



УДК 615:577.127.4:665.527.92

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ДЕВЯСИЛА ГЕРМАНСКОГО

А.В. ЯНИЦКАЯ
И.Ю. МИТРОФАНОВА

*Волгоградский государственный
медицинский университет*

e-mail: i.u.mitrofanova@yandex.ru

Проанализированы различные методы экстракции травы девясила германского и как наиболее оптимальный для данного вида сырья выбран метод экстракции с использованием этанола 70% концентрации, который позволяет наиболее полно извлекать флавоноиды. Предложена методика, которая позволяет определять содержание суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин) в траве девясила германского в присутствии других соединений, она проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. Полученные данные свидетельствуют, что содержание флавоноидов в траве девясила германского, произрастающего в Волгоградской области, по результатам данной методики составляет $1,29\% \pm 0,003\%$. Проведенная валидационная оценка свидетельствует о ее пригодности для контроля качества исследуемого сырья.

Ключевые слова: флавоноиды, девясил германский, лютеолин, спектрофотометрия

Девясил германский (*Inula germanica* L) сем. Астровые (Asteraceae) – многолетнее травянистое растение высотой 30 – 90 см [2]. Стебли прямостоячие или восходящие, продольно-ребристые, часто одиночные. В основании с чешуевидными листьями, вверху обычно ветвистые, равномерно олиственные, мохнато-пушистые [3]. Листья продолговато-ланцетные или эллиптические, 5 – 10 см длиной и 1 – 3 см шириной, остроконечные, сидячие, в основании сердцевидные, цельнокрайние или с мелкими зубчиками, слабо опушены с обеих сторон. Цветки собраны в гетерогамную корзинку. Корзинки мелкие – до 1 см в диаметре скученные в щитковидные соцветия. Основу корзинки образует общее цветоложе, которое снаружи окружено оберткой. Листочки обертки голые с небольшими ресничками по краям или мягкими волосками. Язычковые цветки желтые, 0,8 – 1,1 см длиной, в 1,5 раза длиннее лучей обертки. Серединные цветки трубчатые, желтые, 6 мм длиной. Плод – голая ребристая семянка цилиндрической формы с хохолком из 1 ряда многочисленных длинных шероховатых щетинок. Семянки бурые, 1,5 мм длиной, 0,3 мм шириной, с хохолками, в 3 раза превышающими семянками [12].

Европейско-западноазиатский вид. В России распространен в южной половине европейской части и на Северном Кавказе. В Средней России изредка встречается в черноземной полосе [2].

Девясил германский растет в степях, на полянах, степных склонах, опушках остепненных дубрав, среди зарослей степных кустарников [9].

В Волгоградской области девясил германский произрастает на солонцеватых суходольных лугах, на лиманах в степях.

Надземная часть девясила германского содержит 0,18 % эфирного масла, в состав которого входят сесквитерпеновые лактоны (германин А, германин В, неролидол, оватифолин, 2-ацетокси-дезацетиллауренбиолит), а также флавоноиды (хризоспленол Д, томентин) [6].

Она находит применение при заболеваниях слизистой оболочки рта, лимфатической системы [6].

Однако в нашей стране из-за отсутствия соответствующих нормативных документов девясил германский не является официальным растением и не используется в достаточной мере, что делает его приоритетным для фармакогностического изучения и включения в число официальных лекарственных растений.

В настоящее время наряду с определением внешних и микроскопических диагностических признаков значительное место в комплексной оценке подлинности и качества лекарственного растительного сырья занимает фитохимический анализ.

Согласно современным требованиям нормативной документации на лекарственное растительное сырье, фитохимический анализ включает задачи качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья по содержанию ведущих групп биологически активных соединений, обеспечивающих фармакологическую активность [10].



Цель исследования. Разработка методики, количественного определения флавоноидов в траве девясила германского (*Inula germanica* L), произрастающего в Волгоградской области, методом дифференциальной спектрофотометрии, позволяющей проводить оценку качества сырья.

Экспериментальная часть. Объектом исследования выступала трава девясила германского, заготовленная в фазу полного цветения (июль – август 2010) от дикорастущих популяций во Фроловском районе Волгоградской области. Все использованные в работе реактивы имели степень чистоты ч.д.а.

В основу количественного определения флавоноидов в сырье положен метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на способности флавоноидов образовывать окрашенные хелатные комплексы со спиртовым раствором алюминия хлорида в среде кислоты хлороводородной разведённой. При этом максимум поглощения первой полосы смещается на 35 – 50 нм к видимой области по сравнению с исходным флавоноидом и основной максимум поглощения отмечается в диапазоне длин волн 390 – 410 нм [5].

Для выбора оптимального режима экстрагирования травы девясила германского спиртовые извлечения получали методом экстракции с последовательной сменой этанола 96%, 70% и 40% концентрации и с использованием этанола 70 % концентрации (как наиболее универсального экстрагента для флавоноидов). Точную навеску измельченной до размера частиц 1 – 3 мм травы девясила германского около 1,0 г помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 30 мл 96 % этанола, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждали под струей воды до комнатной температуры и содержимое фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли дважды поочередно 70 % и 40 % этанолом. Извлечения фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем фильтрата доводили до метки 96 % спиртом. Полноту извлечения флавоноидов из сырья подтверждали по отрицательной цианидиновой пробе со шротом [5]. Аналогично получали извлечения с использованием 70% этанола. [4].

Аликвоты полученных растворов объемом 5 мл помещали в колбы на 25 мл, прибавляли 5 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и 2 – 3 капли разведенной соляной кислоты. Объем смесей доводили до метки 96% или 70% спиртом этиловым соответственно и оставляли для прохождения реакции комплексообразования в защищенном от света месте 45 минут.

Оптическую плотность продуктов взаимодействия спиртовых извлечений из сырья девясила германского с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида в среде кислоты хлороводородной разведённой измеряли на спектрофотометре Solar PV 1251 C при длине волны λ_{max} = 363 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вели по формуле:

$$X = \frac{A_{\lambda} \cdot W_1 \cdot W_2}{E_{1\%1cm}^{1\%} \cdot m \cdot V_a}$$

где A_{λ} – оптическая плотность исследуемого раствора;

W_1, W_2 – разведения, мл;

$E_{1\%1cm}^{1\%}$ – ГСО лютеолина с алюминия хлоридом при $\lambda_{max} = 363$ нм (400);

m – масса навески исследуемого сырья, г;

V_a – объем аликвоты, мл [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Статистическая обработка результатов химического эксперимента проводилась согласно ОФС 42-0111-09 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и включала проверку однородности выборки, с последующим вычислением базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды, с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США) и Excel 2000 (MS Office 2000, США). Валидация методики количественного определения флавоноидов в траве девясила германского выполнялась в соответствии с рекомендациями [1, 7] по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность, аналитическая область (диапазон применения). Поскольку валидируемая методика проводится в легко контролируемых условиях анализа, то не было необходимости определять ее устойчивость.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что максимум оптической плотности УФ-спектра поглощения продуктов взаимодействия спиртовых извлечений из исследуемых образцов сырья, полученных как методом экстракции с последовательной сменой этанола (96%, 70% и 40%), так и с использованием этанола 70% концентрации, с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида в среде кислоты хлороводородной разведённой находится $\lambda_{max} = 363$ нм и близок к спектральным характеристикам УФ-спектра раствора госу-



дарственного стандартного образца лютеолина¹ – 5, 7, 3', 4'-тетрагидроксифлавоноид. На основании полученных результатов оценку суммарного содержания флавоноидов производили в пересчете на лютеолин и использовали удельный показатель поглощения комплекса раствора ГСО лютеолина с алюминия хлоридом, который согласно литературным данным, при аналитической длине волны 363 нм равен $E_{1\%}^{1\text{см}} = 400,0$ [8].

Проверку однородности выборки и идентификацию вариант, отягощенных грубыми ошибками, осуществляли исходя из размаха варьирования. Рассчитанные значения контрольного критерия (Q) не превышали соответствующие табличные ($Q_{\text{табл}}$ (95%; 6) с доверительной вероятностью $P = 95\%$). Следовательно, ни одна из вариант не отягощена грубой ошибкой, то есть выборка считалась однородной и статистические характеристики методики, соответственно, были признаны достоверными.

Таблица 1

**Результаты определения суммы флавоноидов в траве
девясила германского**

№ серии	Оптическая плотность (A)	Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин (X), %	Метрологические характеристики
экстракция с последовательной сменой этанола (96%, 70% и 40%)			
1	0,783	0,979	$X_{\text{ср}} = 0,983$ $S = 0,006$ $S^2 = 0,002$ $\Delta x = 0,002$ $\varepsilon, \% = 0,24$ $\varepsilon_{\text{ед.опр.}, \%} = 0,61$
2	0,792	0,99	
3	0,785	0,982	
4	0,779	0,974	
5	0,787	0,984	
6	0,788	0,985	
X	0,786	0,983	
экстракция с использованием этанола 70% концентрации			
1	1,026	1,283	$X_{\text{ср}} = 1,294$ $S = 0,008$ $S^2 = 0,003$ $\Delta x = 0,003$ $\varepsilon, \% = 0,26$ $\varepsilon_{\text{ед.опр.}, \%} = 0,66$
2	1,040	1,300	
3	1,037	1,297	
4	1,034	1,293	
5	1,029	1,287	
6	1,042	1,303	
X	1,035	1,294	

Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в извлечениях из травы девясила германского, полученных методом экстракции с последовательной сменой этанола (96 %, 70 % и 40 %), составила $0,98 \% \pm 0,002 \%$, в извлечениях, полученных с использованием этанола 70 % концентрации, – $1,29 \% \pm 0,003 \%$.

По результатам метрологического анализа методики установлено, дисперсия результатов количественного определения флавоноидов в сырье девясила британского составляет $S^2 = 0,002$ и $S^2 = 0,003$, что свидетельствует о воспроизводимости результатов анализа. Величина стандартного отклонения ($S = 0,006$ и $S = 0,008$) характеризует разброс вариант вокруг среднего и является оценкой соответствующей случайной ошибки, относительная ошибка составляет 0,24 и 0,26 % и не превышает допустимого значения 5%. Ошибка единичного измерения равна 0,61 % и 0,66 % и соответственно.

Проанализированы различные методы экстракции травы девясила германского и как наиболее оптимальный для данного вида сырья выбран метод экстракции с использованием этанола 70 % концентрации, который позволяет наиболее полно извлекать флавоноиды. Предложена методика, которая позволяет определять содержание суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин) в траве девясила германского в присутствии других соединений, она проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. Полученные данные свидетельствуют, что содержание флавоноидов в траве девясила германского, произрастающего в Волгоградской области, по результатам данной методики составляет $1,29 \% \pm 0,003 \%$. Проведенная валидационная оценка свидетельствует о ее пригодности для контроля качества исследуемого сырья.

¹ лютеолин имеет максимум поглощения при 360 нм



Литература

1. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – М.: Изд-во стандартов, 2002.
2. Красная книга Республики Мордовия. В 2 т. Т.1: Редкие виды растений, лишайников и грибов / Сост. Т.Б. Силаева. – Саранск: Мордов. кн. изд-во, 2003. – 288 с.
3. Коренская И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины, хромоны: учеб. пособие для вузов / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова.- Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2007.- 81 с.
4. Лесовая Ж.С. Разработка методики стандартизации травы ренешка обыкновенного по флавоноидам/ Ж.С. Лесовая, Д.И. Писарев, О.О. Новиков//Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина и фармация. – 2010. – № 12/2. – С. 150-154.
5. Лесовая Ж.С. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки обыкновенной/ Ж.С. Лесовая, Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Т.А. Романова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина и фармация. – 2010. – № 12/2. – С. 145-149.
6. Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
7. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля. – М.: Ассоциация российских фармацевтических производителей, 2007. – 57 с.
8. Самшиев А.М. Кукурузные рыльца: от выявления действующих веществ до создания технологии малоотходной переработки сырья/ А.М. Самшиев, Е.Б. Никифорова, М.Р. Хочава// Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 12. – С. 106-110.
9. Флора Европейской части СССР: Asteraceae (Compositae) / Сост. Н. Н. Цвелев – СПб.: Наука, 1994. Т. 7. – 317 с.
10. Шарова О.В. Флавоноиды цветков календулы лекарственной / О.В. Шарова, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65-68.
11. Barnes J. Herbal medicines (third ed.) / L.A. Anderson, J.D. Phillipson // Pharmaceutical Press, London, Chicago, 2007. – p. 491.
12. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma / H. Park, C. Lee, I. Jung, J. Lee, Y. Jeong, J. Chang, S. Chun, M. Kim, I. Choi, S. Ahn, Y. Shin, S. Yeom, Y. Park // Inter. Immunopharm. – 2009. – № 3. – p. 261–267.

THE DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE METHOD OF THE FLAVONOIDS' DETERMINATION IN INULA GERMANICA HERB

**A.V. YANITSKAYA
I.YU. MITROFANOVA**

Volgograd State Medical University

e-mail: i.u.mitrofanova@yandex.ru

It has been analyzed different extraction methods. The extraction with ethanol gradual alternation as more optimal was chosen. It has been suggested technique of the quantitative determination of the flavonoids equivalent to luteolin in *Inula germanica* herb. It allows to determinate of the flavonoids' quantitative order in the presence of another compounds, doesn't require expensive equipment and it is simple in hand. It was established the flavonoids quantitative determination in *Inula germanica* herb, that grows in Volgograd region, was 1,29 % ± 0,003%. The validation proved that developed technique it can be used for quality control of studied herbal raw material.

Keywords: flavonoids, *Inula germanica*, luteolin, spectrophotometry