

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 615.322

© Коллектив авторов, 2022

Э.Х. Галияхметова, А.А. Низамова, Н.В. Кудашкина,
С.Р. Хасанова, П.А. Андреева, Р.Р. Галияхметова, Э.Р. Хакимова
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM**
ГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа

Статья посвящена разработке методики количественного определения флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino спектрофотометрическим методом в пересчёте на рутин. Сырье гиностеммы пятилистной заготавливали на экспериментальных участках на протяжении нескольких лет.

Предварительные спектральные исследования водно-спиртовых извлечений из травы *Gynostemma pentaphyllum* на 70% спирте этиловом показали максимумы поглощения близкие максимумам поглощения рутина. Поэтому при количественном анализе флавоноидов в гиностемме пересчёт вели на рутин.

При разработке методики подбирали основные условия экстрагирования: вид экстрагента, соотношение массы сырья и объема экстрагента, степень измельчения сырья, кратность и время экстракции. Изучали условия проведения анализа: объем алюминия хлорида спиртового раствора, время реакции и устойчивость комплекса.

Согласно полученным результатам содержание флавоноидов в изучаемом сырье составило $3,76 \pm 0,04\%$. В нормативный документ на сырье *Gynostemma pentaphyllum* предлагается включить разработанную методику с показателем качества – содержание суммы флавоноидов не менее 2%.

Ключевые слова: сырье *Gynostemma pentaphyllum*, гиностемма пятилистная, рутин, флавоноиды, алюминия хлорид, спектрофотометрия.

E.Kh. Galiakhmetova, A.A. Nizamova, N.V. Kudashkina,
S.R. Khasanova, P.A. Andreeva, R.R. Galiakhmetova, E.R. Khakimova
**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF
FLAVONOIDS IN THE HERB OF GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM**

The article is devoted to the development of a technique for the quantitative determination of flavonoids in the herb of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by the spectrophotometric method in terms of rutin. The raw materials of the *Gynostemma pentaphyllum* were harvested at experimental sites for several years.

Preliminary spectral studies of water-alcohol extracts from the herb *Gynostemma pentaphyllum* on 70% ethyl alcohol showed absorption maxima close to the absorption maxima of rutin. Therefore, in the quantitative analysis of flavonoids in the gynostemma, the conversion was carried out to rutin.

When developing the technique, the main extraction conditions were selected: the type of extractant, the ratio of the mass of the raw material and the volume of the extractant, the degree of grinding of the raw material, the multiplicity and time of extraction. The conditions of the analysis were also investigated: the volume of aluminum chloride alcohol solution, reaction time and stability of the complex.

According to the results obtained, the content of flavonoids in the studied raw materials was $3.76 \pm 0.04\%$. It is proposed to include in the regulatory document for *Gynostemma pentaphyllum* raw materials the developed methodology with a quality indicator – the content of the sum of flavonoids is not less than 2%.

Key words: raw materials *Gynostemma pentaphyllum*, rutin, flavonoids, aluminum chloride, spectrophotometry.

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino, сем. Cucurbitaceae или Цзяо-гу-лан (китайское название), многолетняя травянистая листопадная лиана, которая применяется в качестве монотерапии и в комбинации с лекарственными препаратами в традиционной китайской медицине [8,9]. В информационно-литературных источниках приводятся сведения о противомикробных, противораковых, антивозрастных, антиастенических, гиполипидемических, противоязвенных и других свойствах растения. Фармакологические эффекты гиностеммы обосновываются содержанием нескольких функциональных компонентов, таких как сапонины (фанолизид, гиносапонины TN-1, TN-2; гипенозиды I-LXXXVIII) и флавоноиды (рутин, кверцетин, омбуозид,

омбуин, изорамнетин, витексин) [1,5,6,7,10,11,12]. *Gynostemma pentaphyllum* наиболее распространена в Индии, Непале, Бангладеш, Шри-Ланка, Лаосе, Мьянме, Корее и Японии [8].

В России гиностемма пятилистная произрастает на Дальнем Востоке на территории острова Кунашир. Она занесена в Красную книгу Сахалинской области и рекомендована к охране, так как находится под угрозой исчезновения [3]. Предотвращение вымирания столь уникального вида лекарственного растения может быть достигнуто путем интродукции. Гиностемма пятилистная, адаптированная к условиям Республики Башкортостан, дает достаточное количество сырья за один вегетационный период и тем самым представляет научно-

практический интерес. На новое малоизученное лекарственное растение необходимо разработать нормативный документ, регламентирующий качество сырья на биоактивные соединения для того, чтобы внедрить в медицину.

Целью исследования явилась разработка методики количественного определения флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum*, выращенной в условиях Республики Башкортостан.

Материал и методы

Материалом экспериментальных исследований явилась гиностемма пятилистная – интродуцированное многолетнее травянистое растение со стелющимся стеблем длиной 1-3 м. Траву *Gynostemma pentaphyllum* заготавливали на экспериментальных участках Ботанического сада-института Уфимского научного центра Российской академии наук и кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России в течение 2017-2020 гг. в фазу цветения.

Сырье *Gynostemma pentaphyllum* представляет собой зеленые части стеблей, несущие простые глубоко пальчато-рассеченные листья; усики, раздвоенные на концах и цветки в кистевидных соцветиях. В эксперименте проанализировано 4 образца травы *G. pentaphyllum*.

Качественный спектральный анализ в диапазоне длин волн 250-450 нм применяли для установления стандартного соединения, на которое в дальнейшем при разработке методики количественного анализа флавоноидов гиностеммы будем производить пересчет.

В основе количественного определения флавоноидов использовали спектрофотометрический метод Беликова В.В. в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях спектра [4]. Для этого аналитические пробы травы *Gynostemma pentaphyllum* 0,5; 1,0 и 2,0 г со степенью измельчения 0,5; 2; 3; 4 мм помещали в колбы, прибавляли по 100 мл экстрагента (спирт этиловый 30%, 70% и 95%). Колбы присоединяли к спиральным холодильникам и экстрагировали одно- и двукратно на кипящей водяной бане в течение 30, 50, 60 мин. Затем колбы с извлечениями охлаждали, доводили до первоначального объема соответствующим экстрагентом и фильтровали через обеззоленные фильтры в колбы 200 мл (испытуемый раствор А).

Затем в колбы 25 мл помещали испытуемые растворы А, определенный объем алюминия хлорида спиртового раствора 5% – 1, 2, 4 мл, доводили до метки спиртом этиловым 70% и подбирали оптимальное время реакции комплексообразования – 20, 30, 45 мин (рас-

твор В). В качестве растворов сравнения использовали подкисленные испытуемые растворы 0,1 мл уксусной кислоты, разведенной до 30%. Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность 1 мл 0,1% раствора стандартного образца (СО) рутина.

Содержание суммы флавоноидов (Х) в пересчете на рутин в % рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_1 \times C_0 \times V_1 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times V_2 \times (100 - W)}$$

A_1 – оптическая плотность раствора Б;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;

a_1 – навеска сырья, г;

C_0 – содержание рутина в пересчете на сухое вещество, г;

V_1 – объем экстракта (100 мл);

V_2 – объем аликвоты экстракта;

W – влажность сырья, %.

Измерения проводили на спектрофотометре модели SHIMADZU UV-1800 при длине волны 412 нм. Экспериментальные данные исследования подвергали математической обработке по методикам ГФ XIV и программам обеспечения в компьютере [2].

Результаты и обсуждение

При качественном спектральном анализе в УФ и видимой областях исследовали спектры водно-спиртового извлечения на 70% спирте этиловом из травы *Gynostemma pentaphyllum* и растворов стандартных образцов (СО) кверцетина, рутина, гиперозида и витексина с комплексообразующей добавкой (см. рисунок). На спектре наблюдали максимумы поглощения ($\lambda_{\max}$) 412, 277, 237 нм близкие к максимумам поглощения рутина.

При разработке методики количественного содержания суммы флавоноидов в пробах определяли по вышеуказанной формуле в пересчете на рутин.

Далее подбирали альтернативные условия для полноты извлечения флавоноидов из сырья *Gynostemma pentaphyllum* (табл. 1).

Из полученных экспериментальных данных следует, что максимальный выход флавоноидов из травы *Gynostemma pentaphyllum* наблюдается при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70% с однократной экстракцией в течение 50 мин, при соотношении массы сырья и объема экстрагента 1:100 со степенью измельченности сырья 3,0 мм.

Экспериментальные значения выбора двукратной экстракции получились статистически незначимыми, что указывает на полноту извлечения флавоноидов из травы

Gynostemma pentaphyllum при однократной. Поэтому для проведения анализа была выбрана однократная экстракция.

При установлении условий проведения анализа выяснилось, что оптимальное количе-

ство алюминия хлорида спиртового раствора 5% составляет 2 мл, время комплексообразования – 30 минут (табл. 2). Комплекс флавоноидов сохраняет свою стабильность в течение полутора часов.

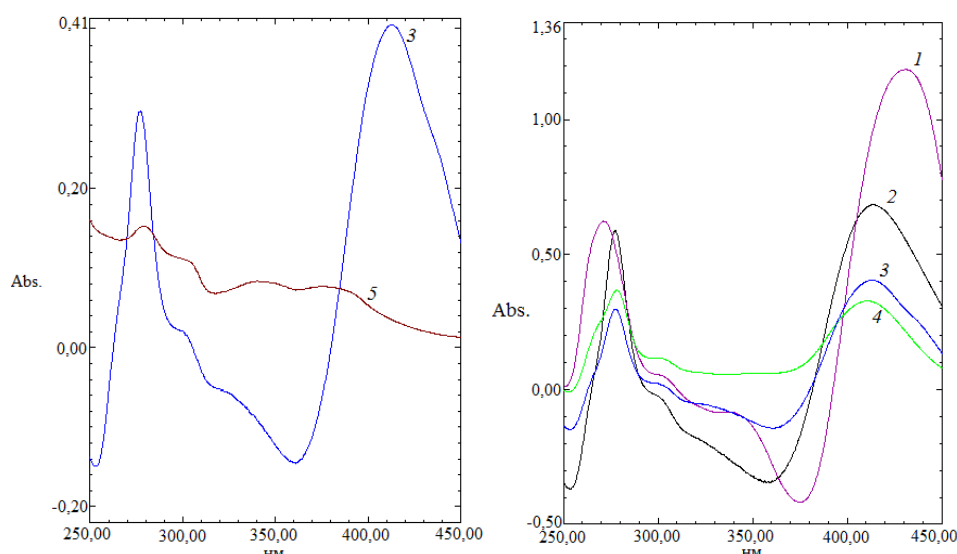


Рис. Спектры поглощения исследуемых растворов с добавлением алюминия хлорида: 1 – раствор СО кверцетина ($\lambda_{\max}=430, 337, 271$); 2 – раствор СО рутина ($\lambda_{\max}=412, 277, 235$); 3 – водно-спиртовое извлечение из *G. pentaphyllum* ($\lambda_{\max}=412, 277, 237$); 4 – раствор СО гиперозида ($\lambda_{\max}=396, 340, 279$); 5 – раствор СО витексина ($\lambda_{\max}=396, 340, 279$)

Таблица 1

Влияние факторов на выход флавоноидов из травы <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (N=6)			
Факторы	Содержание суммы флавоноидов, %	Факторы	Содержание суммы флавоноидов, %
Экстрагент		Соотношение сырье-экстрагент	
30	0,26±0,01	0,5:100	2,29±0,11
70	1,53±0,07	1:100	2,47±0,13
95	1,33±0,07	2:100	2,33±0,12
Степень измельченности, мм		Время экстракции, мин	
0,5	1,33±0,06	30	2,47±0,12
2	1,53±0,07	50	3,29±0,16
3	2,47±0,13	60	2,84±0,11
4	2,35±0,11		
Кратность экстракции			
Однократная		3,76±0,04	
Двукратная		3,80±0,05	

Таблица 2

Влияние алюминия хлорида на содержание флавоноидов в извлечениях из травы <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (N=6)			
Факторы	Содержание суммы флавоноидов, %	Факторы	Содержание суммы флавоноидов, %
Количество алюминия хлорида спиртового раствора 5%		Время реакции с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида, мин	
1	3,69±0,02	20	3,25±0,16
2	3,76±0,04	30	3,76±0,04
4	3,64±0,18	45	2,98±0,09

Также нами были проведены исследования по влиянию подкисления среды (испытуемого раствора и раствора сравнения или только раствора сравнения) на анализ и устойчивость комплекса. Оказалось, что в опытах с подкислением и без подкисления испытуемого раствора не выявлено никакой зависимости влияния уксусной кислоты на выход флавоноидов и устойчивость комплекса. В итоге подкисление проводили только в растворе сравнения.

Количественные измерения разработанной методики проводили в трех сериях в шести повторностях, результаты которых отражены в табл. 3.

Из результатов проведенных исследований следует, что сумма флавоноидов в пересчете на рутин в траве *Gynostemma pentaphyllum* колеблется от 3,72±0,06 до 3,76±0,04%. Относительная ошибка результатов не превышает 5%, что говорит о надежности разработанной методики.

Результаты определения содержания суммы флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum*

№ серии	Среднее значение суммы флавоноидов, %	Метрологические характеристики
1	3,76	$f = 5$ $S_y = 0,01402$ $\varepsilon\alpha = 0,04$ $\varepsilon_{отн} = 0,96$
2	3,76	$f = 5$ $S_y = 0,01402$ $\varepsilon\alpha = 0,04$ $\varepsilon_{отн} = 0,96$
3	3,72	$f = 5$ $S_y = 0,02569$ $\varepsilon\alpha = 0,06$ $\varepsilon_{отн} = 1,77$

Выводы

1. На основании полученных результатов разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве гиностеммы пятилистной в пересчете на рутин, которая легко доступна, не трудоемка и не требует дорогих реактивов.

2. Содержание флавоноидов в траве *Gynostemma pentaphyllum* колеблется от $3,72 \pm 0,06$ до $3,76 \pm 0,04\%$, что позволяет включить разработанную методику с нормой содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2% в проект фармакопейной статьи «Гиностеммы пятилистной трава».

Сведения об авторах статьи:

Галияхметова Эльвира Халитовна – к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: galiahmetova.elvi@yandex.ru.

Низамова Альфина Ансафовна – ассистент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: alfinanizamova@bk.ru.

Кудашкина Наталья Владимировна – д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. Email: phytoart@mail.ru.

Хасанова Светлана Рашитовна – д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: svetkhasanova@yandex.ru.

Андреева Полина Анатольевна – студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: farmakognosia@yandex.ru.

Галияхметова Рената Ринатовна – студентка 1 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: farmakognosia@yandex.ru.

Хакимова Элина Рустэмовна – студентка 4 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: farmakognosia@yandex.ru.

ЛИТЕРАТУРА

- Беленовская, Л.М. *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): компонентный состав и биологическая активность / Л.М. Беленовская, А.Л. Буданцев, Н.В. Битюкова // Растительные ресурсы. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 443-495.
- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс] // Федеральная электронная медицинская библиотека. 2018. URL: <http://www.femb.ru> (дата обращения: 10.12.21).
- Еремич, В.М. Красная книга Сахалинской области: растения и грибы / В. М. Еремич. – Кемерово, 2019. – 354 с.
- Пат. SU 1 507 394 A1 СССР, МПК А 61 К 35/78. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье / В.В. Беликов, Н.Т. Колесник; заявитель и патентообладатель Всесоюзный научно-исследовательский институт химии и технологии лекарственных средств – № 4301201/28-14; заявл. 25.08.1987; опубл. 15.09.1989, Бюл. № 34.
- Gypenosides induce cell death and alter gene expression in human oral cancer HSC-3 cells / K.-W. Lu, Y.-S. Ma, F.-S. Yu [et al.] // Experimental and therapeutic medicine. – 2017. – Vol. 14, № 3. – P. 2469-2476.
- Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography–mass spectrometry / T.H. Kao, S.C. Huang, B. Stephen Inbaraj, B.H. Che // Analytica chimica acta. – 2008. – Vol. 626, № 2. – P. 200-211.
- Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* / V. Razmovski-Naumovski, T.H. Huang, V.H. Tran [et al.] // Phytochemistry Reviews. – 2005. – Vol. 4, № 3. – P. 197-219.
- Effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino polysaccharides supplementation on exercise tolerance and oxidative stress induced by exhaustive exercise in rats / H. Wang, C. Li, X. Wu, X. Lou // African Journal of Agricultural Research. – 2012. – Vol. 7, № 17. – P. 2632-2638.
- Navratilova, Z. *Gynostemma pentaphyllum* – obsahové látky a léčivé účinky / Z. Navratilova // Praktické lékařství. – 2017. – Vol. 13, № 3. P. 116–118.
- Lipid-lowering, hepatoprotective, and atheroprotective effects of the mixture Hong-Qu and gypenosides in hyperlipidemia with NAFLD rats / S. Gou, H.-F. Huang, X.-Y. Chen [et al.] // Chinese Medical Association. – 2016. – Vol. 79, № 3. – P. 111-121.
- Hypoglycemic effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins by enhancing the Nrf2 signaling pathway in STZ-inducing diabetic rats / D. Gao, M. Zhao, X. Qi [et al.] // Archivars of pharmacological research. – 2016. – Vol. 39, № 2. – P. 221-230.
- Phytopreventative effects of *Gynostemma pentaphyllum* against acute indomethacin-induced gastrointestinal and renal toxicity in rats / C. Hesse, V. Razmovski-Naumovski, C. C. Duke [et al.] // Phytotherapy research. – 2007. – Vol. 11, № 6. – P. 523-530.

REFERENCES

- Belenovskaya L.M., Budantsev A.L., Bitjukova N.V. *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): component composition and biological activity. Rastitelnye resursy. 2018; 54(4): 443-495. (In English).

2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV Edition: Scientific Center for Expertise of Medical Devices. Link: Available from URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (as of December 10, 2021). (In English).
3. Eremin V.M. Krasnaya kniga Sahalinskoj oblasti: rasteniya i griby. Kemerovo. 2019: 354. (In Russ).
4. Pat. SU 1 507 394 A1 SSSR, MPK A 61 K 35/78. Sposob kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v rastitel'nom syr'e / V.V. Belikov, N.T. Kolesnik; zayavitel' i patentoobladatel' Vsesoyuznyj nauchno-issledovatel'skij institut himii i tekhnologii lekarstvennyh sredstv – № 4301201/28-14; zayavl. 25.08.1987; opubl. 15.09.1989, Byul. № 34. (In Russ).
5. Gypenosides induce cell death and alter gene expression in human oral cancer HSC-3 cells / K.-W. Lu, Y.-S. Ma, F.-S. Yu [et al.] // Experimental and therapeutic medicine. 2017; 14 (3): 2469-2476. (In English).
6. Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry / T.H. Kao, S.C. Huang, B. Stephen Inbaraj, B.H. Che // Analytica chimica acta. 2008; 626 (2): 200-211. (In English).
7. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* / V. Razmovski-Naumovski, T.H. Huang, V.H. Tran [et al.] // Phytochemistry Reviews. 2005; 4 (3): 197-219. (In English).
8. Effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino polysaccharides supplementation on exercise tolerance and oxidative stress induced by exhaustive exercise in rats / H. Wang, C. Li, X. Wu, X. Lou // African Journal of Agricultural Research. 2012; 7 (17): 2632-2638. (In English).
9. Navratilova, Z. *Gynostemma pentaphyllum* – obsahové latky a léčivé účinky / Z. Navratilova // Praktické lékařství. – 2017. – Vol. 13, № 3. P. 116–118.
10. Lipid-lowering, hepatoprotective, and atheroprotective effects of the mixture Hong-Qu and gypenosides in hyperlipidemia with NAFLD rats / S. Gou, H.-F. Huang, X.-Y. Chen [et al.] // Chinese Medical Association. 2016; 79 (3): 111-121. (In English).
11. Hypoglycemic effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins by enhancing the Nrf2 signaling pathway in STZ-inducing diabetic rats / D. Gao, M. Zhao, X. Qi [et al.] // Archivars of pharmacal research. 2016; 39 (2): 221-230. (In English).
12. Phytopreventative effects of *Gynostemma pentaphyllum* against acute indomethacin-induced gastrointestinal and renal toxicity in rats / C. Hesse, V. Razmovski-Naumovski, C. C. Duke [et al.] // Phytotherapy research. 2007; 11 (6): 523-530. (In English).