

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-47-51
© Коллектив авторов, 2019

В. А. Куркин*, П. В. Белов, В. М. Рыжов

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ПОЧКАХ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО

Самарский государственный медицинский университет, Россия, Самара
* e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 422 нм в пересчете на рамноцитрин или 7-О-метилкемпферол (3,5,4¹-тригидрокси-7-метоксифлавоноид), который является доминирующим флавоноидом данного сырья. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 2,23$ %. Содержание суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного варьирует от $(1,24 \pm 0,01)$ % до $(2,31 \pm 0,03)$ %.

Ключевые слова: каштан конский обыкновенный; *Aesculus hippocastanum* L.; почки; флавоноиды; рамноцитрин; стандартизация; спектрофотометрия.

Каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.) — многолетнее древесное растение, семена и листья которого служат источником лекарственных препаратов (эскузан, венитан, эссавен, анавен, эсфлазид и др.), широко применяемых для лечения варикоза нижних конечностей и геморроя [1 – 9]. Уникальные фармакологические свойства препаратов на основе семян данного растения определяются такими биологически активными соединениями (БАС), как сапонины (эсцин, представляющий собой смесь α -эсцина, β -эсцина и криптоэсцина), флавоноидами (кемпферол, кверцетин, кверцитрин, изокверцитрин) и кумаринами (эскулетин, эскулин, фраксин). Капилляроукрепляющий эффект препаратов на основе листьев каштана конского, в частности, эсфлазила, обусловлен флавоноидами (3-глюкозид кемпферола, 3-арабинозид кемпферола, 3-рамноглюкозид кемпферола, кверцитрин, изокверцитрин, рутин и спироэзид) [4, 5]. Перспективным источником БАС являются почки данного растения, которые, по предварительным данным, содержат флавоноиды.

Целью данной работы являлась разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили почки каштана конского, заготовленные в марте – мае 2012 – 2018 гг. на территории Ботанического сада Самарского университета (Самара), а также в Ульяновской и Пензенской областях. Регистрацию УФ-спектров проводили с использованием спектрофотометра “Specord 40” (Analytik Jena). Метод спектрофотометрии хорошо за-

рекомендовал себя при количественном определении БАС в растительном сырье [10].

Предварительную оценку компонентного состава флавоноидов почек каштана конского обыкновенного осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках “Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ” в системе хлороформ — этиловый спирт (9:1) с использованием достоверно известных веществ — кемпферола, кверцетина и рутина. В исследуемом водно-спиртовом извлечении было определено наличие доминирующего вещества флавоноидной природы с величиной R_f около 0,7, однако при этом кемпферол, кверцетин и рутин, характерные для листьев каштана конского обыкновенного, не были обнаружены.

Выделение доминирующего флавоноида из почек каштана конского обыкновенного проводили с помощью препаративной колонной хроматографии. Для этих целей нами было получено извлечение из 100 г почек каштана конского обыкновенного с помощью 70 % этилового спирта в соотношении 1:10, которое упаривали под вакуумом, наносили на силикагель L 40/100 и сушили. Разделение веществ осуществляли методом колонной хроматографии на силикагеле L 40/100, в качестве элюентов использовали хлороформ, а также смеси хлороформа и этилового спирта в соотношениях 99:1; 98:2; 97:3. Элюаты делили на фракции примерно одинакового объема (по 200 мл), затем упаривали под вакуумом.

Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 98:2, выделили доминирующее вещество с величиной R_f 0,70, идентификацию которого проводили с помощью УФ, ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии.

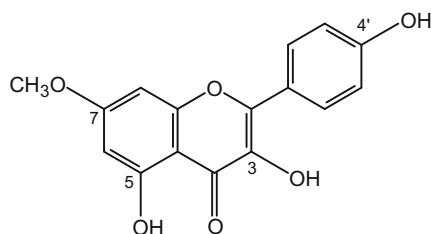


Рис. 1. Структурная формула рамноцитрина.

Спектральные и физико-химические свойства рамноцитрина или 7-О-метилкемпферола (3,5,4'-тригидрокси-7-метоксифлавонон). Желтый кристаллический порошок состава $C_{16}H_{12}O_6$ с $T_{пл}$ 226–228 °С, УФ-спектр: λ_{max}^{EtOH} — 274 и 375 нм; + NaOAc 274, 375 нм; + NaOAc + H_3BO_3 274, 376 нм; + $AlCl_3$ 280, 424 нм; + NaOMe 253, 277, 434 нм.

1H ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,48 (с, 1H, 5-OH), 10,12 (с, 1H, 4'-OH), 9,50 (с, 1H, 3-OH), 8,07 (д, 2H, 9 Гц, H-2',6'), 6,95 (д, 2H, 9 Гц, H-3',5'), 6,75 (д, 1H, 2,5 Гц, H-8), 6,34 (д, 1H, 2,5 Гц, H-6), 3,87 (с, 3H, CH_3O).

^{13}C ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , δ_C , м.д.): C-4 (176,01), C-2 (164,89), C-7 (160,36), C-4' (159,31), C-5 (156,09), C-9 (136,95), C-2' (130,18), C-6' (129,56), C-1' (121,57), C-3' (115,64), C-5' (115,44), CH_3O (55,99).

Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): M^+ 301 (300 + H), M^+ 339 (300 + K).

Совокупность физико-химических констант и спектральных характеристик позволяет идентифицировать выделенный флавоноид как 3,5,4'-тригидрокси-7-метоксифлавонон (рамноцитрин) [11].

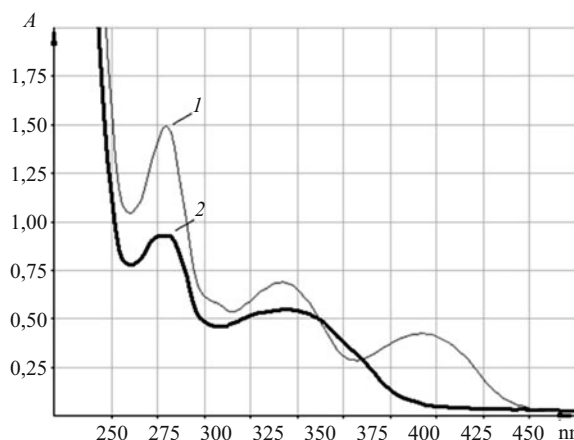


Рис. 2. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного: 1 — раствор извлечения; 2 — раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида.

Результаты и их обсуждение

В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из данного сырья (рис. 2 и 3). Определено, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения почек каштана конского наблюдается bathochromic сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 2), как и в случае рамноцитрина (рис. 4). Изучение УФ-спектров стандарта рамноцитрина показало, что данный раствор в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при длине волны 422 нм (рис. 4). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из почек каштана конского в дифференциальном варианте обнаруживается при длине волны 422 нм максимум поглощения (рис. 5), который соответствует мак-

Таблица 1

Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из почек каштана конского

№ п/п	Экстрагент	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин и абсолютно сухое сырье, %
1	40 % этиловый спирт	1:50	60 мин	1,44 ± 0,02
2	50 % этиловый спирт	1:50	60 мин	1,39 ± 0,03
3	60 % этиловый спирт	1:50	60 мин	1,67 ± 0,03
4	70 % этиловый спирт	1:50	60 мин	2,31 ± 0,03
5	80 % этиловый спирт	1:50	60 мин	2,05 ± 0,03
6	96 % этиловый спирт	1:50	60 мин	1,91 ± 0,04
7	70 % этиловый спирт	1:50	30 мин	2,04 ± 0,02
8	70 % этиловый спирт	1:50	45 мин	1,84 ± 0,01
9	70 % этиловый спирт	1:50	60 мин	2,20 ± 0,01
10	70 % этиловый спирт	1:50	75 мин	1,77 ± 0,01
11	70 % этиловый спирт	1:50	90 мин	2,13 ± 0,02
12	70 % этиловый спирт	1:50	105 мин	1,98 ± 0,01
13	70 % этиловый спирт	1:50	120 мин	2,07 ± 0,02
14	70 % этиловый спирт	1:30	60 мин	1,88 ± 0,02
15	70 % этиловый спирт	1:50	60 мин	2,20 ± 0,01
16	70 % этиловый спирт	1:100	60 мин	2,22 ± 0,02

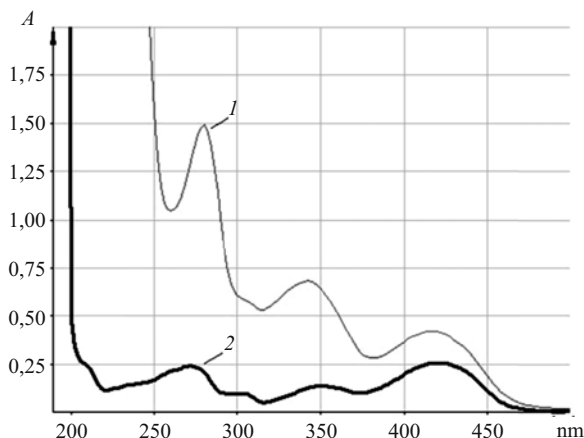


Рис. 3. Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного (1) и спиртового раствора рамноцитрина (2) с добавлением алюминия хлорида.

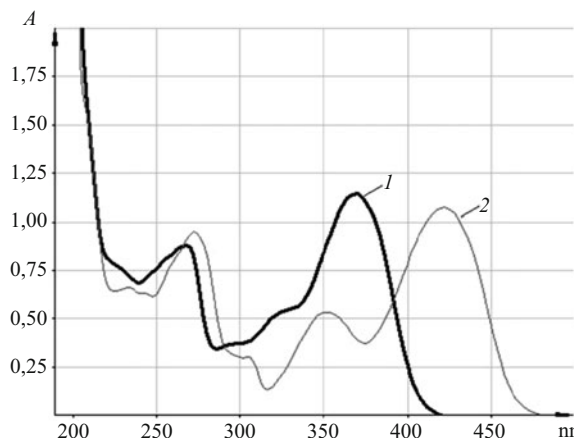


Рис. 4. Электронные спектры спиртовых растворов рамноцитрина: 1 — исходный раствор; 2 — раствор с добавлением алюминия хлорида.

симуму поглощения спиртового раствора рамноцитрина (рис. 6). Следовательно, именно рамноцитрин во многом определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного (рис. 3–6), особенно в дифференциальном варианте (рис. 5 и 6), а, значит, является диагностически значимым флавоноидом для данного вида сырья. Принимая во внимание тот факт, что максимумы поглощения раствора рамноцитрина и водно-спиртового извлечения почек каштана конского в дифференциальном варианте совпадают (422 нм), целесообразным является определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин при длине волны 422 нм.

Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход флавоноидов как потенциальных БАС из сырья были определены оптимальные условия экстракции флавоноидов из почек каштана конского: экстрагент 70 % этиловый спирт; соотношение “сырьё — экстрагент” — 1:50; время экстракции — извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 мин (табл. 1).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на

кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96 % спиртом этиловым (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 422 нм через 30 мин после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки.

Примечание: Приготовление раствора рамноцитрина — рабочего стандартного образца. Около 0,025 (точная навеска) рамноцитрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки (раствор А рамноцитрина). В мерную колбу на 25 мл помещают 1 мл раствора А рамноцитрина, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96 % спиртом этиловым (испытуемый раствор Б рамноцитрина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 422 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А рамноцитрина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки 96 % спиртом этиловым (раствор сравнения Б рамноцитрина).

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

Таблица 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного

f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm X$	$E, \%$
10	2,24	0,0224	95	2,23	$\pm 0,0152$	$\pm 2,23$

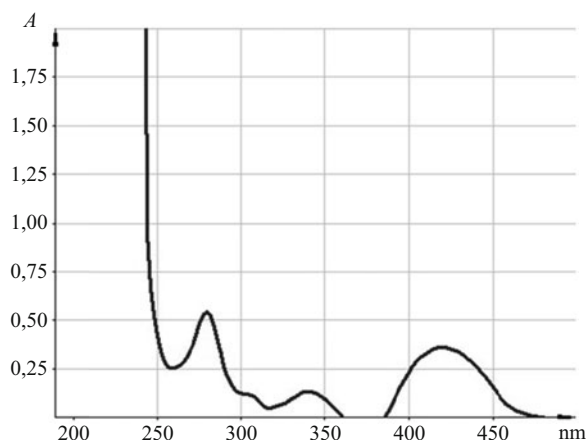


Рис. 5. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из почек каштана конского (дифференциальный вариант).

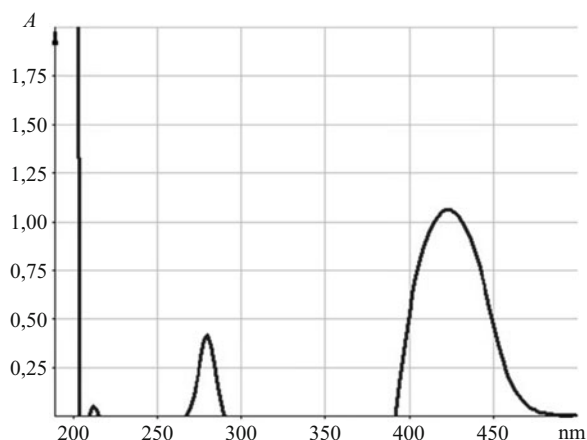


Рис. 6. Электронный спектр спиртового раствора рамноцитрина (дифференциальный вариант).

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

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

В случае отсутствия стандартного образца рамноцитрина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения — 260.

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 260 \cdot (100 - W)},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора; m — масса сырья, г; m_0 — масса РСО рамноцитрина, г; 260 — удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) РСО рамноцитрина при 422 нм; W — потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного

Таблица 3

Содержание суммы флавоноидов в образцах почек каштана конского обыкновенного

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (%) в пересчете на рамноцитрин
1	Почки апикальные (Димитровград Ульяновской обл., апрель 2012 г.)	1,24 ± 0,01
2	Почки апикальные (Самара, Ботанический сад, март 2013 г.)	2,31 ± 0,03
3	Почки боковые (Самара, Ботанический сад, май 2013 г.)	1,43 ± 0,01
4	Почки апикальные и латеральные (Пенза, апрель 2016 г.)	1,28 ± 0,02
5	Почки апикальные и латеральные (Самара, Ботанический сад, март 2018 г.)	1,70 ± 0,02

представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 2,23 % (табл. 2).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов почек каштана конского и рамноцитрина с алюминия хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рамноцитрина (с концентрациями в диапазоне от 0,00345 до 0,03105 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,999863, что свидетельствует о линейности разработанной методики.

Правильность методики определяли методом добавок при добавлении раствора рамноцитрина с известной концентрацией (25, 50 и 75 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98 %.

С использованием разработанной методики нами проанализированы образцы почек каштана конского (табл. 3) и при этом определено, что содержание суммы флавоноидов в данных образцах варьирует от (1,24 ± 0,01) % до (2,31 ± 0,01) %, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела для сырья данного растения содержание суммы флавоноидов не менее 1,0 %.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации почек каштана конского обыкновенного путем определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 422 нм в пересчете на рамноцитрин.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Ю. Богачев, *Рус. мед. ж.*, **17**, 3 – 6 (2004).
2. В. В. Вандышев, *Мед. помощь*, **5**, 36 – 38 (2002).
3. Е. Н. Жукович, Л. А. Шарикова, Т. Ф. Прибыткова, С. Ю. Бокарева, *Фармация*, **2**, 12 – 14 (2005).
4. В. А. Куркин, *Фармакогнозия*, Самара (2016), сс. 575 – 579.

5. Р. В. Куцник, Б. М., Зузук, В. В. Дьячок, *Провизор*, **4**, 12 – 18 (2002).
6. Н. А. Постоюк, А. А. Маркарян, Т. А. Сокольская, Т. Д. Даргаева, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, **1**, 135 – 138 (2012).
7. Т. Б. Шемерянкина, О. Г. Жарова, Т. А. Сокольская и др., *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, **3**, 3 – 11 (2012).
8. A. G. Celep, S. Yilmaz, N. Coruh, *J. Food Drug Analysis*, **20**(3), 692 – 698 (2012).
9. G. Mojžišova, J. Mojžiš, M. Pilátova, et al., *Phytother. Res.*, **27**(2), 159 – 165 (2013).
10. В. А. Куркин, Т. К. Рязанова, *Хим.-фарм. журн.*, **52**(5), 42 – 45 (2018).
11. M. A. D. Albalawi, *IOSR J. App. Chem.*, **9**, 70 – 74 (2016).

Поступила 15.11.18

QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOIDS IN *AESCULUS HIPPOCASTANUM* BUDS

V. A. Kurkin*, P. V. Belov, and V. M. Ryzhov

Samara State Medical University, Samara, 443099 Russia

* e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

We have developed a method for the quantitative determination of total flavonoids in the buds of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) using the differential spectrophotometry at a wavelength of 422 nm, with the results calculated for rhamnocitrin or 7-O-methylkempferol (3,5,41-trihydroxy-7-methoxyflavone) which is the dominant flavonoid in this plant material. The error of a single determination of total flavonoids in *A. hippocastanum* buds at a confidence probability of 95% is ± 2.23 %. The content the total flavonoids in the *A. hippocastanum* buds varies from $1.24 \pm 0.01\%$ up to $2.31 \pm 0.03\%$ (calculated for rhamnocitrin).

Keywords: *Aesculus hippocastanum* L.; horse chestnut buds; flavonoids; rhamnocitrin; standardization; spectrophotometry.