

УДК 615.322: 615.071: 615.074

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ  
В НАСТОЙКЕ И СИРОПЕ ПЛОДОВ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО****IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS IN TINCTURE  
AND SYRUP OF COMMON JUNIPER FRUITS****Т.А. Олейникова<sup>1</sup>, Э.Ф. Степанова<sup>1</sup>, О.О. Новиков<sup>2</sup>, Д.И. Писарев<sup>2</sup>,  
М.М. Евсева<sup>3</sup>****T.A. Oleynikova<sup>1</sup>, E.F. Stepanova<sup>1</sup>, O.O. Novikov<sup>2</sup>, D.I. Pisarev<sup>2</sup>, M.M. Evseeva<sup>3</sup>**

<sup>1)</sup> Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава,  
Россия, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

<sup>2)</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет,  
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д.85

<sup>3)</sup> Международный медицинский центр «СИНАЙ», Россия, 119180, г. Москва, ул. Б. Полянка, д. 54

<sup>1)</sup> Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of GBOU VPO VolgGMU Ministry of Health,  
Russia, 357532, Pyatigorsk, Kalinina Ave., 11

<sup>2)</sup> Belgorod National Research University, Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85

<sup>3)</sup> International Medical Center «SINAY», Russia, 119180, Moscow, B. Polyanka St., 54

E-mail: evseevamm@gmail.com

**Аннотация.** Целью исследования явилось изучение состава и количественное определение флавоноидов в настойке и сиропе плодов можжевельника обыкновенного *Juniperus communis* L. Для осуществления поставленной цели использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в градиентном режиме элюирования. Детектирование осуществляли при длине волны ( $\lambda$ ): 340 нм. Количественное определение флавоноидов проводили методом абсолютной градуировки. В качестве стандартного образца использовали скутелляреин-7-О-глюкозид. В результате исследования выявлено, что доминирующими группами флавоноидов являются бифлавоноиды (50%), скутелляреин-7-О-глюкозид (22%) и гликозиды апигенина (14%).

**Resume.** The purpose of the research was to study the composition and quantification of flavonoids in tincture and syrup of Common Juniper fruits – *Juniperus communis* L. High performance liquid chromatography (HPLC) in a gradient elution mode has been used to achieve this goal. Detection was performed at a wavelength ( $\lambda$ ): 340 nm. Quantification of flavonoids was determined by absolute calibration. Scutellarein-7-O-glucoside was used as a standard sample. The study revealed that the dominant groups of flavonoids are biflavonoids (50%), scutellarein-7-O-glucoside (22%) and apigenin glycosides (14%).

**Ключевые слова:** *Juniperus communis* L. настойка и сироп плодов можжевельника обыкновенного, экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, флавоноиды

**Keywords:** *Juniperus communis* L. tincture and syrup of Common Juniper fruits, extraction, high performance liquid chromatography, flavonoids.

### Введение

При лечении, реабилитации и, особенно, для профилактики различных заболеваний практикующие врачи, да и сами пациенты, все чаще предпочитают пользоваться лекарствами растительного происхождения, ведь никто не будет оспаривать тот факт, что для здоровья необходимы натуральные пищевые продукты. Это справедливо и в отношении лекарств [Евсева, 2008]. Достоинством растительных лекарственных средств является возможность их длительного применения в домашних условиях и доступность для населения, что особенно важно для восстановительного лечения и реабилитации различных заболеваний хронической этиологии. Лекарственные травы – это готовые лечебные комплексы, чьи компоненты находятся в сбалансированном состоянии. Одно и то же лекарственное растение может с успехом использоваться при самых различных заболеваниях, что, возможно, обусловлено их многокомпонентным составом. Так, например, плоды можжевельника обыкновенного издавна применяют в народной медицине при женских болезнях, простудных заболеваниях, туберкулезе, ревматизме, заболеваниях печени и почек и многих других



[Евсеева, 2008]. Долгое время лечебный эффект можжевельника связывали лишь с действием эфирных масел, однако, можно предположить, что многогранное действие этого целебного растения связано с наличием других биологически активных веществ. *J. communis* – это эфиромасличное растение, фармакологический эффект которого обусловлен, в основном, терпенами [Писарев, 2007, Соколов, 2010]. Известно также, что в суммарном фармакологическом эффекте участвует полифенольный комплекс [Писарев, 2010]. Уточнение данных о химическом составе таких используемых препаратов как настойка и сироп плодов можжевельника, позволит шире использовать их в этиотропной медицине.

### Цель

Целью нашего исследования явилось изучение состава и количественное определение флавоноидов в настойке и сиропе плодов можжевельника обыкновенного *Juniperus communis* L.

### Материал и методы исследования

Объектом исследования служили настойка и сироп плодов можжевельника обыкновенного *J. Communis* L.

Настойку плодов можжевельника обыкновенного получали методом ремацерации в соотношении 1:5 с использованием 40%-ного спирта этилового в качестве экстрагента. Для этого рассчитанное количество экстрагента делили на две части 3:2. Настаивание сырья проводили 24 ч первой порцией, извлечение сливали, 24 ч со второй порцией экстрагента, извлечение сливали, отжимали и объединяли. Полученный продукт представлял собой коричневую жидкость, с легкой опалесценцией, запах – ароматный, вкус пряный, сладко-горький, жгучий.

Сироп плодов можжевельника обыкновенного получали по традиционной схеме изготовления сиропов в соотношении 20 г настойки сиропа и 80 г сиропа сахарозы.

Для осуществления поставленной цели использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в градиентном режиме элюирования. Исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «Agilent Technologies 1200 Infinity» (США) по оригинальной методике, разработанной на кафедре химии и фармакогнозии Белгородского государственного национального исследовательского университета [Писарев, 2013].

Регистрацию и обработку спектральных данных проводили с использованием программного обеспечения «Agilent Chem Station».

При жидкостной хроматографии для приготовления подвижных фаз применяли следующие растворители: воду сверхчистую, спирт этиловый (по ГОСТ Р 51652), кислоту муравьиную (квалификация х.ч. по ГОСТ 61).

Эффективность колонки определяли вычислением числа теоретических тарелок ( $N$ ) по формуле:

$$N = 5.545 \times \left( \frac{t_r}{\mu_{0.5}} \right)^2,$$

где  $t$  – время удерживания определяемого вещества, мм;  $\mu_{0.5}$  – ширина на половине высоты пика, мм.

Коэффициент разделения пиков  $R_s$  вычисляли по формуле:

$$R_s = \frac{\Delta l}{\mu_{0.5(1)} + \mu_{0.5(2)}},$$

где  $\Delta l$  – расстояние между вершинами двух соседних пиков, мм;  $\mu_{0.5(1)}$ ,  $\mu_{0.5(2)}$  – ширина на половине высоты пиков двух компонентов мм. Причем, согласно Европейской Фармакопее (ЕФ) [European Pharmacopoeia, 2014], коэффициент разделения  $R_s$ , должен быть не менее 1.5.

Форму хроматографического пика определяли путём расчёта коэффициента асимметрии пика ( $T_f$ ) по формуле:

$$T_f = \frac{\mu_{0.05}}{2 \times f},$$

где  $\mu_{0.05}$  – ширина пика на высоте 5% от базовой линии (мм);  $f$  – расстояние от начала пика на высоте 5% от базовой линии до перпендикуляра, проведенного из его вершины (мм).

За оптимальную величину коэффициента асимметрии  $T_f$  принимали показатель – менее 2.

Исследовали настойку и сироп плодов можжевельника, разделяя их в следующих условиях. Подвижная фаза: 1% водный раствор кислоты муравьиной (А) – 95% спирт этиловый (Б) в градиентном режиме элюирования; колонка: Ascentis express C<sub>18</sub> 2.7  $\mu\text{m}$  × 100 мм × 4.6 мм; скорость подвижной фазы – 0.5 мл/мин; температура колонки +35°C; объём вводимой пробы 5  $\mu\text{l}$ .

Состав подвижной фазы программировали в условиях, указанных в представленной таблице (табл. 1).

Таблица 1  
Table. 1

**Условия градиентного элюирования флавоноидов плодов *J. communis* L.  
Terms of gradient elution flavonoids *J. communis* L. fruits**

Время, мин	А, %	Б, %
0	90	10
10	80	20
20	70	30
30	50	50
40	10	90

Детектирование осуществляли при длине волны (λ): 340 нм.

По данным Д.И. Писарева и соавторов [Писарев, Новиков и др., 2016], для большинства флавоноидов существует общая полоса поглощения, по которой можно оценить их содержание на хроматограмме, она лежит в максимуме поглощения при длине волны (λ) 340 нм, поэтому именно эту величину мы использовали при детектировании.

Идентификацию компонентов осуществляли по совпадению времён удерживания анализируемых веществ со стандартным образцом (СО) зафиксированных в аналогичных условиях эксперимента и по результатам диодно-матричного детектирования.

Относительное содержание флавоноидов определяли как отношение площади хроматографического пика и суммы площадей пиков всех идентифицированных флавоноидов по формуле:

$$Xi = \frac{Si \times 100}{\sum S},$$

где Si – среднее значение площади пика компонента на хроматограммах суммы; ∑S – среднее значение суммы всех площадей пиков на хроматограммах.

**Результаты и их обсуждение**

Хроматограмма спиртового извлечения из плодов *J. communis* L. представлена на рисунке 1.

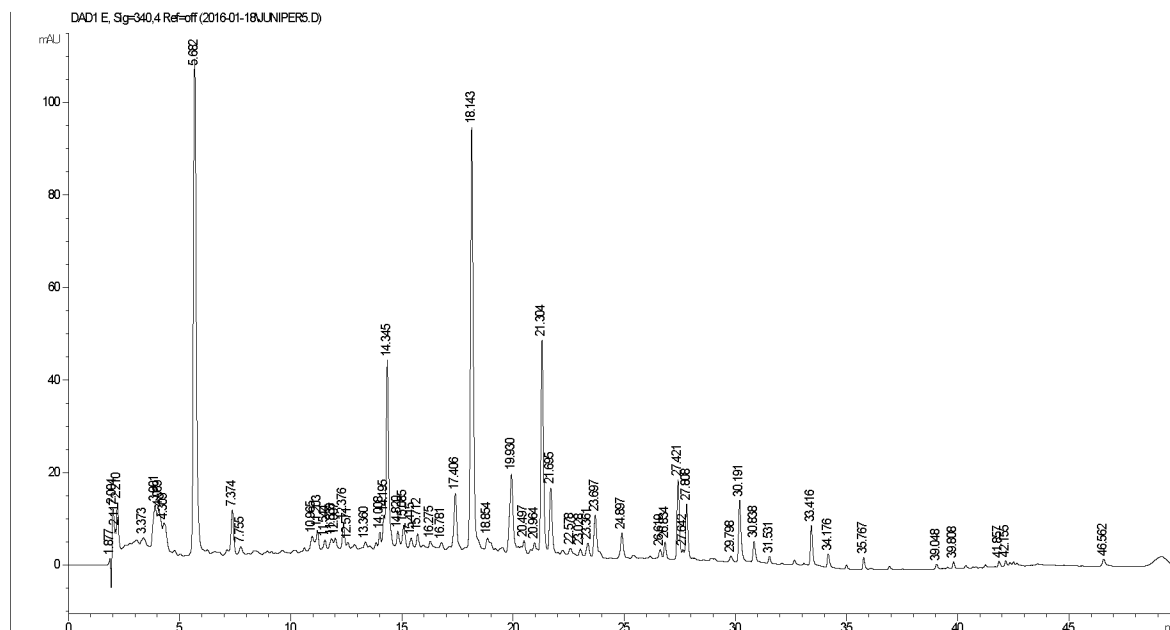


Рис. 1. Хроматограмма настойки плодов можжевельника обыкновенного *J. communis* L. (детекция диодно-матричная при λ=340 нм)

Fig. 1. Chromatogram of tincture of the *J. communis* L. fruits. (diode array detection at λ=340 nm)

Эффективность хроматографической системы оценивали по критериям, результаты расчёта которых приведены в таблице 2.

Таблица 2  
Table. 2

**Показатели пригодности хроматографической системы для определения флавоноидов в  
настойке плодов можжевельника обыкновенного *J. communis* L.  
Indicators of chromatographic system suitability for determination of flavonoids in tincture of *J.  
communis* L. fruits**

$t_R$	S	N	$R_s$	$T_f$	$W_b$
5.682	1282.0	24946	>1.5	0.73	0.1439
14.345	318.5	234468	>1.5	0.757	0.1185
18.143	815.2	3013252	>1.5	0.767	0.1322
17.406	120.3	231516	>1.5	1.106	0.1447
21.304	366.5	498457	>1.5	0.798	0.1207
19.930	169.9	282457	>1.5	1.209	0.15
24.897	46.1	611048	>1.5	1.021	0.1274
23.697	98.0	404701	>1.5	0.658	0.149
27.421	127.5	943840	>1.5	0.752	0.1129

Примечание:  $t_R$  - абсолютное время удерживания, S - площадь пика, N - число теоретических тарелок,  $R_s$  - коэффициент разделения пиков,  $T_f$  - коэффициент асимметрии,  $W_b$  - ширина пика на базовой линии

По результатам расчёта критериев пригодности  $N > 5000$ ,  $T_f < 2$ ,  $R_s > 1.5$ , что свидетельствует об адекватности использованной хроматографической системы и она может быть признана абсолютно пригодной для определения флавоноидов в настойке плодов можжевельника *J. communis* L.

Компонентный состав флавоноидов представлен нами в таблице 3.

Таблица 3  
Table. 3

**Компонентный состав полифенолов в настойке плодов можжевельника  
обыкновенного *J. communis* L.  
Component composition of polyphenols in tincture of *J. communis* L. fruits**

Время удерживания, мин	УФ-профиль идентифицированных компонентов	Идентифицированные компоненты	Суммарная площадь пиков компонентов на хроматограмме, $\Sigma S$
14.345, 18.143		Бифлавоноиды (амен-тофлаво-н и купрессу-сфлаво-н)	1133.67
21.304		7-О-глюкозид скутел-ляреина	486.0
19.930, 24.897		Гликозиды 6-оксилютеолина	214.0
23.697		Кверцетин	92.0

Окончание табл. 3

<p>27.421, 27.808, 30.191</p>		<p>Гликозиды апигенина</p>	<p>314.5</p>
---------------------------------------	--	----------------------------	--------------

Процентное содержание различных флавоноидов в настойке плодов можжевельника обыкновенного *J. communis* L. представлено на столбиковой диаграмме (рис. 2).

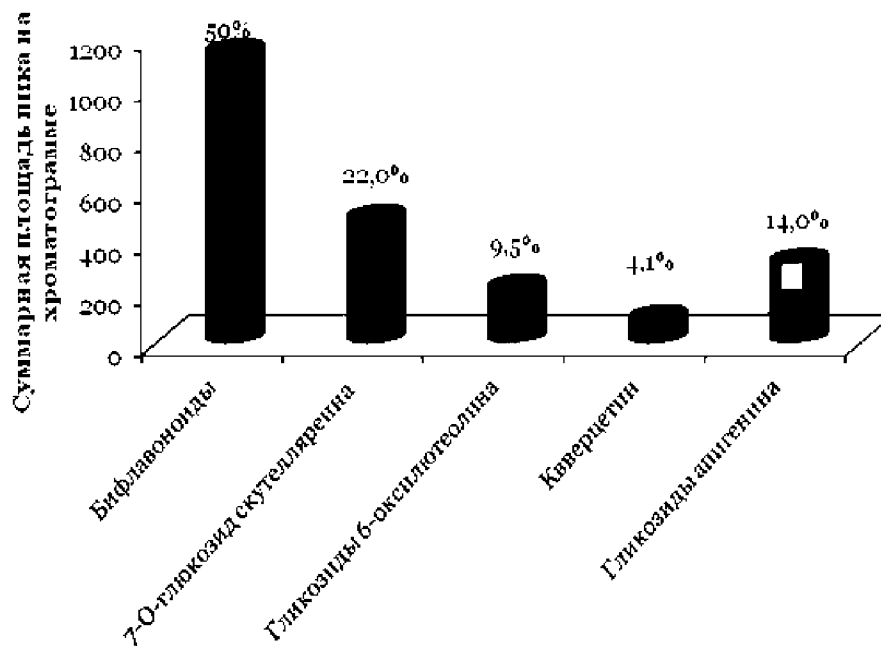


Рис. 2. Содержание различных групп флавоноидов в настойке плодов можжевельника *J. communis* L., согласно их площадям пиков на хроматограмме (%)

Fig. 2. The content of the various groups of flavonoids in tincture of *J. communis* L. fruits, according to their peak areas in the chromatogram (%)

Из представленной диаграммы видно, что доминирующими группами флавоноидов являются бифлавоноиды (50%), скутелляреин-7-О-глюкозид (22%) и гликозиды апигенина (14%).

Количественное определение флавоноидов проводили методом абсолютной градуировки. В качестве СО использовали скутелляреин-7-О-глюкозид.

Предварительно настойку плодов можжевельника обыкновенного массой 1.0 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 20 мл 95% спирта этилового, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали. Сироп плодов можжевельника массой 4,0 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 20 мл 95% спирта этилового, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали. Таким образом, было приготовлено 7 отдельно взятых образцов настойки и сиропа.

Примечание:

1. Приготовление раствора СО. 20 мг СО помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 10 мл 95% спирта этилового, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали.

2. Приготовление подвижной фазы А. 10 мл кислоты муравьиной (хч) помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили объём раствора водой сверхочищенной (HPLC) до метки и перемешивали.

3. Приготовление подвижной фазы Б. Для хроматографии использовали 95% спирт этиловый.

Для построения градуировочного графика из полученного раствора готовили серию калибровочных растворов. Для этого в 6 мерных колб вместимостью 25 мл пипеткой переносили раствор А в объёмах: 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0; 12.0 мл, содержимое колб тщательно перемешивали и доводили спиртом этиловым 95%-ным до метки. Полученные растворы хроматографировали в вышеуказанных условиях и определяли площади их пиков.

Результаты хроматографирования представляли в виде калибровочного графика (Рис. 3).

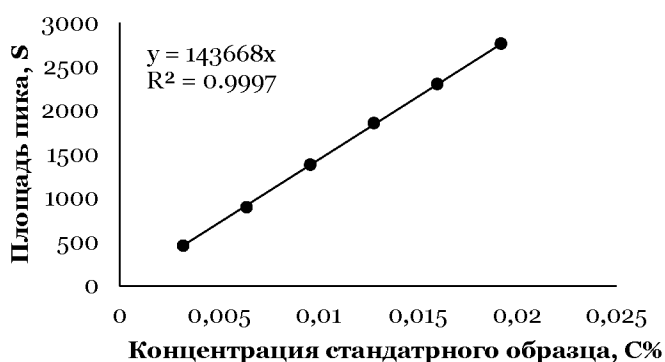


Рис. 3. Калибровочный график зависимости концентрации скутелляреин-7-О-глюкозида от площади пика  
Fig. 3. Calibration graph of scutellarein -7-O-glucoside concentration against peak area

Далее анализируемые образцы хроматографировали и у определяемых компонентов измеряли площадь пика. Далее на основании градуировочного графика рассчитывали их количество по формуле:

$$x = \frac{C_{CT} \times W \times 100}{m \times (100 - B)},$$

где  $C_{CT}$  – количество флавоноида, найденного по калибровочному графику (%);  $m$  – масса навески образца;  $W$  – разведение образца;  $B$  – потеря в массе при высушивании образца.

Результаты расчёта содержания скутелляреин-7-О-глюкозида в настойке плодов можжевельника обыкновенного представлены в таблице 4.

Таблица 4  
Table. 4

**Результаты количественного определения скутелляреин-7-О-глюкозида в настойке плодов можжевельника обыкновенного**  
**The results of the quantitative determination scutellarein -7-O-glucoside in the tincture of Common Juniper fruits**

№ п/п	Содержание скутелляреин-7-О-глюкозида (X), %	$\bar{X}$	S	$\overline{\Delta X}$	$\varepsilon$ , %
1.	0.0053	0.00525	0.000049	0.000126	2.4
2.	0.0052				
3.	0.0052				
4.	0.0053				
5.	0.0052				
6.	0.0053				
7.	0.0053				

Результаты расчёта содержания скутелляреин-7-О-глюкозида в сиропе приведены в таблице 5.

Таблица 5  
Table. 5

**Результаты количественного определения скутелляреин-7-О-глюкозида в сиропе плодов можжевельника обыкновенного**  
**The results of the quantitative determination scutellarein -7-O-glucoside in the syrup of Common Juniper fruits**

№ п/п	Содержание скутелляреин-7-О-глюкозида (X), %	$\bar{X}$	S	$\overline{\Delta X}$	$\varepsilon$ , %
1.	0.00132	0.00133	0.0000187	0.000048	3.6
2.	0.00131				
3.	0.00134				
4.	0.00136				
5.	0.00134				
6.	0.00132				
7.	0.00135				

Из результатов таблицы видно, что ошибка единичного определения во всех случаях не превышает 5%, при относительной погрешности  $P$  95%, что находится в диапазоне, рекомендуемом ГФ.

### Заключение

Таким образом, использование хроматографической системы позволило с высокой достоверностью идентифицировать и определить количественное содержание флавоноидов в настойке и сиропе плодов можжевельника обыкновенного. Установлено, что большую часть (50%) составляют бифлавоноиды, 22% приходится на 7-О-гликозиды скутелляреина, 14% - на гликозиды апигенина и лишь 9.5% на гликозиды 6-оксилитеолина и 4.1% на кверцетин.

### Список литературы References

- Евсеева М.М. 2008. Фитотерапия в гинекологии. В кн.: Гинекология. Руководство для врачей. Под ред. В.Н. Серова, Е.Ф. Кира. М., Литтерра: 786–792.
- Evseeva M.M. 2008. Fitoterapiya v ginekologii [Phytotherapy in gynecology]:. V kn.: Ginekologiya. Rukovodstvo dlya vrachev. Pod red. V.N. Serova, E.F. Kira. M., Litterra: 786–792. (in Russian)
- Писарев Д.И. 2007. Обзор современного состояния исследований в области систематики, химии и фармакологии рода *Juniperus* L. Современные проблемы фитодизайна: материалы международной научно-практической конференции (Белгород, 28-31 мая 2007 г.). Белгород, Изд-во БелГУ. 296-304.
- Pisarev D.I. 2007. Obzor sovremennogo sostoyaniya issledovaniy v oblasti sistematiki, khimii i farmakologii roda *Juniperus* L. [Overview of the current state in the field of taxonomy, chemistry and pharmacology kind *Juniperus* L. research]. Sovremennye problemy fitodizayna: materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii (Belgorod, 28-31 maya 2007 g.). Belgorod, Izd-vo BelGU. 296-304. (in Russian)
- Писарев Д.И., Новиков О.О., Новикова М.Ю., Жилякова Е.Т. 2010. Изучение флавоноидного состава шишкоягод можжевельника длиннохвойного. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 150 (12): 657-660.
- Pisarev D.I., Novikov O.O., Novikova M.Yu., Zhilyakova E.T. 2010. Izuchenie flavonoidnogo sostava shishkoyagod mozhzhevel'nika dlinnokhvoynogo [The study of the flavonoid composition fruit juniper oblonga]. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 150 (12): 657-660. (in Russian)
- Писарев Д.И. 2013. Методологические основы комплексного исследования полифенольных веществ и тест-соединений природного и синтетического происхождения. Автореф. дис....докт. фарм. наук. Курск, 37 с.
- Pisarev D.I. 2013. Metodologicheskie osnovy kompleksnogo issledovaniya polifenol'nykh veshchestv i test-soedineniy prirodnoho i sinteticheskogo proiskhozhdeniya [Methodological basis of a comprehensive study of polyphenolic substances and test-compounds of natural and synthetic origin ]. Avtoref. dis....dokt. farm. nauk. Kursk, 37 s. (in Russian)
- Писарев Д.И., Новиков О.О., Корниенко И.В., Малутина А.Ю., Жилякова Е.Т., Трифонов В.В., Новикова М.Ю., Титарева Л.В., Шестопалова Н.Н., Гурьев И.В. 2016. Исследование экстрагирующей способности различных концентраций спирта этилового для изолирования комплекса флавоноидов из шишкоягод *Juniperus communis* L. в рамках научного направления «Фармацевтический ремейк». Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 19 (240):136–147.
- Pisarev D.I., Novikov O.O., Kornienko I.V., Malutina A.Yu., Zhilyakova E.T., Trifonov V.V., Novikova M.Yu., Titareva L.V., Shestopalova N.N., Gur'ev I.V. 2016. Issledovanie ekstragiruyushchey sposobnosti razlichnykh kontsentratsiy spirita etilovogo dlya izolirovaniya kompleksa flavonoidov iz shishkoyagod *Juniperus communis* L. v ramkakh nauchnogo napravleniya «Farmatsevticheskiy remeyk» [Research extracting ability of various concentrations of ethyl alcohol to isolate a complex of flavonoids from fruits *Juniperus communis* L. under the scientific direction "pharmaceutical remake" ]. Nauchnye vedomosti BelGU. Seriya: Meditsina. Farmatsiya. 19 (240):136–147. (in Russian)
- Соколов С.Я. 2000. Фитотерапия и фитофармакология. М., Мед. информ. Агентство. 976.
- Sokolov S.Ya. 2000. Fitoterapiya i fitofarmakologiya [Phytotherapy and phytopharmacology]. M., Med. inform. Agentstvo. 976. (in Russian)
- European Pharmacopoeia [Text]: 2 vol. – 8th ed. 2014. European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg : Council of Europe. cop.