

© А. В. Куркина, 2014

А. В. Куркина

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ПЛОДАХ БОЯРЫШНИКА

ГБОУ ВПО "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии (аналитическая длина волны 412 нм) и ГСО гиперозида. С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов сырья и показано, что содержание флавоноидов в плодах боярышника варьирует в пределах от 0,112 до 0,183 % (в пересчете на гиперозид). Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 4,87$  %.

**Ключевые слова:** боярышник кроваво-красный; *Crataegus sanguinea* Pall.; плоды; флавоноиды; гиперозид; спектрофотометрия; стандартизация.

Плоды и цветки боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) и других фармакопейных видов широко применяется в медицине в качестве кардиотонических и гипохолестеринемических средств при лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний [1 – 3]. Ведущей группой биологически активных соединений сырья данного растения являются флавоноиды, хотя и другие вещества, например, сапонины, вносят вклад в фармакологический эффект [4]. Стандартизацию плодов боярышника осуществляют по содержанию флавоноидов (не менее 0,06 % в пересчете на гиперозид) [5], однако, на наш взгляд, методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье данного растения крайне сложна и многостадийна, что неизбежно может приводить к потере анализируемых веществ и, следовательно, к занижению результатов анализа. Кроме того, в фармакопейной методике многостадийная пробоподготовка предусмотрена и для государственного стандартного образца (ГСО) гиперозида, что тоже не только усложняет методику, но и может сказываться на точности анализа. В соответствии с этим наблюдением исследования по совершенствованию химической стандартизации плодов боярышника являются актуальными.

Целью настоящих исследований является разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника.

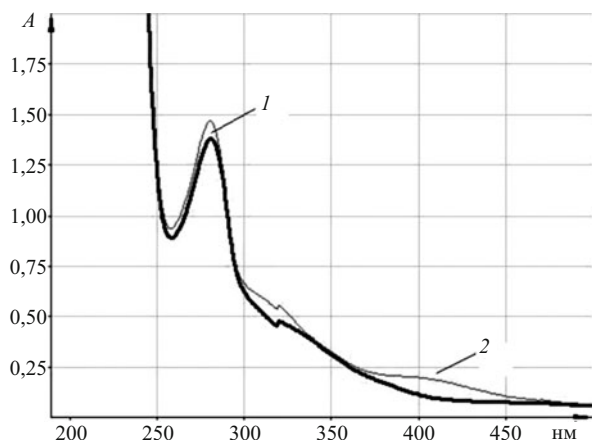
### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования служили образцы плодов и цветков боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.), собранные в 2010 – 2012 гг. в Самарской области (с. Гаврилова Поляна и пос. Просвет), а также промышленный образец плодов боярышника (ОАО "Красногорсклексредства", 2012 г.,

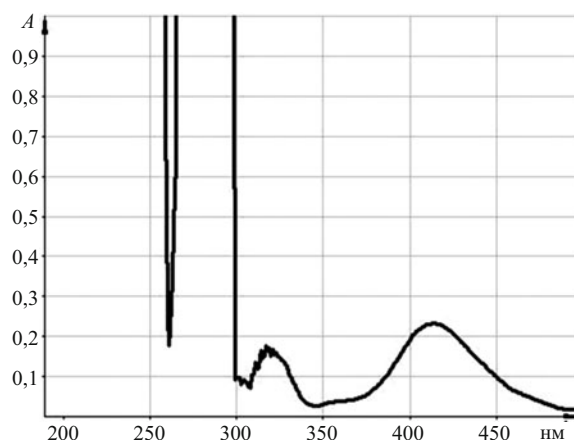
серия 10112). С целью разработки методики нами были определены оптимальные условия экстракции плодов боярышника: экстрагент — 70 % этанол; соотношение "сырье — экстрагент" — 1:30; время экстракции на водяной бане при температуре 85 – 90 °С в течение 60 мин (табл. 1). При этом следует обратить внимание, что в случае 95 % этилового спирта, применяемого в фармакопейной методике в качестве экстрагента [5], содержание суммы флавоноидов более чем в 3 раза ниже по сравнению с оптимальным вариантом (табл. 1). Этот факт можно объяснить плохой растворимостью гиперозида в 95 % этиловом спирте. Именно по этой причине для приготовления раствора ГСО гиперозида нами вместо 95 % этилового спирта рекомендован в качестве растворителя 70 % этиловый спирт (см. Примечание в методике).

В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из данного сырья. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра "Specord 40" (Analytik Jena).

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов использовали реакцию комплексообразования с раствором алюминия хлорида для исключения вклада в значение оптической плотности других групп соединений [6], в том числе характерных для данного растения гидроксикоричных кислот, имеющих, как правило, основной максимум поглощения в области 280 – 330 нм [7]. В условиях комплексообразования наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов, в частности, флавонолов (гиперозида и др.), который обнаруживается в УФ-спектре в виде максимума поглощения в области 400 – 412 нм (рис. 1), что находит подтвер-



**Рис. 1.** УФ-спектры растворов водно-спиртового извлечения из плодов боярышника кроваво-красного: 1 — раствор извлечения; 2 — раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида.



**Рис. 2.** УФ-спектр раствора водно-спиртового извлечения из плодов боярышника кроваво-красного (дифференциальный спектр).

ждение в условиях дифференциальной спектрофотометрии (рис. 2).

Изучение УФ-спектров ГСО гиперозида показало, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при 412 нм, в том числе в дифференциальном варианте (рис. 3 и 4).

Следовательно, гиперозид может быть использован в методике анализа в качестве ГСО. Кроме того, сравнение УФ-спектров извлечений из плодов и цветков боярышника кроваво-красного показало (рис. 5), что их спектральные характеристики резко отличаются (для плодов данного растения характерен интенсивный максимум поглощения при длине волны

$285 \pm 2$  нм), что может быть использовано для диагностики данных видов сырья, принимая во внимание то обстоятельство, что в разделе “Качественные реакции” и в плодах, и в цветках боярышника предусмотрено обнаружение методом тонкослойной хроматографии гиперозида [5], являющегося в данном случае общим, а не отличительным признаком.

Кроме того, ранее нами была также разработана методика определения содержания флавоноидов в цветках боярышника [8]. С использованием разработанной методики был проанализирован ряд образцов цветков боярышника и показано, что содержание суммы флавоноидов варьирует в пределах от 1,41 до 1,84 % (в пересчете на гиперозид). Это позволило предварительно рекомендовать в качестве числового показателя “содержание суммы флавоноидов” значение “не менее 0,5 %”) [8].

**Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника.** Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, про-

**Таблица 1**  
Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из плодов боярышника от условий экстракции

№ п/п	Экстрагент	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье, %
1.	40 % этиловый спирт	1:30	60	$0,033 \pm 0,001$
2.	50 % этиловый спирт	1:30	60	$0,044 \pm 0,001$
3.	60 % этиловый спирт	1:30	60	$0,087 \pm 0,002$
4.	70 % этиловый спирт	1:30	60	$0,158 \pm 0,002$
5.	80 % этиловый спирт	1:30	60	$0,072 \pm 0,002$
6.	95 % этиловый спирт	1:50	60	$0,045 \pm 0,001$
7.	70 % этиловый спирт	1:30	45	$0,078 \pm 0,002$
8.	70 % этиловый спирт	1:30	90	$0,156 \pm 0,002$
9.	70 % этиловый спирт	1:30	120	$0,150 \pm 0,002$
10.	70 % этиловый спирт	1:20	60	$0,137 \pm 0,002$
11.	70 % этиловый спирт	1:50	60	$0,160 \pm 0,001$

**Таблица 2**  
Содержание суммы флавоноидов в различных образцах плодов боярышника

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье, %	
		разработанный метод	фармакопейный метод
1.	Промышленный образец (ОАО “Красногорсклексредства”, 2012 г., серия 10112)	$0,158 \pm 0,002$	$0,063 \pm 0,002$
2.	Самарская область (пос. Просвет), 18.08.2011 г.	$0,137 \pm 0,002$	$0,056 \pm 0,001$
3.	Самарская область (с. Гаврилова Поляна), 25.08.2011 г.	$0,183 \pm 0,002$	$0,071 \pm 0,002$
4.	Самарская область (пос. Просвет), 20.08.2010 г.	$0,112 \pm 0,001$	$0,051 \pm 0,001$
5.	Самарская область (с. Гаврилова Поляна), 23.08.2010 г.	$0,161 \pm 0,002$	$0,065 \pm 0,002$

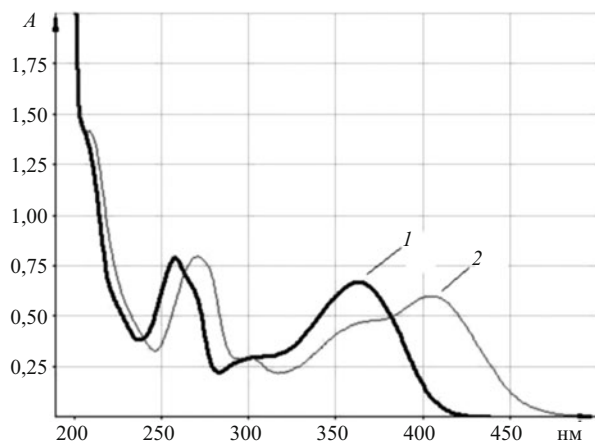


Рис. 3. УФ-спектр спиртового раствора ГСО гиперозида: 1 — раствор ГСО гиперозида; 2 — раствор ГСО гиперозида с добавлением алюминия хлорида.

ходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на аналитических весах с точностью до  $\pm 0,0001$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу с извлечением охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Полученное извлечение фильтруют через фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 5 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95 % этиловым спиртом (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный при тех же условиях, но без добавления алюминия хлорида (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 412 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО гиперозида при длине волны 412 нм, приготовленного по аналогии с испытуемым раствором (см. Примечание).

Примечание. Приготовление раствора гиперозида-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска) гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 70 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры дово-

Таблица 3  
Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в плодах боярышника

$f$	$\bar{X}$	$S$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
10	0,158	0,0034	95	2,26	$\pm 0,0077$	$\pm 4,87$

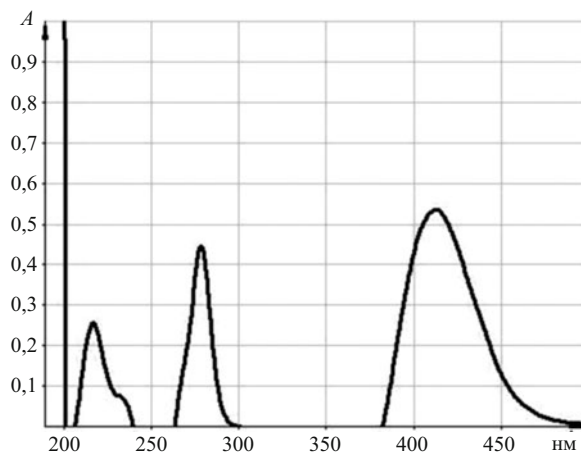


Рис. 4. УФ-спектр раствора ГСО гиперозида (дифференциальный спектр).

дят объем раствора 70 % этиловым спиртом до метки (раствор А гиперозида). 1 мл раствора А гиперозида помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора 95 % этиловым спиртом до метки (испытуемый раствор Б гиперозида). В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А гиперозида помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки 95 % этиловым спиртом (раствор сравнения Б гиперозида).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах ( $X$ ) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 30 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 5 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где  $D$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $D_0$  — оптическая плотность раствора ГСО гиперозида;  $m$  — масса сырья, г;  $m_0$  — масса ГСО гиперозида, г;  $W$  — потеря в массе при высушивании в процентах.

Целесообразным также представляется расчет содержания суммы флавоноидов с использованием значения удельного показателя поглощения гиперозида (330). В этом случае расчет содержания суммы флавоноидов в сырье осуществляют по упрощенной формуле:

$$X = \frac{D \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{330 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

Таблица 4  
Содержание суммы флавоноидов в плодах боярышника в зависимости от добавления гиперозида

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление гиперозида, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная, мг	относительная, %
1,58	0,4 (в сырье)	1,98	1,95	- 0,03	- 1,54
1,58	0,8 (в сырье)	2,38	2,42	+ 0,04	+ 1,68
1,58	1,2 (в сырье)	2,78	2,83	+ 0,05	+ 1,80

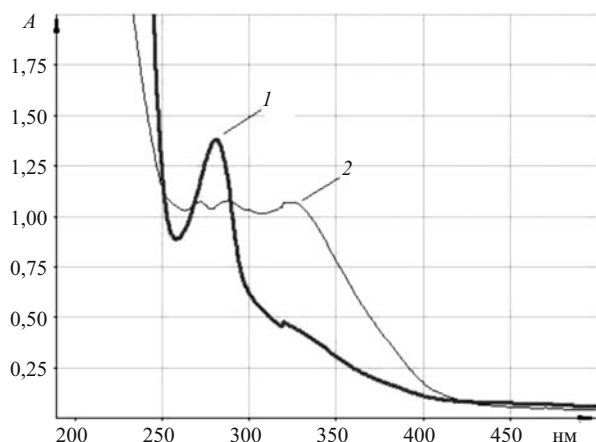


Рис. 5. УФ-спектр раствора водно-спиртового извлечения из плодов (1) и цветков (2) боярышника кроваво-красного.

где  $D$  — оптическая плотность испытуемого раствора; 330 — удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при 412 нм;  $m$  — масса сырья, г;  $W$  — потеря в массе при высушивании в процентах.

С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов плодов боярышника и показано (табл. 2), что содержание суммы флавоноидов в образцах сырья варьирует в пределах от 0,112 до 0,183 % (в пересчете на гиперозид). Это позволяет рекомендовать в качестве числового показателя “содержание суммы флавоноидов” значение “не менее 0,1 % (взамен 0,06 %), хотя, конечно, исследования по уточнению данного показателя должны быть продолжены.

Метрологические характеристики методики количественного определения флавоноидов в плодах боярышника представлены в табл. 3.

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 4,87\%$ .

Опыты с добавками РСО гиперозида к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (опыты с добавками) (табл. 4).

Таким образом, разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии (аналитическая длина волны 412 нм). Обосновано использовать в разработанной методике гиперозид в качестве ГСО. Содержание суммы флавоноидов в образцах плодов боярышника варьирует в пределах от 0,112 до 0,183 % (в пересчете на гиперозид). Спектральные характеристики электронного спектра (интенсивный максимум поглощения при длине волны  $285 \pm 2$  нм) могут быть использованы также для целей идентификации сырья и препаратов данного растения. На наш взгляд, внедрение данной методики, отвечающей параметрам валидации, позволит объективно оценивать качество сырья боярышника.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств, Т. 1, Официальное издание, Ремедиум, Москва (2008).
2. В. А. Куркин, *Основы фитотерапии (Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов)*, ООО “Офорг”, ГОУ ВПО “СамГМУ Росздрава”, Самара (2009).
3. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Hydrangeaceae – Haloragaceae*, Наука, Санкт-Петербург (1987).
4. В. А. Куркин, *Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов)*, 2-е изд., перераб. и доп., ООО “Офорг”, ГОУ ВПО “СамГМУ”, Самара (2007).
5. *Государственная фармакопея СССР*, Вып. 2, Медицина, Москва (1990).
6. T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970).
7. В. А. Куркин, Е. В. Авдеева, *Фармация*, 57(1), 51 – 54 (2009).
8. А. В. Куркина, *Химия растительного сырья*, № 2, 171 – 176 (2013).

Поступила 06.02.14

## DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOIDS IN HAWTHORN FRUITS

A. V. Kurkina

Samara State Medical University, Samara, 344099 Russia

A new method for the quantitative estimation of total flavonoids in the fruits of *Crataegus* species has been developed based on differential spectrophotometry (at analytical wavelength of 412 nm) with reference to the state standard sample of hyperoside. The proposed method was used for the analysis of a series of raw material samples and showed that the total flavonoid content in hawthorn fruits varies from 0.112 to 0.183% (calculated for hyperoside). The results of statistical data processing show that the error of single determination of the total flavonoid content in hawthorn fruits at a confidence probability of 95% does not exceed  $\pm 4.87\%$ .

**Keywords:** *Crataegus sanguinea* Pall.; blood-red hawthorn; fruits; flavonoids; hyperoside; spectrophotometry; standardization.