

М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко, Р. М. Гусов

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЭЖХ И КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТЕКСИНА-2-О-РАМНОЗИДА В ТРАВЕ ОВСА ПОСЕВНОГО

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Проведены исследования по разработке методики количественного определения действующих веществ в траве овса посевного. В качестве маркерного компонента был выбран витексина-2-О-рамнозид. Для разработки методики анализа использованы методы ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. При ВЭЖХ анализе на обращеннофазной колонке (4,6 × 150 мм) в градиентном режиме установлено наличие более 40 компонентов. Содержание витексина-2-О-рамнозида составляло от 0,04 до 0,18 %. Установлено, что витексина-2-О-рамнозид накапливается в листьях и стеблях, его содержание в метёлках значительно ниже. Методом капиллярного электрофореза в кварцевом капилляре с использованием боратного буфера подтверждены полученные результаты.

В настоящее время перспективным источником получения лекарственных средств (ЛС) является трава овса посевного, собранная в фазе молочной спелости. В Государственный реестр ЛС России этот вид сырья введён сравнительно недавно. Для данного вида сырья характерно накопление широкого спектра биологически активных веществ (БАВ). Одними из них являются фитостерины — авенацин и β-амирин, которые синтезируются растением из сквалена и 2,3-диоксисквалена [1]. Другой группой БАВ являются флавоноидные соединения, среди которых следует выделить С-гликозиды флавоноидов, являющиеся специфичными для данного вида сырья (витексин, изовортизин-2-изорамнозид, изовитексин-2-арабинозид, изориентин-2-арабинозид, изоскопарин и 6,8-ди-С-глюкозиллапигенин). Данные соединения обладают выраженной антиоксидантной активностью и могут рассматриваться как вещества, определяющие биологическую активность травы овса посевного. В связи с этим витексин и его гликозиды можно использовать для оценки качества сырья. В [2] выделены изоориентин, ориентин, мультифлорины А и В, а также шафтозид и изошафтозид, кроме того, из травы овса выделены трицин и флаволигнаны на его основе [3]. В данном сырье также присутствуют фенолокислоты — *n*-кумаровая, феруловая, сиреневая, синапиковая и *n*-гидроксibenзойная, а также специфичные полифенольные соединения авенантрамиды А и В [4–5].

Следует отметить, что авенантрамиды характерны для плодов овса. По своей химической структуре они являются производными α-пирролидона, в котором имеется 4 полифенольных заместителя. Эти соединения можно также рассматривать как амиды 5-гидроксиантраниловой кислоты [6, 7], для которых доказаны выраженная антиоксидантная и антиатеросклеротическая активности [8–10]. Ранее из травы овса также были выделены 5-, 6- и 7-гидрокси-*n*-гентриаконтан-16,17-дион [11], однако в дальнейшем выделение и изучение этих соединений не освещалось в зарубежной научной литературе.

В действующей нормативной документации на данное сырьё основным маркерным компонентом принят витексина-2'-О-арабинозид. Идентификация сырья проводится методом ТСХ по величинам  $R_f$  без использования стандартных образцов специфических флавоноидных соединений [12].

Для количественного определения суммы флавоноидов используется прямое спектрофотометрическое определение в пересчете на витексина-2'-О-арабинозид. Расчет содержания проводят с использованием удельного показателя поглощения. Следует отметить, что спектрофотометрическому анализу подвергается непосредственно спиртоводное извлечение из сырья, без предварительного выделения суммы флавоноидов. Такая схема анализа неизбежно приводит к наличию существенной систематической погрешности.

Кроме того, измерение проводят при длине волны 338 нм, в то время как максимум поглощения витексина находится при длине волны 350 нм. Поэтому использование данного метода можно считать нецелесообразным, так как он не позволяет объективно оценить качество сырья.

В связи с этим целью настоящей работы была разработка методик идентификации и количественного определения действующих веществ в траве овса посевного с использованием стандартных образцов специфических для данного растения флавоноидов.

Для анализа данного препарата в качестве маркерного компонента был выбран витексина-2'-О-рамнозид, так как по некоторым литературным данным он превалирует в сырье.

### Экспериментальная часть

В исследованиях использовали траву овса посевного, собранную в фазе молочной спелости в мае 2005 года. Все образцы сырья были предоставлены ЗАО “Эвалар” (г. Бийск, Алтайского края).

Исследования проводили с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Россия), жидкостного хроматографа “Стайер” фирмы Аквилон (Россия-США-Че-

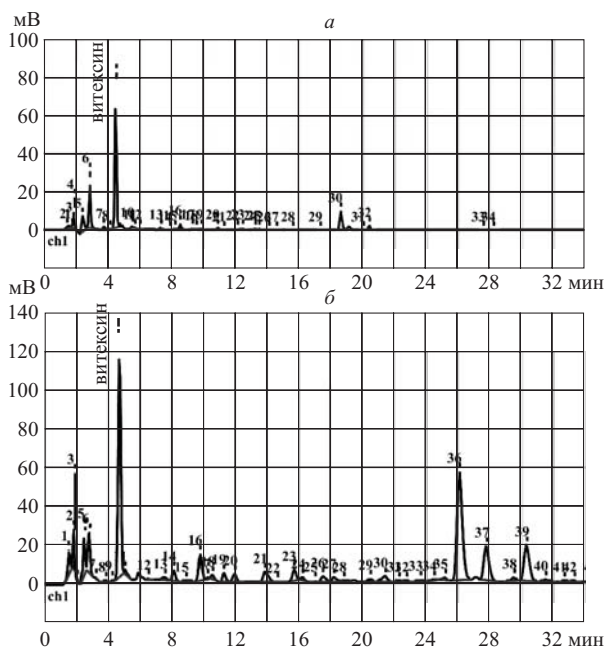


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из травы овса серии: *a* — 02052005, *b* — 03052005

хия), снабженного колонкой Luna C-18 4,6Ч150 мм (Phenomenex, США), с содержанием углерода около 16 %.

Для электрофоретического разделения флавоноидов травы овса посевного использовали систему капиллярного электрофореза “Капель 103Р” (ОАО “НПФ Люмэкс”, Россия) с кварцевым капилляром диаметром 50 мкм, общей длиной 75 см и эффективной длиной 65 см. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм. В качестве ведущего электролита использовали раствор натрия тетрабората (20 мг/мл), ввод пробы осуществляли давлением 150 мБар × с. Перед введением пробы извлечение из сырья разводили 1:1 водой очищенной и центрифугировали при 8000 мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин. Электрофорез проводили под напряжением в 20 кВ.

Предварительно был установлен характер спектра поглощения стандартного образца витексина-2'-О-рамнозида, максимум поглощения которого в спирте этиловом находился при длине волны 350 нм.

Для проведения хроматографического анализа был выбран градиентный режим элюирования. В качестве растворителей использовали ацетонитрил и раствор кислоты муравьиной (20 г/л).

#### Результаты количественного определения витексина-2'-О-рамнозида методом ВЭЖХ (*n* = 5)

Серия сырья	Площадь пика, мВ · с	Содержание витексина-2'-О-рамнозида, %	Случайная погрешность, %
01052005	973,59	0,0778	3,95
02052005	542,97	0,0404	4,81
03052005	2099,24	0,1812	3,27
04052005	1388,1	0,1186	3,59
05052005	1702,4	0,1486	3,43

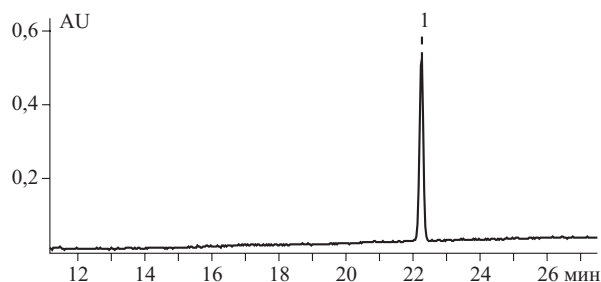


Рис. 2. Электрохроматограмма стандартного раствора витексина-2'-О-рамнозида

Концентрацию ацетонитрила изменяли от 20 до 60 % за 40 мин, при расходе элюента 1 мл/мин. В этих условиях установлено, что пик витексина-2'-О-рамнозида симметричен. Градуировочная зависимость наблюдается в широком диапазоне концентраций (0,005 – 0,5 мг/мл) и выражается следующим уравнением:  $y = 18730x + 95,462$ .

Для экстракции суммы флавоноидов из сырья на основании литературных данных был использован спирт этиловый 40 %. Для извлечения точную навеску сырья, около 3,0 г, измельченную до частиц размером не более 1 мм, помещали в колбу с притёртой пробкой, заливали 50 мл выбранного экстрагента, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1,5 ч. Полученное извлечение фильтровали в горячем виде в мерную колбу вместимостью 50 мл, а после охлаждения до комнатной температуры доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Полученный раствор перед анализом фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. В указанных условиях эффективность колонки, рассчитанная по пику витексина-2'-О-рамнозида должна быть 8000 – 9000 теоретических тарелок, коэффициент ёмкости для данного соединения составлял 3,6 – 3,9; коэффициент разделения пика витексина-2'-О-рамнозида от соседних пиков находился в интервале 1,5 – 1,7.

На рис. 1 представлены хроматограммы извлечений из исследуемого сырья.

Как следует из представленных данных, хроматографические профили извлечений из различных образцов сырья существенно отличаются, однако везде одним из основных пиков является пик, принадлежащий витексину-2'-О-рамнозида. В траве овса также были обнаружены в следовых количествах лютеолин и рутин. Количественное определение витексина-2'-О-рамнозида в пересчёте на сухое сырьё проводили по уравнению градуировочного графика. Полученные результаты представлены в таблице.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что содержание витексина-2'-О-рамнозида в различных образцах травы овса колеблется в пределах 0,04 – 0,18 % в пересчёте на сухое сырьё. В ходе выполнения работы представляло интерес выяснить, в какой части сырья содержание витексина-2'-О-рамнозида максимальное. Для этого на примере сырья, со-

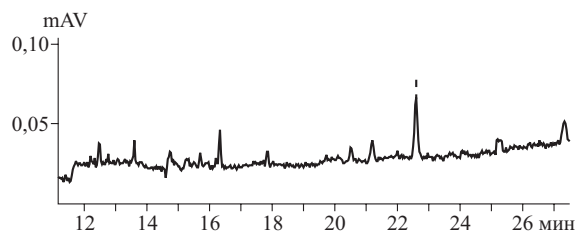


Рис. 3. Электрофореграмма извлечения из травы овса серии 03052005

державшего наибольшее количество витексина-2'-О-рамнозида (серия 03052005), был проведён анализ метёлок и остальной части — стеблей и листьев. При этом установлено, что в метёлках содержание витексина-2'-О-рамнозида составляет 0,02 – 0,06 %, а в остальных частях растения 0,11 – 0,15 %.

Следующим этапом исследований стало количественное определение витексина-2'-О-рамнозида в исследуемом сырье при помощи капиллярного электрофореза. Целью данной работы было подтверждение результатов, полученных методом ВЭЖХ. Метод капиллярного электрофореза обеспечивает очень высокую эффективность разделения и открывает широкие возможности в анализе фенольных соединений при использовании щелочных буферных растворов. При выполнении исследований установлено, что витексина-2'-О-рамнозид фиксируется на электрофореграмме в виде одного симметричного пика, которому соответствует сигнал на электрофореграмме извлечения из сырья (рис. 2, 3).

Анализ образца серии 02052005 данным методом показал содержание витексина-2'-О-рамнозида в коли-

честве 0,041 %, что согласуется с результатами, полученными методом ВЭЖХ.

Таким образом, с использованием ВЭЖХ в обращено-фазовом варианте разработана методика количественного определения витексина-2'-О-рамнозида в траве овса посевного. Данные результаты были подтверждены методом капиллярного электрофореза с использованием боратного электролита. Кроме того, методом ВЭЖХ установлено, что значительная часть витексина-2'-О-рамнозида накапливается в стеблях и листьях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. M. R. Trojanowska, A. E. Osbourn, M. J. Daniels, and D. R. Threlfall, *Phytochemistry*, **54**(2), 153 – 164 (2000).
2. J. Chopin, G. Dellamonica, and M. L. Bouillant, *Phytochemistry*, **12**(12), 2041 – 2043 (1977).
3. E. Wenzig, O. Kunert, and D. Ferreira, *J. Nat. Prod.*, **68**(2), 289 – 292 (2005).
4. L. Nie, M. L. Wise, D. M. Peterson, and M. Meydani, *Atherosclerosis*, No. 8, 2001 (2005).
5. C. Y. Chen, P. E. Milburu, H. K. Kwak, *J. Nutr.*, **134**(6), 1459 – 1466 (2004).
6. Y. Okazaki, A. Ishihara, T. Nishioka, and H. Iwamura, *Tetrahedron*, **60**(22), 4765 – 4771 (2004).
7. D. M. Peterson, M. J. Hahn, and C. L. Emmons, *Food Chemistry*, **79**(4), 473 – 478 (2002).
8. L. Liu, L. Zubik, F. William, et al., *Atherosclerosis*, **175**(1), 39 – 49 (2004).
9. Li Li Ji, D. Lay, E. Chung, et al., *Nutr. Res.*, **23**(11), 1579 – 1590 (2003).
10. D. M. Peterson, C. L. Emmons, and A. H. Hibbs, *J. Cereal Sci.*, **33**(1), 97 – 103 (2001).
11. P. J. Dierickx and K. Buffel, *Phytochemistry*, **11**(8), 2654 – 2655 (1972).
12. И. А. Самылина, В. А. Северцев, *Лекарственные растения государственной фармакопеи*, Фармакогнозия, Медицина, Москва (2003), сс. 303 – 307.

Поступила 22.08.06

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITEXIN-2-O-RHAMNOSIDE IN OATS (*Avena Sativa* L.) USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

M. V. Gavrilin, S. P. Senchenko, and R. M. Gusov

Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Russia

Methods for the quantitative determination of active substances in oats (*Avena sativa* L.) have been developed. Vitexin-2-O-rhamnoside is selected as a marker component. The proposed analyses employ high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CEP). More than 40 components are detected by reverse-phase HPLC on a 4.6 × 150 mm column under gradient conditions. The content of vitexin-2-O-rhamnoside varies from 0,04 to 0,18 %. This compound is accumulated predominantly in leaves and stems, while a much lower content is found in panicles. These results are confirmed by means of CEP using quartz capillary and borate buffer.