

УДК 582.632.1-035.274:615.07

О.В. Мушкина, Н.С. Гурина

Количественное определение флавоноидов и динамика их накопления в листьях ольхи серой

ВВЕДЕНИЕ. Возрастающий интерес к лекарственным средствам растительного происхождения в последние годы, который вызван рядом их преимуществ по сравнению с синтетическими лекарственными средствами [1–3], обуславливает необходимость поиска новых источников биологически активных веществ и внедрение в практику отечественного здравоохранения новых видов лекарственного растительного сырья и продуктов его переработки. Поэтому актуальным являются фармакогностическое и фармакологическое изучение растительного сырья, которое не применяется в официальной медицине, но широко используется в народной, разработка критериев для оценки его качества и создание нормативной документации на него. Таким сырьем, вызывающим интерес своей фармакологической активностью и химическим составом, являются листья ольхи серой. Алглутин – жидкий экстракт листьев – рекомендован в качестве слабительного средства при хронических запорах. Настой – как противовоспалительное и вяжущее при болезнях горла и кишечника, как потогонное, при простудных заболеваниях и кашле, ранозаживляющее, при ревматизме и подагре. Отвар листьев применяют при онкологических заболеваниях желудочно-кишечного тракта, раке груди, а также как кровоостанавливающее средство [4–5]. На основании литературных данных [4, 6] и проведенного нами качественного анализа листьев ольхи серой было установлено, что в них содержится несколько флавоноидов, преимущественно гиперозид [7]. Нами предложено стандартизировать листья ольхи серой по содержанию флавоноидов. Существуют различные методы количественного определения содержания флавоноидов в растительном сырье: спектроскопические (спектрофотометрия, фотоколориметрия) и хроматографические: ВЭЖХ, ТСХ (тонкослойная хроматография) и др. [8–10]. Нами был использован наибо-

лее распространенный метод анализа – спектрофотометрия, основанная на реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Разработка методики количественного определения флавоноидов и изучение динамики их накопления в листьях ольхи серой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Материалом исследования служили листья ольхи серой, заготовленные на учебно-полевом участке в п. Улановичи с мая по сентябрь 2006–2007 гг. Использовали высушенное сырье (воздушно-теневая сушка).

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-46.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для выбора оптимальных условий экстракции было проведено исследование по определению влияния на полноту извлечения суммы флавоноидов из листьев ольхи серой следующих факторов:

1. Концентрация спирта.
2. Размер частиц сырья.
3. Время нагревания, мин.
4. Соотношение сырья и экстрагента.

Полученные данные приведены на рисунках в виде диаграмм (для всех определений $n = 6$).

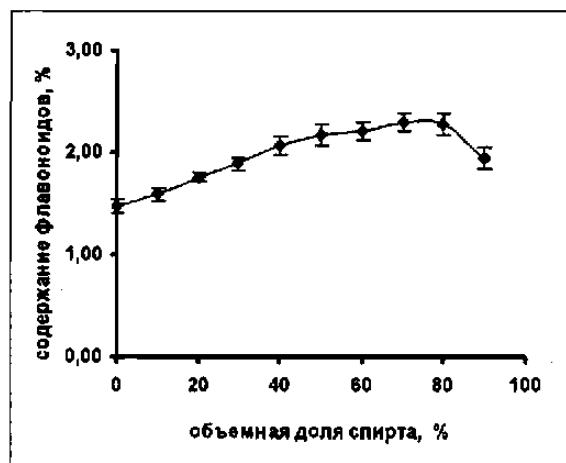


Рис. 1. Зависимость полноты экстракции суммы флавоноидов от концентрации спирта.

Максимальное содержание флавоноидов наблюдалось в извлечении, полученном из сырья с размером частиц 2 мм (рис. 2). На основании этого в разработанной методике количественного определения суммы флавоноидов в листьях ольхи серой использовали сырье с размером частиц 2 мм.

При соотношении сырье : экстрагент 1 : 60, выход флавоноидов был максимальным (рис. 3). Поэтому в методике количественного определения флавоноидов в листьях ольхи серой использовали соотношение сырье:экстрагент 1 : 60.

Выход флавоноидов достигал максимума при экстракции 70% и 80% этанолом (рис. 1). Дальнейшее увеличение концентрации спирта приводило к снижению эффективности экстракции, что выражалось в уменьшении содержания флавоноидов в извлечении.

Исходя из этого, в разработанной методике количественного определения суммы флавоноидов в листьях ольхи серой в качестве экстрагента использовали 70% спирт этиловый.

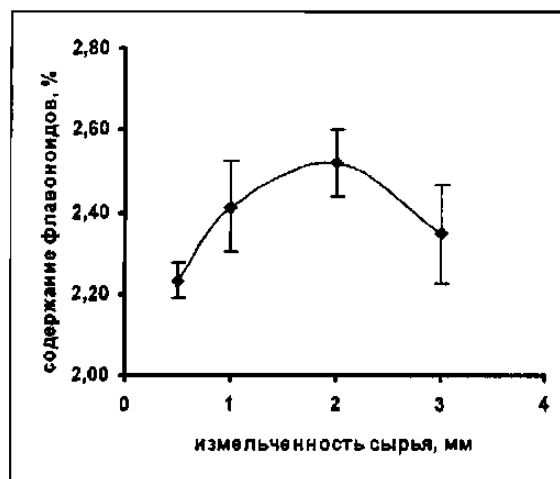


Рис. 2. Зависимость полноты экстракции суммы флавоноидов от размеров частиц сырья.

В извлечении, полученном при нагревании в течение 40 мин, содержание флавоноидов максимально (рис. 4). Поэтому в методике количественного определения суммы флавоноидов экстракцию проводили в течение 40 мин.

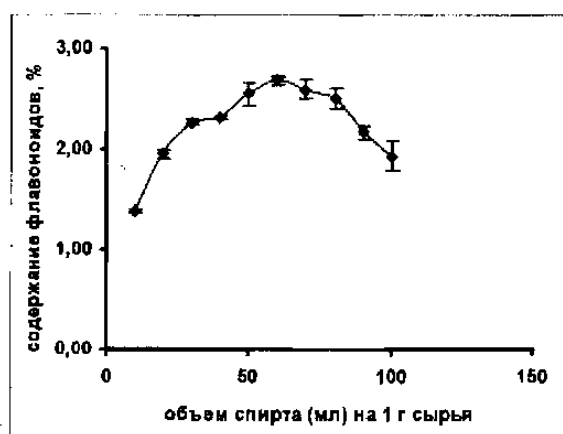


Рис. 3. Зависимость полноты экстракции суммы флавоноидов от времени экстракции.

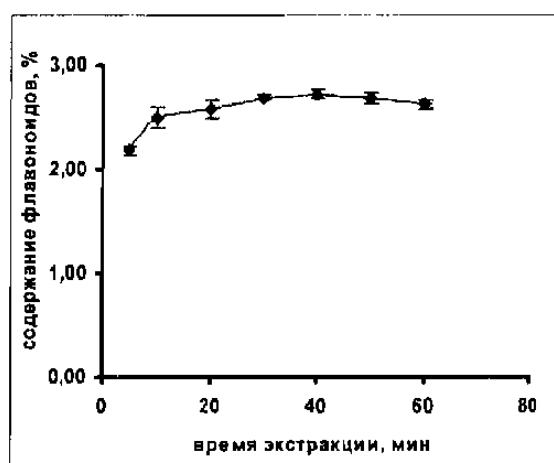


Рис. 4. Зависимость полноты экстракции суммы флавоноидов от соотношения сырье : экстрагент.

Для изучения стабильности продуктов реакции флавоноидов из листьев ольхи серой с 2% раствором хлорида алюминия во времени были приготовлены растворы, оптическую плотность которых измеряли через 5 мин в течение 1 ч 20 мин (рис. 5).

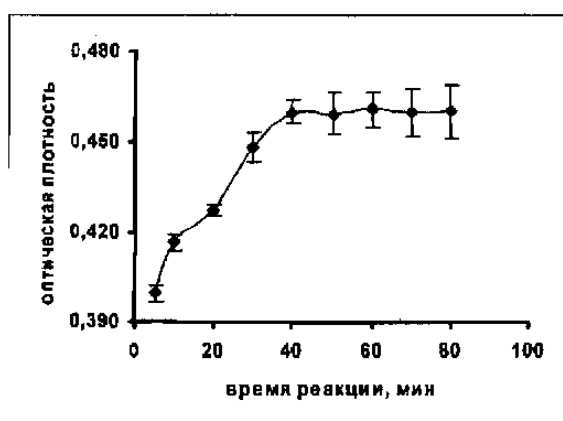


Рис. 5. Устойчивость комплекса флавоноидов из листьев ольхи серой с 2% раствором алюминия хлорида.

Оптическая плотность исследуемых растворов достигла максимума через 40 мин и оставалась стабильной в течение последующих 80 мин (рис. 5). Поэтому в разработанной методике количественного определения суммы флавоноидов в листьях ольхи серой оптическую плотность анализируемого раствора измеряли через 40 мин после его приготовления.

Для изучения оптимальных условий реакции комплексообразования флавоноидов с 2% раствором алюминия хлорида было изучено влияние объема данного реактива на значение оптической плотности

получаемых растворов (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что при добавлении к определенному объему исследуемого образца 1 мл и более 2% раствора алюминия хлорида оптическая плотность практически не изменялась. Следовательно, при добавлении 1 мл 2% раствора алюминия хлорида все флавоноиды вступали в реакцию. Поэтому в разработанной нами методике количественного определения суммы флавоноидов в листьях ольхи серой использовали 2 мл 2% раствора алюминия хлорида, чтобы обеспечить его избыток для полного взаимодействия флавоноидов с данным реактивом.

**Условия реакции комплексообразования флавоноидов
с 2% раствором алюминия хлорида**

Испытуемый параметр	Значение оптической плотности (А)
Объем 2% раствора алюминия хлорида, мл	
0,5	0,347
1,0	0,459
1,5	0,463
2,0	0,462

МЕТОДИКА. Около 1,0 г сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 60 мл 70% спирта этилового. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 40 минут при температуре 80–90°C, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Извлечение центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 3000 об/мин.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл полученного извлечения, прибавляли 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 1 каплю кислоты уксусной разведенной и доводили объем раствора спиртом этиловым до метки (раствор Б).

Через 40 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, использовали в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли кислоты уксусной разведенной и доведенный спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C \cdot V \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 100}{A_1 \cdot m \cdot V_2 \cdot (100 - W)},$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₁ – оптическая плотность раствора гиперозид;

V – объем вытяжки;

V₁ – объем колбы;

V₂ – объем пипетки;

C – концентрация гиперозида, мг/мл;

m – масса навески, мг;

W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO) гиперозида: 0,01 г (точная навеска) PCO гиперозида, предварительно высушенного при температуре 130–135°C в течение 3 часов, растворяли в 20 мл 95% спирта в мерной колбе вместимостью 25 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора спиртом той же концентрации до метки и перемешивали.

Метрологические характеристики результатов, полученных с помощью разработанной методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях ольхи серой, были установлены на основании результатов анализа одного образца сырья в десяти независимых повторностях (табл. 2).

**Метрологическая характеристика методики
количественного определения суммы флавоноидов в пересчете
на гиперозид в листьях ольхи серой**

$\bar{X}, \%$	n	S	S ²	t(P,f)	Δx	$\epsilon, \%$
2,65	10	0,052	0,002	2,26	0,032	1,22

Отсутствие систематической погрешности разработанной методики было доказано методом добавок. К сырью, с установленным содержанием флавоноидов, добавляли известное количество гиперозида. Далее проводили экстракцию и количественное определение по описанной выше методике. Результаты количественного определения гиперозида представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты опытов с добавками (n = 5, P = 0,95)

Введено гиперозида, мг	Найдено гиперозида ($m + \Delta m$), мг	Sr
0,5	$0,48 \pm 0,03$	0,06
1,0	$0,91 \pm 0,04$	0,05
1,5	$1,52 \pm 0,04$	0,03

Таким образом, разработана и апробирована методика определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в листьях ольхи серой. Методика характеризуется хорошей воспроизводимостью, поэтому может быть рекомендована для определения флавоноидов в листьях ольхи серой.

Результаты определения динамики накопления суммы флавоноидов в листьях ольхи серой спектрофотометрическим методом представлены в табл. 4.

Таблица 4

Динамика накопления суммы флавоноидов в листьях ольхи серой

Время заготовки	Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид, %	
	Витебская обл., 2006 г. $\bar{X} \pm \Delta \bar{X}, \%$ (n=6)	Витебская обл., 2007 г. $\bar{X} \pm \Delta \bar{X}, \%$ (n=6)
1 мая	$1,78 \pm 0,07$	$1,69 \pm 0,05$
15 мая	$2,21 \pm 0,04$	$2,12 \pm 0,04$
1 июня	$2,34 \pm 0,03$	$2,26 \pm 0,05$
15 июня	$2,12 \pm 0,05$	$2,06 \pm 0,05$
1 июля	$1,75 \pm 0,04$	$1,83 \pm 0,05$
15 июля	$1,47 \pm 0,03$	$1,79 \pm 0,1$
1 августа	$1,54 \pm 0,07$	$1,70 \pm 0,03$
15 августа	$1,55 \pm 0,03$	$1,60 \pm 0,05$
1 сентября	$1,33 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,08$
15 сентября	$1,31 \pm 0,08$	$1,29 \pm 0,05$

Изучение динамики накопления суммы флавоноидов в листьях ольхи серой показало, что максимальное содержание биологически активных соединений приходится на период с начала мая до начала июля. Поэтому данный период рекомендован для заготовки листьев ольхи серой.

ВЫВОДЫ:

1. Разработана и апробирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в листьях ольхи серой; содержание флавоноидов в среднем составило 2,65%. Относительная ошибка при доверительной вероятности 95% составляет 1,22%.

2. Подобраны оптимальные условия экстракции флавоноидов исследуемого объекта (экстрагент – 70% спирт этиловый, частицы сырья размером 2 мм, время нагревания на кипящей водяной бане 40 мин, соотношение сырье : экстрагент – 1 : 60) и протекания реакции флавоноидов с 2% раствором алюминия хлорида.

3. Изучена динамика накопления флавоноидов в листьях ольхи серой. Установлено, что максимальное накопление флавоноидов приходится на период с начала мая до начала июля, поэтому данный период является оптимальным для заготовки листьев ольхи серой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабишев, К.Э. Современные подходы к разработке лекарственных средств на основе тибетских прописей / К.Э. Кабишев // Вестник ВГУ. – 2005. – № 1. – С. 181–188.
2. *Лекарственные растения Государственной фармакопеи* / под ред. И.А. Самыпиной, В.А. Северцева. – М.: «АНМИ», 2001. – 489 с.
3. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУП», 2004. – 1180 с.
4. Хворост, О.П. Химический состав, лекарственное и хозяйственное значение видов *Alnus Mill. S.L.* / О.П. Хворост, А.Г. Сербин, Н.Ф. Комисаренко // Растительные ресурсы. – 1984. – Вып. 3. – С. 430–442.
5. *Вільха сіра, вільха біла *Alnus incana* (L.), Moench. Аналітичний огляд* / Б.М. Зузук [и др.] // Провизор. – 2007. – № 9. – С. 37–41.
6. *Биологически активные вещества растительного происхождения: в 3 т.* / Б.Н. Головкин [и др.]. – М.: Наука, 2001. – Т. 1. – 350 с.; т. 2. – 764 с.
7. Мушкина, О.В. Фармакогностические критерии оценки качества листьев ольхи / О.В. Мушкина // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 60-й итоговой науч.-практ. конф. студ. и молодых ученых, Витебск, 24–25 апреля 2008 г. / Вит. гос. мед. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2008. – С. 549–551.
8. *Государственная фармакопея Республики Беларусь* / под общ. ред. Г.В. Годовальникова. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии, 2006. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 656 с.
9. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 336 с.
10. Лобанова, А.А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья / А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.

S U M M A R Y

The method of quantitative determination of the summary of flavonoids in the leaves of *Alnus incana* by spectrophotometry was developed. The dynamic of flavonoid accumulation in the leaves of *Alnus incana* was studied and optimal term of the drug material collection was determined.

Поступила в редакцию 11.09.2008