

Д. Н. Оленников, Л. М. Танхаева

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

Разработана методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в листьях подорожника большого с относительной ошибкой не более 4 %. Проведенный метрологический анализ показал, что методика является правильной и воспроизводимой. Содержание флавоноидов в листьях подорожника большого в пересчете на байкалин находится в пределах 2,12 – 3,45 %.

Подорожник большой (*Plantago major* L.) сем. *Plantaginaceae* — лекарственное растение, широко используемое в медицинской практике. Из листьев подорожника большого разными исследователями было выделено 12 соединений флавоноидной природы: байкалин, байкалин, скутелляреин, гиспидулин, гиспидулин-7-глюкуронид, плантагинин, гомоплантагинин, 6-гидрокси-4'-метокси-лютеолин-7-галактозид, непетин-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, лютеолин-7-глюкозид, лютеолин-7-диглюкозид [1 – 5]. В доступной литературе нам не удалось обнаружить сведений о количественном содержании флавоноидов в данном растительном объекте.

Целью настоящей работы явилась разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в листьях подорожника большого.

Экспериментальная часть

Растительным объектом служили листья подорожника большого, приобретенные через аптечную сеть (ОАО “Красногорсклексредства”). Спектры поглощения регистрировали на приборе Cecil CE 2011, Agilent 8453E UV-Vis в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Оптическое вращение определяли на поляриметре Coers, $l = 10$ см при 20 °С. Температуру плавления определяли на приборе для определения температуры плавления IA-9100. ВЭЖХ проводили с использованием микроколонного хроматографа Милихром А-02. Условия хроматографирования: колонка 2×75 мм, сорбент ProntoSIL-120-5-C-18 AQ (номер 0322, 5 мкм), температура 35 °С, давление — 3,2 МПа, скорость элюирования — 150 мкл/мин, УФ-детектирование при 244, 260, 320 нм. Элюент 0,1 % ТФУ в MeOH [6].

Выделение байкалина из корней шлемника байкальского по следующей схеме. Измельченное сырье экстрагировали 70 % спиртом этиловым (1:10) трижды, извлечение концентрировали до водного остатка, который подвергали жидкофазной экстракции гексаном. Далее водный остаток подкисляли и экстрагировали смесью этилацетат — 95 % спирт этиловый (9:1). Межфазный осадок отфильтровывали, промывали охлажденным 95% спиртом этиловым, высушивали. Технический продукт растворяли в минимальном объеме ДМСО, раствор разбавляли водой очищенной

(1:250 – 300) и оставляли при температуре 1 – 2 °С. Через 12 ч осадок отфильтровывали, промывали водой очищенной и высушивали. Переосаждение повторяли еще дважды.

Контроль на стадиях выделения проводили методом тонкослойной хроматографии (пластины Silufiol, Sorbfil; система растворителей: бензол – спирт этиловый – метилэтилкетон – ацетон (40:16:3:1); детектор — 5 % раствор алюминия хлорида в 95 % спирте этиловом) и ВЭЖХ.

Физико-химические характеристики выделенного продукта представлены в табл. 1.

Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в листьях подорожника большого. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1,0 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 60 мл 60 % спирта этилового, присоединяют обратный холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 200 мл через бумажный фильтр, который промывают 10 мл 60 % спирта этилового. Извлечение повторяют в тех же условиях еще раз и доводят объем объединенного фильтрата до метки 60 % спиртом этиловым (раствор А). 2 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки 60 % спиртом этиловым (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 282 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 60 % спирт этиловый. Параллельно определяют оптическую плотность раствора стандартного образца байкалина.

Суммарное содержание флавоноидов (X , %) в пересчете на байкалин и абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_{\text{ст}} \cdot k^V}{D_{\text{ст}} \cdot m \cdot k_{\text{ст}}^V} \cdot \frac{100}{100 - W} \cdot 100,$$

где D — оптическая плотность исследуемого раствора; $D_{\text{ст}}$ — оптическая плотность раствора стандартного образца байкалина; k^V — коэффициент разбавления

Сравнительная характеристика физико-химических величин байкалина

Параметр	Образец байкалина (серия 120205)	Aldrich (CAS № 21967-41-9)	Данные литературы [7]
Т. пл., °С	219 – 221		220 – 222
α_D^{20} (с. 1.0, ДМСО)	-83	-85	
УФ, λ_{\max} , нм, EtOH	245, 280, 312		245, 277, 313
УФ, λ_{\max} , нм, +AlCl ₃	290, 340		289, 340
Содержание основного вещества (ВЭЖХ), %	94 – 96	95	

Таблица 2
Метрологические характеристики разработанной методики (сырье ОАО «Красногорсклексредства» Серия 010104)

<i>n</i>	\bar{x} , %	S^2	S_x	<i>P</i>	$t(p, f)$	$\pm \Delta x$, %	<i>E</i> , %
9	2,22	$7,94 \cdot 10^{-3}$	$2,97 \cdot 10^{-2}$	95	2,36	0,07	3,21

исследуемого раствора (2500); $k_{ст}^V$ — коэффициент разбавления раствора стандартного образца байкалина (2500); *m* — масса навески сырья, г; $m_{ст}$ — масса навески байкалина, г; *W* — потеря в массе при высушивании сырья, %.

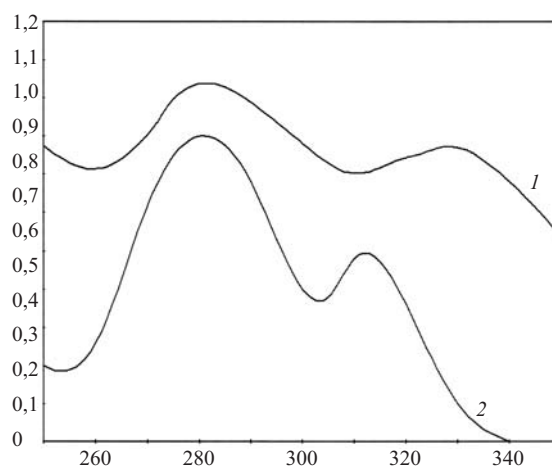
Приготовление стандартного раствора байкалина. Около 0,015 г (точная навеска) байкалина помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 2 мл ДМСО и доводят объем раствора до метки 60 % спиртом этиловым (раствор А). 2 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят до метки 60 % спиртом этиловым.

Расчет суммарного содержания флавоноидов можно вести также с использованием величины удельного коэффициента погашения байкалина ($E_{1\text{см}}^{1\% 610}$) либо с применением градуировочного графика. Различие полученных значений, рассчитанных по трем способам, не превышает 4 – 5 %.

Метрологическую обработку результатов проводили согласно рекомендациям [8 – 11]. Инструментальную ошибку спектрофотометра ($K_{инстр}$) рассчитывали по бихромату калия [12]. Регрессионный анализ выполняли с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.07 (Alentum Software Inc.).

Результаты и их обсуждение

Состав флавоноидов листьев подорожника большого довольно сложен. При исследовании вида спектра поглощения спиртового извлечения из листьев подорожника большого установлено, что его максимум находится при 282 нм, что вполне объяснимо, так как из 12 выделенных флавоноидов 9 веществ являются 6-оксифлавонами, для которых характерно наличие максимума в области 275 – 285 нм [13, 14]. В качестве стандартного вещества был выбран байкалин, максимум спектра поглощения которого (280 нм) близок к такому извлечению из листьев подорожника большого. В качестве аналитической длины волны нами выбрана точка при 282 нм.



Спектры поглощения спиртового извлечения из листьев подорожника большого (1) и раствора байкалина (2) в 60 % спирте этиловом. По оси абсцисс — длина волны, нм; по оси ординат — оптическая плотность, опт. ед.

Линейность оптической плотности в диапазоне 0,2 – 0,7 опт.ед. наблюдается для растворов байкалина с концентрациями 3,5 – 11,5 мкг/мл. Уравнение линейной регрессии для градуировочного графика имеет вид: $D = 0,0630465x - 0,0205388$ (стандартное отклонение $1,01 \cdot 10^{-2}$, коэффициент регрессии 0,9986, $K_{инстр}$ 0,98).

При определении оптимальных параметров экстракции установлено, что максимальное извлечение флавоноидов достигается при использовании в качестве экстрагента 60 % спирта этилового. При соотношении сырье – экстрагент 1:60 в условиях кипения равновесие наступает через 1 ч. Двукратная экстракция обеспечивает максимальное извлечение флавоноидов (до 97 % от суммарного содержания).

Оценку правильности разработанной методики проводили с использованием общепринятых экспериментов способом “введено-найденно” и анализа стандартного образца байкалина [15].

При исследовании методики способом “введено-найденно” установлено, что относительная ошибка не превышает 3 %. Анализ стандартного образца байкалина показал, что относительная ошибка единичного измерения находится в интервале 0 – 3,13 % и может быть как положительной, так и отрицательной. Средняя ошибка трех определений для трех образцов находится в достаточно узких пределах 0,85 – 1,98 %. Таким образом, можно утверждать то, что анализируе-

мый компонент определяется с достаточной точностью и результаты анализа можно считать правильными.

Отклонение от среднего в эксперименте из трех независимых определений не превышает 2 %, что свидетельствует об удовлетворительной воспроизводимости методики.

Метрологические характеристики разработанной методики приведены в табл. 2. Относительная ошибка определения не превышает значения 3,5 %.

С помощью разработанной методики определено содержание флавоноидов в 9 образцах сырья; оно находится в пределах 2,12 – 3,45 %. Содержание флавоноидов в листьях подорожника большого в пересчете на байкалин должно быть не менее 2 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. П. Максютин, *Химия природ. соед.*, **7**(3), 374 – 375 (1971).
2. Н. П. Максютин, *Фармацевтический журнал*, **27**(1), 59 – 63 (1972).
3. J. B. Harborne and C. A. Williams, *Phytochemistry*, **10**(2), 367 – 378 (1971).
4. S. A. Kawashty, Gamal-el-din, M. F. Abdalla, N. A. M. Saleh, *Biochemical Systematic and Ecology*, **22**(7), 729 – 733 (1994).
5. S. Nishibe, M. Murai, and Y. Tamayama, *Nat. Med.*, **49**(3), 340 – 342 (1995).
6. Д. Н. Оленников, Т. М. Михайлова, Л. М. Танхаева, *Химия природ. соед.*, **41**(2), 177 (2005).
7. В. М. Маликов, М. П. Юлдашев, *Химия природ. соед.*, **38**(4), 299 – 324 (2002).
8. Ю. И. Александров, В. И. Беляков, *Ж. аналит. химии*, **57**(2), 118 – 129 (2002).
9. М. И. Булатов, М. П. Калинин, *Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа*, Химия, Ленинград (1976).
10. А. Н. Смагунова, *Журн. аналит. химии*, **52**(10), 1022 – 1029 (1997).
11. К. Дерффель, *Статистика в аналитической химии*, Мир, Москва (1994).
12. Ю. Я. Харитонов, *Аналитическая химия (аналитика)*, Высшая школа, Москва, (2001).
13. О. И. Костюченко, *Растит. ресурсы*, **13**(2), 403 – 417 (1977).
14. T. J. Mabry, K. R. Markham, and K. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New-York, (1970).
15. *Основы аналитической химии*, Ю. А. Золотов (ред.), кн. 1, Высшая школа, Москва (2002).

Поступила 02.02.06

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL FLAVONOID CONTENT IN *Plantago major* LEAVES

D. N. Olennikov and L. M. Tankhaeva

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Buryat Republic, Russia;

A method for the quantitative determination of total content of flavonoids in *Plantago major* L. leaves has been developed, which ensures analyses with a relative error not exceeding 4%. The metrological verification showed that the proposed technique is correct and reproducible. The total content of flavonoids in *Plantago major* L. leaves (recalculating for baicaline) is typically within 2.12 – 3.45%.