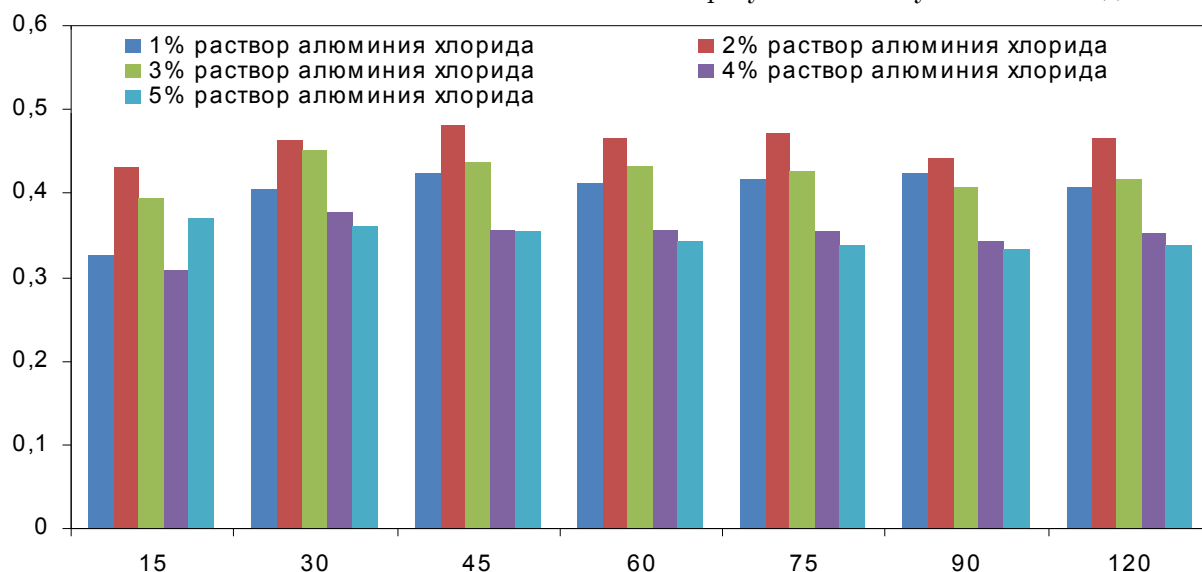


Рис. 4. Влияние концентрации хлорида алюминия на оптическую плотность

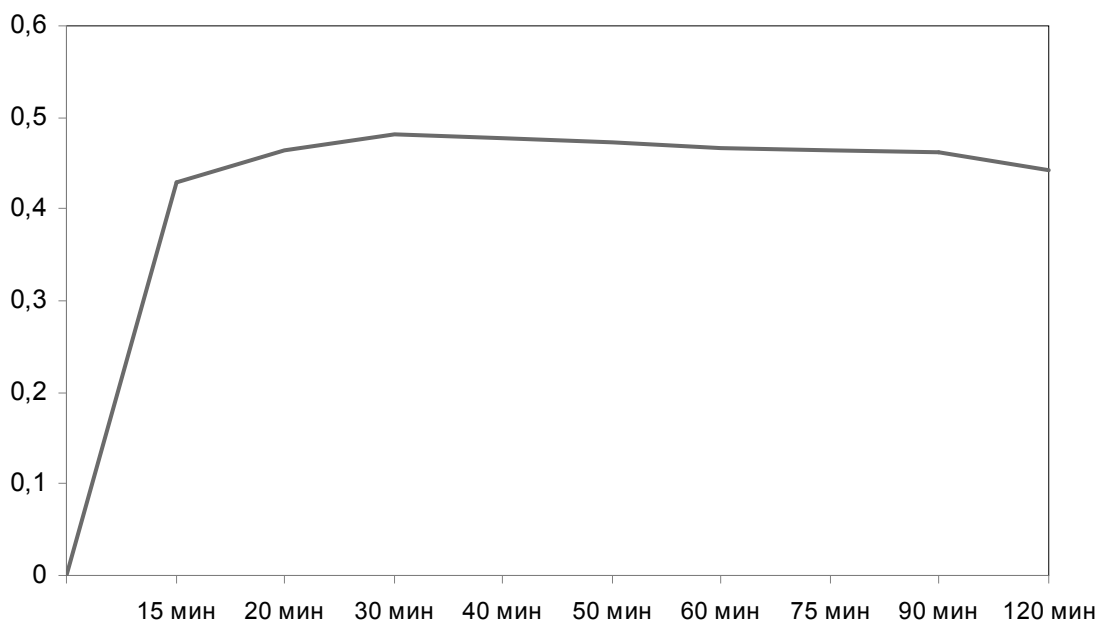


Рис. 5. Время образования и продолжительность комплекса флавоноидов с комплексообразователем

Таблица 4

Оптимальные условия количественного определения

Показатель	Оптимальные условия
Длина волны	396 нм
Экстрагент	70 % эт.с.
Измельченность	1 мм
Соотношение сырья и экстрагента	1:200
Время экстракции	45 мин
Кратность экстракции	1
Концентрация алюминия хлорида	2%
Количество раствора А для приготовления раствора Б	3 мл
Количество 30% уксусной кислоты для подкисления раствора Б и раствора сравнения	0.1 мл
Удельный показатель СО (витексина)	450
Количество 2% алюминия хлорида	2 мл
Минимальное время реакции образования комплекса	30 мин

Таблица 5

Метрологическая характеристика

Серия	N	$\bar{X}$	p	t(p,f)	S	S ²	S _x	E _δ	E, %
1	5	1.51	95	2.78	0.055	0.0031	0.0200	0.050	3.29
2	5	1.81	95	2.78	0.046	0.0022	0.0205	0.050	2.70
3	5	1.96	95	2.78	0.017	0.0003	0.0070	0.019	0.96
4	5	1.76	95	2.78	0.017	0.0003	0.0077	0.021	1.18
5	5	1.87	95	2.78	0.004	0.0640	0.0200	0.050	2.66

Содержание флавоноидов в пересчете на витексин в пяти сериях в среднем составило от $1.51 \pm 0.05\%$ и до $1.96 \pm 0.019\%$.

Таким образом, нами изучены параметры экстрагирования флавоноидов и определены оптимальные условия проведения количественного определения данной группы соединений из побегов *Crataegus almaatensis*. Установлено, что наилучшим экстрагентом является 70% этиловый спирт, основным флавоноидом — витексин; оптимальное время экстракции —

45 мин, измельчение сырья — 1 мм, соотношение — 1:200; оптимальная концентрация хлорида алюминия — 2%, время образования комплекса — 30 мин.

На основании исследований разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на витексин и предложены нормы содержания суммы флавоноидов в побегах *Crataegus almaatensis* в пересчете на витексин — «не менее 1%» для включения в проект ФС.

Литература

1. Корулькин Д.Ю. Абилов Ж.А., Муzychкина Р.А., Толстикова Г.А. Природные флавоноиды.— Новосибирск: Академ.изд-во «Гео», 2007.— 232 с.
2. Тараховский Ю.С. Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина.— Пушкино: Synchronobook, 2013.— 310 с.
3. Куркин В.А., Авдеева Е.В., Куркина А.В., Правдивцева О.Е., Браславский В.Б., Егоров М.В., Рыжов В.М., Фенольные соединения как критерий подлинности и качества лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов // Традиционная медицина.— 2014.— №4.— С.39-42.
4. Куркин В.А., Куркина А.В., Авдеева Е.В. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений // Фундаментальные исследования.— 2013.— №11.— С.1897-907.
5. Сараф А.С., Оганесян Э.Т. Флавоноиды - как потенциальные противоаллергические соединения (обзор) // Химико-фармацевтический журнал.— 1991.— Т.25, №2.— С.4-8.
6. Сухомлинов Ю.А. Покровский М.В., Конопля А.И. Исследование влияния дигидрокверцетина и настоев цветков лабазника шестилепестного на функциональное состояние миокарда крыс в условиях моделирования эмоционально-иммобилизационного стресса // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.— 2005.— №2.— С.209-213.
7. Ляхова Н.С., Арлът А.В., Ивашев М.Н., Влияние фракций из плодов боярышника на мозговую кровоток / Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сборник научных трудов.— Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2005.— С.378-379.
8. Трофимова, С.В. Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Басченко Н.Ж., Сапожникова Т.А., Хисматуллина Р.Ю. Изучение антиаритмической активности листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) // Медицинский вестник Башкортостана.— 2011.— Т.6, №2.— С.299-302.
9. Трофимова С.В. Фармакогностические изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана: дисс. ... канд.фарм.наук.— Пермь, 2014.— 165 с.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том IV. 7019 с. /http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php.
11. Основы аналитической химии/Под ред. Ю.А. Золотова.— М.: Высшая школа, 2002.— 494 с.
12. Потанина А.П., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В. Разработка методики количественного определения флавоноидов в растительном сборе «Кардиофит» // Баш. хим. ж.— 2013.— Т.20, №3.— С.60-62.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том I. 1814 с. /http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php.
14. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья.— 2004.— №1.— С.47-52.

References

1. Korul'kin D.Yu. Abilov Zh.A., Muzychkina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnyye flavonoidy* [Natural flavonoids]. Novosibirsk, «Geo» Publ., 2007, 232 p.
2. Tarakhovskiy Yu.S. Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov Ye.N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina* [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino, Synchronobook Publ., 2013, 310 p.
3. Kurkin V.A., Avdeyeva Ye.V., Kurkina A.V., Pravdivtseva O.Ye., Braslavskiy V.B., Yegorov M.V., Ryzhov V.M., *Fenol'nyye soyedineniya kak kriteriy podlinnosti i kachestva lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i fitopreparatov* [Phenolic compounds as a criterion of the authenticity and quality of a medicinal herbal raw materials and phytopreparations] *Traditsionnaya meditsina* [Traditional medicine], 2014, no.4, pp.39-42.
4. Kurkin V.A., Kurkina A.V., Avdeyeva Ye.V. *Flavonoidy kak biologicheski aktivnyye soyedineniya lekarstvennykh rasteniy* [Flavonoids as biologically active compounds of medicinal plants] *Fundamental'nyye issledovaniya* [Fundamental research], 2013, no.11, pp.1897-907.
5. Saraf A.S., Oganesyana E.T. [Flavonoids as potential antiallergic compounds (review)]. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1991, vol.25, no.2, pp.65-71.
6. Sukhomlinov YU.A. Pokrovskiy M.V., Konoplya A.I. *Issledovaniye vliyaniya digidrokvertsetina i nastoya tsvetkov labaznika shestilepestnogo na funktsional'noye sostoyaniye miokarda krysa v usloviyakh modelirovaniya emotsional'no-immobilizatsionnogo stressa* [Investigation of the effect of dihydroquercetin and infusion of six-petalled meadowsweet flowers on the functional state of the rat myocardium under the conditions of modeling emotional-immobilization stress]. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya* [Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy], 2005, no.2, pp.209-213.
7. Lyakhova N.S., Arl't A.V., Ivashev M.N., *Vliyaniye fraktsiy iz plodov boyaryshnika na mozgovoy krovotok* [Influence of fractions from hawthorn fruits on cerebral blood flow]. *Razrabotka, issledovaniye i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii. Sbornik nauchnykh trudov* [Development, research and marketing of new pharmaceutical products. Collection of scientific papers]. Pyatigorsk, Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy Publ., 2005, S.378-379.
8. Trofimova, S.V. Khasanova S.R., Kudashkina N.V., Baschenko N.Zh., Sapozhnikova T.A., Khismatullina R.Yu. *Izucheniye antiaritmicheskoy aktivnosti list'yev Crataegus sanguinea (Rosaceae)* [Study of antiarrhythmic activity of leaves of *Crataegus sanguinea* (Rosaceae)]. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana* [// Medical Bulletin of Bashkortostan], 2011, vol.6, no.2, pp.299-302.

9. Trofimova S.V. *Farmakognosticheskiye izucheniye list'yev boyaryshnika krovavokrasnogo Srataegus sanguinea Pall. iz flory Bashkortostana* [Pharmacognostic study of blood-red hawthorn leaves *Crataegus sanguinea* Pall. from the flora of Bashkortostan]. Diss. Cand. of Pharm. Sci., Perm', 2014, 165 p.
10. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition.]. Vol.IV, 7019 p. / <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
11. *Osnovy analiticheskoy khimii* [Fundamentals of analytical chemistry]. Ed. Yu.A. Zolotov. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2002, 494 p.
12. Potanina A.P., Khasanova S.R., Kudashkina N.V. *Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v rastitel'nom sbore «Kardiofit»* [Development of a method for the quantitative determination of flavonoids in the herbal collection «Cardiophyte»] *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 20136 vol.20, no.3, pp.60-62.
13. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition.]. Vol. I, 1814 p. / <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
14. Lobanova A.A., Budayeva V.V., Sakovich G.V. *Issledovaniye biologicheskii aktivnykh flavonoidov v ekstraktakh iz rastitel'nogo syr'ya* [Investigation of biologically active flavonoids in extracts from plant raw materials] *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw materials], 2004, no.1, pp.47-52.