

*О. В. Тринеева, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин*

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ СТУПЕНЧАТОГО ЭЛЮИРОВАНИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА**

ФГБОУ ВО "Воронежский государственный университет" Минобрнауки РФ, Россия, 394006, Воронеж; e-mail: trineevaov@mail.ru

Разработана экономичная и экспрессная методика идентификации и количественного определения полифенольных биологически активных веществ растительного происхождения (на примере галловой кислоты, танина и кверцетина) методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Экспериментально подобраны и теоретически обоснованы оптимальные условия их хроматографирования в тонком слое сорбента с количественной интерпретацией данных ВЭТСХ на персональном компьютере. Предлагаемый способ был апробирован на лекарственном растительном сырье листьев крапивы двудомной, коры дуба обыкновенного и плодов облепихи крушиновидной. Методика может быть использована в контроле качества субстанций, монокомпонентных и комплексных препаратов, растительных объектов, биологически активных добавок, премиксов, изделий пищевой и косметологической промышленности.

**Ключевые слова:** полифенольные биологически активные вещества; галловая кислота; танин; кверцетин; высокоэффективная тонкослойная хроматография.

Многие из описанных в литературе способов позволяют определять только суммарное содержание дубильных веществ, без достоверной информации о присутствии отдельных компонентов [1 – 5]. Известен способ идентификации и количественного определения танина методом ВЭЖХ в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и лекарственных препаратах кровохлебки лекарственной [6]. Описан способ идентификации и количественного денситометрического определения галловой кислоты методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в траве лофанта анисового [7]. Недостатком данного способа является невозможность одновременного определения танина, галловой кислоты и кверцетина в растительных объектах и многокомпонентных лекарственных формах без предварительного разделения на отдельные компоненты. Известны способы разделения и идентификации дубильных веществ методом ТСХ в извлечениях из ЛРС [1, 2]. Данные способы не лишены недостатков, так как не позволяют проводить количественное определение полифенольных соединений в исследуемых объектах. Способов, позволяющих идентифицировать и количественно определить одновременно не только высокомолекулярные (танин) и низкомолекулярные (галловая кислота) дубильные вещества, но и представителя флавоноидной группы полифенольных соединений — кверцетина — методом ТСХ, в литературе не обнаружено. Следовательно, актуальной является разработка способа разделения и количественного определения полифенольных биологически активных веществ (БАВ) в ЛРС и лекарственных растительных препаратах (ЛРП) (на примере танина, галловой ки-

слоты и кверцетина) методом элюирования в тонком слое сорбента.

Целью настоящей работы являлась разработка методики идентификации и количественного определения полифенольных соединений в ЛРС и ЛРП (на примере танина, галловой кислоты и кверцетина, как наиболее широко распространенных БАВ в растительных объектах) методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

### *Экспериментальная часть*

На первом этапе работы были экспериментально выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования исследуемых полифенольных БАВ методом ВЭТСХ. В работе использовали 0,5 % спиртовые растворы галловой кислоты и танина и 0,1 % спиртовый раствор кверцетина (ЗАО "Вектон", Санкт-Петербург, Россия, степень чистоты не менее 99 %), которые наносили на стартовую линию хроматографических пластин марок "Sorbfil" ПТСХ-АФ-А высокоэффективные размером 10 × 10 см (тип сорбента — силикагель СТХ-1А; зернение — 5 – 17 мкм; толщина слоя — 90 – 120 мкм; связующее — силиказоль). В работе использовали растворители марки х.ч. (ЗАО "Вектон", Санкт-Петербург, Россия).

Для визуальной оценки хроматографических зон после элюирования осуществляли отбор проявителей с учетом (табл. 1) специфичности, чувствительности, доступности и высокого качества получаемой картины. Хроматограмму равномерно обрабатывали реагентом из пульверизатора и сушили в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течение 3 – 5 мин до проявле-

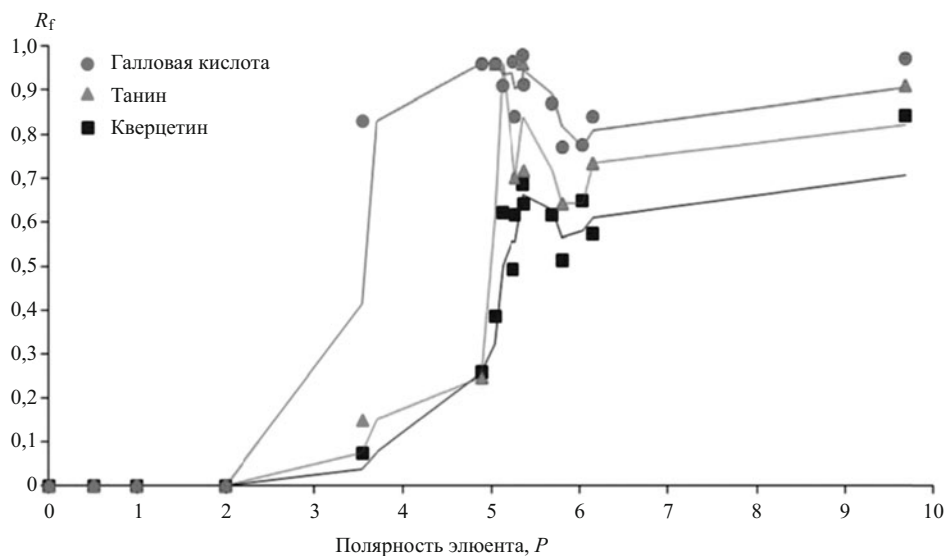


Рис. 1. Вид зависимости величины  $R_f$  исследуемых полифенольных БАВ от полярности элюента.

Т а б л и ц а 1

Детектирующие реагенты, использованные для определения полифенольных соединений в тонком слое сорбента

№ п/п	Детектирующий реагент	Окрашивание хроматографических зон		
		галловая кислота	танин	кверцетин
1	5 % спиртовый раствор фосфорномолибденовой кислоты	Синее на желто-зеленом фоне	-	Желто-бурое на желто-зеленом фоне
2	УФ-свет (254 нм)	Ярко-малиновое свечение на белом фоне	-	Ярко-малиновое свечение на белом фоне
3	УФ-свет (365 нм)	Бурое на розовом фоне	-	Бурое на розовом фоне
4	1 % спиртовый раствор ЖАК	Сине-фиолетовое на белом фоне	Сине-серое на белом фоне	Зеленовато-желтое на белом фоне
5	5 % спиртовый раствор гидроксида натрия	Желто-оранжевое на белом фоне	-	Оранжево-коричневое на белом фоне
6	5 % спиртовый раствор алюминия хлорида	Фиолетовое на белом фоне	-	Желтое на белом фоне
7	2 % раствор ванилина в соляной кислоте	-	-	Желтое на белом фоне

ния хроматографических зон. В качестве проявителя был выбран 1 % спиртовый раствор железо-аммонийных квасцов (ЖАК) (табл. 1) как реагент, позволяющий обнаружить все исследуемые БАВ на хроматограмме одновременно. Пределы обнаружения пятен БАВ с помощью выбранного реагента и специфичность приведены в табл. 2.

Для выбора оптимальных условий хроматографического определения полифенольных БАВ было изучено влияние полярности элюентов на хроматографическую подвижность в тонком слое (рис. 1). В экспери-

менте изучены элюирующие системы с различными значениями полярности, предлагаемые в литературе [3, 7, 8], а также вновь апробированные элюенты (табл. 3).

Статистическую обработку результатов проводили по ОФС.1.1.0013.15 ГФ XIII изд. “Статистическая обработка результатов химического эксперимента” [11]. Градуировочные графики строили по методу наименьших квадратов.

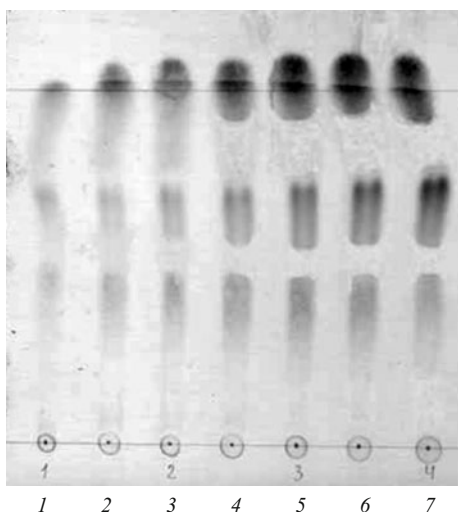
Результаты и их обсуждение

Как видно из данных табл. 3 и рис. 1, для достижения оптимальных величин  $R_f$ , а также четкого разделения исследуемых БАВ на хроматограммах необходимо использовать элюенты со значениями полярности в интервале 4,0 – 6,0 ед. Однако данные рис. 1 также свидетельствуют о том, что за одно хроматографирование возможно отделить галловую кислоту, тогда как танин и кверцетин имеют в данном диапазоне полярностей сходные значения величин относительной под-

Т а б л и ц а 2

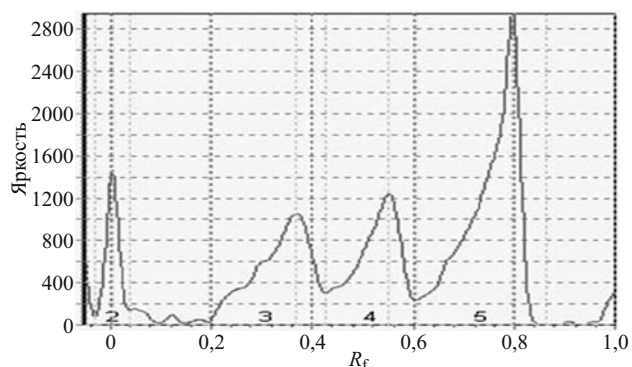
Пределы обнаружения исследуемых БАВ с использованием 1 % спиртового раствора ЖАК

№ п/п	БАВ	Предел обнаружения, г, в зоне
1	Галловая кислота	$3,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$
2	Танин	$5,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$
3	Кверцетин	$1,0 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$



**Рис. 2.** Калибровочная хроматограмма с серией стандартных растворов БАВ (кверцетин, танин, галловая кислота) в диапазоне концентраций от 1,0 до 4,0 мкг/мкл: 1 – 1 мкг; 2 – 1,5 мкг; 3 – 2 мкг; 4 – 2,5 мкг; 5 – 3 мкг; 6 – 3,5 мкг; 7 – 4 мкг.

вижности в тонком слое. В то же время при достижении величины полярности элюента 8,0 – 9,5 ед. наблюдается удовлетворительное разделение зон танина и кверцетина на хроматограммах. Следовательно, для удовлетворительного разделения зон и последующей количественной обработки хроматограмм методом компьютерного сканирования необходимо использовать фронтальное элюирование, где первый элюент — система № 10 ( $P = 3,54$  ед.) с высотой пробега 8 – 9 см, а второй элюент — система № 9 ( $P = 9,68$  ед.) с высотой пробега 7 см.



**Рис. 3.** Денситограмма смеси стандартных растворов исследуемых БАВ.

Таким образом, по совокупности полученных результатов были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия определения полифенольных БАВ в тонком слое сорбента: неподвижная фаза — силикагелевые пластинки марок “Sorbfil” 10 × 10 см с алюминиевой ПТСХ-АФ-А; элюент 1 (высота пробега 9 см) — диэтиловый эфир — уксусная кислота — гексан — этилацетат (20:20:20:40); элюент 2 (высота пробега 7 см) — этилацетат — муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (67:7,5:7,5:18); детектирующий реагент — 1 % спиртовый раствор железо-аммонийных квасцов; оптимальный объем пробы — по 2 мкл 0,5 % спиртовых растворов галловой кислоты и танина и 0,1 % спиртового раствора кверцетина; время выдерживания пластинки в термостате после проявления при  $t \geq 80$  °С — 3 – 5 мин [12].

Сразу же после проявления зон на калибровочных хроматограммах пластины сканируют с помощью

Таблица 3

**Хроматографическая подвижность исследуемых полифенольных БАВ в различных элюентах**

№ п/п	Элюент	$R_f \pm 0,02$			$P$
		Галловая кислота	танин	кверцетин	
1	<i>n</i> -Бутанол — уксусная кислота — вода (10:3:7)	0,776	0,259	0,648	6,03
2	<i>n</i> -Бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:2)	0,866	0,205	0,615	5,69
3	<i>n</i> -Бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1)	0,910	0,065	0,620	5,13
4	Этилацетат — уксусная кислота — вода (5:1:1)	0,965	0,059	0,494	5,24
5	<i>n</i> -Бутанол — муравьиная кислота — вода (65:16:19)	0,913	0,716	0,640	5,37
6	Муравьиная кислота — вода — этилформиат (10:10:80)	0,974	0,961	0,740	—
7	Этилацетат — муравьиная кислота — вода (84:8:8)	0,966	0,247	0,258	4,89
8	Этилацетат — муравьиная кислота — вода (80:10:10)	0,964	0,964	0,386	5,04
9	Этилацетат — муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (67:7,5:7,5:18)	0,973	0,907	0,842	9,68
10	Эфир — уксусная кислота — гексан — этилацетат (20:20:20:40)	0,830	0,150	0,075	3,54
11	Хлороформ — вода — этанол (60:30:20)	0,951	0,025	0,074	5,80
12	Этилацетат — уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5)	0,975	0,049	0,315	5,24
13	Этилацетат — муравьиная кислота — вода (7,5:1,5:1,5)	0,987	0,962	0,685	5,36
14	<i>n</i> -Бутанол — муравьиная кислота — вода (10:3:7)	0,840	0,733	0,573	6,15
15	<i>n</i> -Бутанол — муравьиная кислота — вода (4:1:2)	0,769	0,641	0,513	5,80
16	<i>n</i> -Бутанол — муравьиная кислота — вода (4:1:1)	0,846	0,705	0,615	5,27
17	Этилацетат — муравьиная кислота — вода (5:1:1)	0,974	0,974	0,821	5,36
18	Эфир — муравьиная кислота — гексан — этилацетат (20:20:20:40)	0,950	0,823	0,468	3,70

$P$  — полярность системы по Л. Снайдеру [9, 10].

Результаты количественного определения полифенольных БАВ в ЛРС (в пересчете на абсолютно сухое ЛРС\*)

№ п/п	ЛРС	Методика ТСХ			Содержание БАВ, %
		$R_f$	L	идентификация БАВ	
1	Листья крапивы двудомной	0,03 ± 0,003	16,65	Неидентифицированная зона	-
		0,34 ± 0,02	1,94	Кверцетин	0,5791 ± 0,0356 0,6434 ± 0,0395*, $\epsilon_{cp} = 6,14\%$
		0,50 ± 0,02	1,38	Танин	0,6519 ± 0,0140 0,7243 ± 0,0156*, $\epsilon_{cp} = 2,15\%$
		0,58 ± 0,02	2,90	Неидентифицированная зона	-
		0,80 ± 0,02	-	Галловая кислота	0,5207 ± 0,0501 0,5785 ± 0,0557* $\epsilon_{cp} = 9,62\%$
2	Плоды облепихи крушиновидной высушенные	0,06 ± 0,003	47,48	Неидентифицированная зона	-
		0,75 ± 0,02	1,32	Неидентифицированная зона	-
		0,83 ± 0,02	-	Галловая кислота	0,0367 ± 0,0011 0,04076 ± 0,0012*, $\epsilon_{cp} = 2,94\%$
3	Кора дуба обыкновенного	0,04 ± 0,002	24,00	Неидентифицированная зона	-
		0,50 ± 0,02	5,00	Танин	0,8171 ± 0,0297 0,90785 ± 0,03298*, $\epsilon_{cp} = 3,63\%$
		0,83 ± 0,02	-	Галловая кислота	0,0838 ± 0,0038 0,09313 ± 0,0042*, $\epsilon_{cp} = 4,51\%$

планшетного сканера (разрешение не менее 300 dpi), а полученные изображения (рис. 2) обрабатывают компьютерной программой “Sorbfil Videodensitometer” (v1.7, производитель ЗАО “Сорбполимер”, Россия, Краснодар). В результате получают треки в координатах  $R_f$  — интенсивность (рис. 3).

Установлены линейные зависимости между содержанием изучаемых БАВ и площадью хроматографической зоны (рис. 4) в диапазоне изучаемых концентраций. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для танина и галловой кислоты наблюдаются нелинейные зависимости площади хроматографической зоны от концентрации стандартного раствора с точка-

ми перегиба при 4,5 и 1,5 мкг/мкл соответственно (рис. 4, а и в). Подобные графики можно было бы описать степенной зависимостью, однако известно, что одним из условий применимости любой методики для количественного определения является наличие линейной зависимости интенсивности сигнала (в данном случае площади хроматографической зоны) от концентрации определяемого вещества в анализируемой пробе. Наличие точки перегиба объясняется снижением коэффициента инструментальной чувствительности определения (“a” в уравнении  $y = ax + b$ ) с увеличением концентрации раствора. Анализ полученных данных позволил установить линейные зависимости меж-

Результаты количественного определения полифенольных БАВ в извлечениях из ЛРС по различным методикам

БАВ	Содержание БАВ, %	
	методика ВЭТСХ	методика, рекомендованная в [4, 5, 11]
<b>Листья крапивы двудомной</b>		
Флавоноиды	Кверцетин: 0,6434 ± 0,0395	Сумма флавоноидов: 1,552 ± 0,034
Дубильные вещества	Танин: 0,7243 ± 0,0156 Галловая кислота: 0,5785 ± 0,0557	Сумма дубильных веществ: 2,750 ± 0,080
<b>Плоды облепихи крушиновидной</b>		
Дубильные вещества	Галловая кислота: 0,04076 ± 0,0012	Сумма дубильных веществ: 0,534 ± 0,015
Флавоноиды	Кверцетин: не обнаружен	Сумма флавоноидов: 0,550 ± 0,061

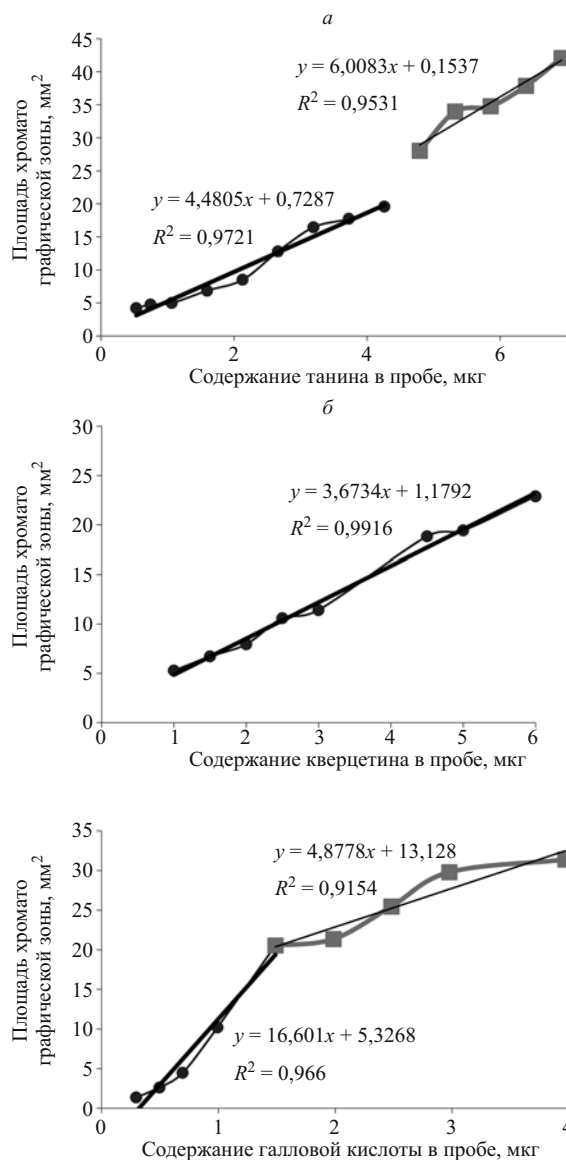
ду содержанием танина и галловой кислоты в пробе, нанесенной на хроматограмму, и интенсивностью окраски хроматографической зоны в диапазонах изучаемых концентраций (0,5 – 4,5 и 5,0 – 7,0 мкг/мкл) и (0,3 – 1,5 и 1,5 – 4,0 мкг/мкл) соответственно. Ошибка в определении содержания танина будет уменьшаться с увеличением “*a*” в уравнении  $y = ax + b$ , следовательно, применение градуировочного графика для определения содержания танина, где  $a = 6,0083$  (рис. 4, *a*) приводит к более точным результатам по сравнению с результатами, полученными по графику в диапазоне концентраций 0,5 – 4,5 мкг/мкл, где  $a = 4,4805$ . Ошибка в определении содержания галловой кислоты будет меньше с применением градуировочного графика в области концентраций 0,3 – 1,5 мкг/мкл, где  $a = 16,601$  (рис. 4, *в*) по сравнению с результатами, полученными по графику в диапазоне концентраций 1,5 – 4,0 мкг/мкл, где  $a = 4,8778$ . Наличие в регрессионных уравнениях коэффициентов *b*, отличных от нуля, говорит о постоянной систематической ошибке, обусловленной влиянием яркости фона пластины, на оценку яркости окрашенной хроматографической зоны при обработке хроматограммы компьютерной программой “Sorbfil Videodensitometer”.

Разработанная методика была апробирована на ЛРС различных морфологических групп (на примере коры дуба обыкновенного, листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной). Извлечение из исследуемого ЛРС готовили по ОФС ГФ XIII изд. “Настои и отвары” [11]. Полученные вытяжки хроматографировали восходящим способом в условиях разработанной методики. Сразу же после проявления хроматограмм пластины сканируют, а полученные изображения обрабатывают с помощью компьютерной программы “Sorbfil Videodensitometer”. Результаты идентификации в сравнении с достоверными стандартными образцами и количественного определения изучаемых БАВ в извлечениях из ЛРС, а также средняя ошибка определения ( $\varepsilon_{ср}$ , %) представлены в табл. 4.

Для каждой хроматографической зоны на хроматограммах были рассчитаны величины селективности сорбции (*L*) (табл. 4), свидетельствующие об удовлетворительном разделении хроматографических зон полифенольных БАВ на хроматограммах и правомерности использования данной методики.

Результаты количественного определения исследуемых БАВ в извлечениях из ЛРС по описанной методике сравнивали с результатами определения по методикам, изложенным в ГФ XIII для флавоноидсодержащего ЛРС [11] и другой литературе [4, 5], и представлены в табл. 5. Более высокие значения содержания данных БАВ в изучаемом ЛРС, полученные по методикам, рекомендованным в литературе [4, 5, 11], связаны с тем, что последние позволяют определять только их суммарное содержание, без достоверной информации о присутствии отдельных компонентов.

Таким образом, разработана методика разделения и количественного определения полифенольных БАВ



**Рис. 4.** Градуировочные графики для определения содержания в извлечениях из ЛРС: *a* — танина в области концентраций (0,5 – 4,5 и 5,0 – 7,0 мкг/мкл); *б* — кверцетина в области концентраций (1,0 – 6,0 мкг/мкл); *в* — галловой кислоты в области концентраций (0,3 – 1,5 и 1,5 – 4,0 мкг/мкл).

при совместном присутствии (на примере танина, галловой кислоты и кверцетина) методом фронтальной ТСХ. Методика может быть использована в контроле качества субстанций, монокомпонентных и комплексных препаратов, ЛРС и БАД. Новизна проведенных исследований подтверждена патентом РФ на изобретение № 2597661 от 06.07.2015 г. [12].

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Мальцева, А. С. Чистякова, А. А. Сорокина и др., *Вестник ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация*, № 2, 203 – 205 (2013).
2. Е. Н. Гринько, *Фармация*, № 5, 49 – 53 (2010).
3. Е. Н. Гринько, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Москва (2011).
4. О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, *Фармация*, № 1, 16 – 19 (2014).

5. О. В. Тринеева, Н. С. Шикунова, А. И. Сливкин, *Фармация*, № 3, 16 – 21 (2016).
6. И. В. Попов, И. Н. Андреева, М. В. Гаврилин, *Хим.-фарм. журн.*, 37(7), 24 – 26 (2003).
7. В. В. Чумакова, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Пятигорск (2013).
8. О. В. Тринеева, Н. С. Шикунова, А. И. Сливкин, *Материалы VII Всероссийской конференции “Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах — ФАГРАН-2015”*, Воронеж (2015), сс. 569 – 570.
9. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии*, Мир, Москва (1999).
10. О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров и др., *Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии*, Водолей, Воронеж (2004).
11. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, XIII изд., Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва (2015); Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.
12. Патент РФ 2597661, *Бюл. изобрет.*, № 26 (2015).

Поступила 05.01.17

## DEVELOPMENT OF METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN MEDICINAL PLANT RAW MATERIALS AND HERBAL PREPARATIONS BY THE STEPWISE ELUTION IN THIN LAYER OF SORBENT

O. V. Trineeva, E. F. Safonova, and A. I. Slivkin

Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

A cost-effective and rapid procedure to identify and quantify polyphenolic active ingredients of plant origin (for example, gallic acid, quercetin, and tannin) by high performance thin-layer chromatography (HPTLC) in stepwise elution has been developed. Experimentally and theoretically grounded, optimum selected conditions of chromatography in a thin layer of sorbent were determined from the quantitative interpretation of the HPTLC data on a personal computer. The proposed method was tested on medicinal raw materials of nettle leaves, oak bark, and ordinary sea buckthorn fruits. The technique can be used in quality control of substances, monocomponent and complex preparations, raw plant materials, dietary supplements, premixes, and products of the food and cosmetic industries.

**Keywords:** polyphenolic biologically active substances; gallic acid; tannin; quercetin; high performance thin-layer chromatography.