

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ДЕВЯСИЛА БРИТАНСКОГО

А. В. Яницкая, И. Ю. Митрофанова

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакогнозии и ботаники*

Проанализированы различные методы экстракции травы девясила британского и как наиболее оптимальный для данного вида сырья выбран метод экстракции с последовательной сменой этанола (96 %, 70 % и 40 %), который позволяет наиболее полно извлекать флавоноиды. Предложена методика, которая позволяет определять содержание суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин) в траве девясила британского в присутствии других соединений, проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. Полученные данные свидетельствуют, что содержание флавоноидов в траве девясила британского, произрастающего в Волгоградской области, по результатам данной методики, составляет $(0,94 \pm 0,003) \%$. Проведенная валидационная оценка свидетельствует о ее пригодности для контроля качества исследуемого сырья.

Ключевые слова: флавоноиды, девясил британский, лютеолин, спектрофотометрия.

DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE METHOD OF FLAVONOIDE DETERMINATION IN *INULA BRITANNICA* HERB

A. V. Yanitskaya, I. Yu. Mitrofanova

Different extraction methods were analyzed. Extraction with ethanol gradual alternation was chosen as more optimal. A technique of quantifying the flavonoids equivalent to luteolin in *Inula britannica* herb was suggested. It allows a determination of the flavonoid quantitative order in the presence of other compounds; it does not require any expensive equipment, and it is simple in use. The flavonoid content in *Inula britannica* herb, which grows in the Volgograd region, was $(0,94 \pm 0,003) \%$. Validation proved that the proposed technique can be used for quality control of studied herbal raw material.

Key words: flavonoids, *Inula britannica*, luteolin, spectrophotometry.

Девясил британский (*Inula britannica* L) сем. астровые (*Asteraceae*) — двулетнее или многолетнее травянистое растение от 15 до 75 см в высоту [7]. Стебель прямостоячий, ребристый, простой или в верхней части ветвистый, в нижней иногда красноватый, густо покрыт прижатыми волосками [9]. Листья ланцетные, эллиптические, острые, цельнокрайние или рассеянно-мелкозубчатые, по краям с короткими шипиками, сверху голые или рассеянно-волосистые, снизу — густо-мелкожелезистые и мягко-шерстистые от прижатых волосков. Нижние листья длинночерешковые, средние и верхние — сидячие, с сердцевидным стеблеобъемлющим основанием [8]. Цветочные корзинки золотисто-желтые, гетерогамные, от средних до крупных (2—5 см в поперечнике), одиночные или собраны по 2—3. Основу корзинки образует общее цветоложе, которое окружено оберткой из видоизмененных верховых листьев. Индивидуальные цветки окружены хохолком из тонких волосков [7]. Ложноязычковые цветки трехзубчатые. Язычки и зубчики трубчатых цветков снаружи густо покрыты золотистыми железками [9]. Плод — голая ребристая семянка цилиндрической формы светло-коричневого цвета с хохолком [6, 7].

В России распространен на юге европейской части, на Северном Кавказе и в Западной Сибири. В Средней России встречается в черноземной полосе [6].

Надземная часть девясила британского содержит 0,008—0,1 % эфирного масла, в состав которого вхо-

дят сесквитерпены, а также сапонины, алкалоиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины (эскулетин, скополетин), флавоноиды, тритерпеноиды, стероиды (β -резастерол, ψ -таракастерол, стигмастерол) [4].

Девясил британский используется в традиционной китайской медицине в форме настоя надземной части или цветков как отхаркивающее средство [9]. В монгольской медицине трава применяется как тонизирующее, общеукрепляющее, повышающее сопротивляемость организма, стимулирующее обмен веществ; листья и соцветия — при перитоните, головной боли, симптомах нарушения мозгового кровообращения, сильном переутомлении. В тибетской медицине надземная часть находит применение при желудочных коликах, злокачественных опухолях; соцветия — при пневмониях, а также в составе сбора — при сухом кашле, подагре, атеросклерозе, ревматизме, тахикардии, нефрите. Сок из свежесобранных растений обладает противокашлевым, местным ранозаживляющим свойствами; экстракт, эфирное масло — антибактериальными свойствами [4].

Однако в нашей стране из-за отсутствия соответствующих нормативных документов девясил британский не является официальным растением и не используется в достаточной мере, что делает его приоритетным для фармакогностического изучения и включения в число официальных лекарственных растений.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве девясила британского (*Inula britannica* L), произрастающего в Волгоградской области, методом дифференциальной спектрофотометрии и позволяющей проводить оценку качества сырья.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования выступала трава девясила британского, заготовленная в фазу полного цветения (июль-август 2010) от дикорастущих популяций во Фроловском районе Волгоградской области. Все использованные в работе реактивы имели степень чистоты ч.д.а.

В основу количественного определения флавоноидов в сырье положен метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на способности флавоноидов образовывать окрашенные хелатные комплексы со спиртовым раствором алюминия хлорида в среде кислоты хлороводородной разведенной. При этом максимум поглощения первой полосы смещается на 35—50 нм к видимой области по сравнению с исходным флавоноидом и основной максимум поглощения отмечается в диапазоне длин волн 390—410 нм [3].

Для выбора оптимального режима экстрагирования травы девясила британского спиртовые извлечения получали методом экстракции с последовательной сменой этанола 96 %, 70 % и 40 % концентрации и с использованием этанола 70%-й концентрации (как наиболее универсального экстрагента для флавоноидов). Точную навеску измельченной до размера частиц 1—3 мм травы девясила британского около 1,0 г помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 30 мл 96%-го этанола, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали под струей воды до комнатной температуры и содержимое фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли дважды поочередно 70%-м и 40%-м этанолом. Извлечения фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем фильтрата доводили до метки 96%-м спиртом. Полноту извлечения флавоноидов из сырья подтверждали по отрицательной цианидиновой пробе со шротом [3]. Аналогично получали извлечение с использованием 70%-го этанола [2].

Аликвоты полученных растворов объемом 5 мл помещали в колбы на 25 мл, прибавляли 5 мл 5%-го спиртового раствора алюминия хлорида и 2—3 капли разведенной соляной кислоты. Объем смесей доводили до метки 96%-м или 70%-м спиртом этиловым соответственно и оставляли для прохождения реакции комплексообразования в защищенном от света месте 45 мин.

Оптическую плотность продуктов взаимодействия спиртовых извлечений из сырья девясила британского с 5%-м спиртовым раствором алюминия хло-

рида в среде кислоты хлороводородной разведенной измеряли на спектрофотометре Solar PV 1251 С при длине волны $\lambda_{\max} = 353$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вели по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot W_1 \cdot W_2}{E_{1\%1\text{см}} \cdot m \cdot V_a},$$

где A_x — оптическая плотность исследуемого раствора;

W_1, W_2 — разведения, мл;

$E_{1\%1\text{см}}$ — Государственный стандартный образец (ГСО) лютеолина с алюминия хлоридом при $\lambda_{\max} = 353$ нм (400);

m — масса навески исследуемого сырья, г;

V_a — объем аликвоты, мл [3].

Статистическая обработка результатов химического эксперимента проводилась согласно ОФС 42-0111-09 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и включала проверку однородности выборки, с последующим вычислением базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды, с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США) и Excel 2000 (MS Office 2000, США). Валидация методики количественного определения флавоноидов в траве девясила британского выполнялась в соответствии с рекомендациями [1] по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность, аналитическая область (диапазон применения). Поскольку валидируемая методика проводится в легко контролируемых условиях анализа, то не было необходимости определять ее устойчивость.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами было установлено, что максимум оптической плотности ультрафиолетового спектра поглощения продуктов взаимодействия спиртовых извлечений из исследуемых образцов сырья, полученных как методом экстракции с последовательной сменой этанола (96 %, 70 % и 40 %), так и с использованием этанола 70%-й концентрации, с 5%-м спиртовым раствором алюминия хлорида в среде кислоты хлороводородной разведенной находится $\lambda_{\max} = 353$ нм и близок к спектральным характеристикам УФ-спектра раствора государственного стандартного образца лютеолина* — 5, 7, 3', 4'-тетрагидроксифлаван. На основании полученных результатов оценки суммарного содержания флавоноидов производили в пересчет на лютеолин и использовали удельный показатель поглощения комплекса раствора ГСО лютео-

* лютеолин имеет максимум поглощения при 360 нм.

лина с алюминия хлоридом, который, согласно литературным данным, при аналитической длине волны 353 нм равен $E_{1\%1\text{см}} = 400,0$ [5].

Проверку однородности выборки и идентификацию вариант, отягощенных грубыми ошибками, осуществляли исходя из размаха варьирования. Рассчитанные значения контрольного критерия (Q) не превышали соответствующие табличные ($Q_{\text{табл}} (95\%; 6)$) с доверительной вероятностью $P = 95\%$. Следовательно, ни одна из вариант не отягощена грубой ошибкой, то есть выборка считалась однородной и статистические характеристики методики соответственно были признаны достоверными (табл.).

Результаты определения суммы флавоноидов в траве девясила британского

№ серии	Оптическая плотность (A)	Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин (X), %	Метрологические характеристики
экстракция с последовательной сменой этанола (96 %, 70 % и 40 %)			
1	0,751	0,939	$X_{\text{ср}} = 0,938$ $S = 0,005$ $S_X = 0,002$ $\Delta x = 0,003$ $\varepsilon, \% = 0,23$ $\varepsilon_{\text{ед.опр.}}, \% = 0,59$
2	0,748	0,935	
3	0,745	0,932	
4	0,747	0,934	
5	0,753	0,942	
6	0,756	0,945	
X?	0,750	0,938	
экстракция с использованием этанола 70%-й концентрации			
1	0,657	0,822	$X_{\text{ср}} = 0,83$ $S = 0,009$ $S_X = 0,004$ $\Delta x = 0,004$ $\varepsilon, \% = 0,45$ $\varepsilon_{\text{ед.опр.}}, \% = 1,17$
2	0,669	0,837	
3	0,651	0,814	
4	0,657	0,822	
5	0,668	0,835	
6	0,659	0,824	
X?	0,661	0,826	

Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в извлечениях из травы девясила британского, полученных методом экстракции с последовательной сменой этанола (96 %, 70 % и 40 %), составила $(0,94 \pm 0,003)\%$, в извлечениях, полученных с использованием этанола 70%-й концентрации, — $(0,83 \pm 0,004)\%$.

По результатам метрологического анализа методики установлено, дисперсия результатов количественного определения флавоноидов в сырье девясила британского составляет $S^2 = 0,002$ и $S^2 = 0,004$, что свидетельствует о воспроизводимости результатов анализа. Величина стандартного отклонения ($S = 0,005$ и $S = 0,009$) характеризует разброс вариант вокруг среднего и является оценкой соответствующей случайной ошибки, относительная ошибка составляет 0,23 и 0,45 % и не превышает допустимого значения 5 %. Ошибка единичного измерения равна 0,59 и 1,17 % соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализированы различные методы экстракции травы девясила британского и как наиболее оптимальный для данного вида сырья выбран метод экстракции с последовательной сменой этанола (96 %, 70 % и 40 %), который позволяет наиболее полно извлекать флавоноиды. Предложена методика, которая позволяет определять содержание суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин) в траве девясила британского в присутствии других соединений, она проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. Полученные данные свидетельствуют, что содержание флавоноидов в траве девясила британского, произрастающего в Волгоградской области, по результатам данной методики составляет $(0,94 \pm 0,003)\%$. Проведенная валидационная оценка свидетельствует о ее пригодности для контроля качества исследуемого сырья.

ЛИТЕРАТУРА

- ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. — М.: Изд-во стандартов, 2002.
- Лесовая Ж. С., Писарев Д. И., Новиков О. О. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина и фармация. — 2010. — № 12/2. — С. 150—154.
- Лесовая Ж. С., Писарев Д. И., Новиков О. О., Романова Т. А. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина и фармация. — 2010. — № 12/2. — С. 145—149.
- Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство *Asteraceae* (*Compositae*). — СПб.: Наука, 1993. — 352 с.
- Сампиев А. М., Никифорова Е. Б., Хочава М. П. // Кубанский научный медицинский вестник. — 2006. — № 12. — С. 106—110.
- Флора Европейской части СССР: *Asteraceae* (*Compositae*) / Сост. Н. Н. Цвелев — СПб.: Наука, 1994. — Т. 7. — 317 с.
- Kobayashi T. Preventative effects of the flowers of *Inula britannica* on autoimmune diabetes in C57BL/KsJ mice induced by multiple low doses of streptozotocin / T. Kobayashi, Q. H. Song, T. Hong, H. Kitamura, J. C. Cyong // *Phytoth. Res.* — 2002. — № 16. — P. 377—382.
- Monograph on *Inula britannica* L. / A. L. Khan, S. A. Gilani, Y. Fujii, K. N. Watanabe — Tokyo, Japan: Mimatsu Corporation. 2008. — P. 21.
- Park E. J. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Inula Britannica* / E. J. Park, J. Kim // *Planta Med.* — 1998. — № 64. — P. 752—754.
- Song Q. H., Kobayashi T., Hong T., Cyong J. C. // *Am. J. Chin. Med.* — 2002. — № 30. — P. 297—305.

Контактная информация

Митрофанова Ирина Юрьевна — старший преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: I.U.Mitrofanova@yandex.ru