

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ ГРЕЧИХИ ПОСЕВНОЙ

© 2010 М.М. Анисимова, В.А. Куркин, В.Н. Ежков

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 01.10.2010

В настоящее время особое место на фармацевтическом рынке занимают лекарственные препараты растительного происхождения, содержащие флавоноиды, которые обладают широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантной, гепатопротекторной, капилляроукрепляющей и ангиопротекторной. К перспективным источникам получения флавоноидных препаратов, в том числе рутина, можно отнести траву гречихи посевной (*Fagopyrum sagittatum* Gilib.), широко культивируемой в Российской Федерации, однако по-прежнему остается нерешенной проблема стандартизации сырья данного растения. Предложены новые подходы к стандартизации сырья гречихи посевной. Разработаны оригинальные методики определения показателей качества сырья, которые рекомендованы для включения в нормативную документацию. Содержание рутина в траве гречихе посевной, культивируемой в Самарской области, находится в диапазоне 2,50-3,70%. Изучена динамика накопления флавоноидов в зависимости от фазы вегетации растения.

Ключевые слова: *гречиха посевная, Fagopyrum sagittatum Gilib., ангиопротекторное действие, рутин, флавоноиды*

В настоящее время особое место на фармацевтическом рынке занимают лекарственные препараты растительного происхождения, содержащие флавоноиды [2]. Одним из важнейших свойств флавоноидов является способность повышать прочность стенок капилляров (Р-витаминная активность) за счет антиоксидантного действия, что важно при лечении хронической венозной недостаточности, гипертонии и других сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с увеличением проницаемости кровеносных капилляров [2-4]. Наиболее ярким представителем в данной группе веществ является рутин, относящийся к группе витамина Р. Важно также отметить, что рутин обладает не только выраженным капилляроукрепляющим, но и антиоксидантным, гепатопротекторным действием [1, 3]. На данный момент рутин основным источником получения является софора японская, однако в нашей стране отсутствует сырьевая база данного растения, поэтому потребность в нем восполняется за счет импорта из Германии и Бразилии. В этом отношении большой интерес представляет трава гречихи посевной, содержащая рутин и другие флавоноиды и широко культивируемая в РФ [4]. В цветущих побегах гречихи в качестве основного компонента содержится до 3-5% рутин, а также сопутствующие ему другие флавоноиды, в частности, кверцетин и изокверцитрин [3, 4].

Цель настоящей работы – исследование по разработке методик качественного и количественного анализа нового вида лекарственного растительного сырья «Гречихи посевной трава».

Материалы и методы. Исследовали образцы надземной части гречихи посевной, культивируемой в Самарской области, а именно: Средне-Волжский филиал ГУ ВИЛАР (пос. Антоновка), Самарский ботанический сад. Образцы сырья собирали в фазу цветения в 2009 г. В ходе разработки методик качественного и количественного анализа нами использовалось водно-спиртовое извлечение травы гречихи посевной, при этом было предложено использование в данных методиках государственного стандартного образца (ГСО) рутина. Спектрофотометрические исследования осуществляли с использованием спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты и их обсуждение. Для определения состава травы гречихи посевной разработана методика тонкослойного хроматографирования (ТСХ). В задачу исследования входил подбор системы растворителей и способа детектирования зон адсорбции на хроматограмме, позволяющих идентифицировать флавоноиды. Разделение флавоноидов было наиболее оптимальным в системе растворителей: хлороформ – метанол – вода (26:14:3) («Силуфол УФ 254» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ»). В данных условиях четко разделяются флавоноидные и фенилпропаноидные соединения. Для обнаружения веществ на хроматограмме использовали детекцию в УФ-свете (254 нм и 366 нм). На хроматограмме обнаруживается доминирующее пятно с величиной R_f около 0,4 (рутин), а также проявляются другие пятна, в частности, пятно фиолетового цвета с величиной R_f - 0,2 (хлорогеновая кислота), с R_f - 0,8 (кверцетин) и с R_f -

Анисимова Мария Михайловна, аспирантка. E-mail: margola@inbox.ru

Куркин Владимир Александрович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: vakur@samaramail.ru

Ежков Владимир Николаевич, кандидат фармацевтических наук, профессор кафедры экономики и организации фармации

0,6 (изокверцитрин).

При проявлении хроматограммы щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК) также обнаруживается доминирующее пятно с величиной $R_f=0,4$ (на уровне аналогичного пятна ГСО рутина). Следовательно, ТСХ позволяет объективно определять подлинность травы гречихи посевной по наличию доминирующего флавоноида – рутина.

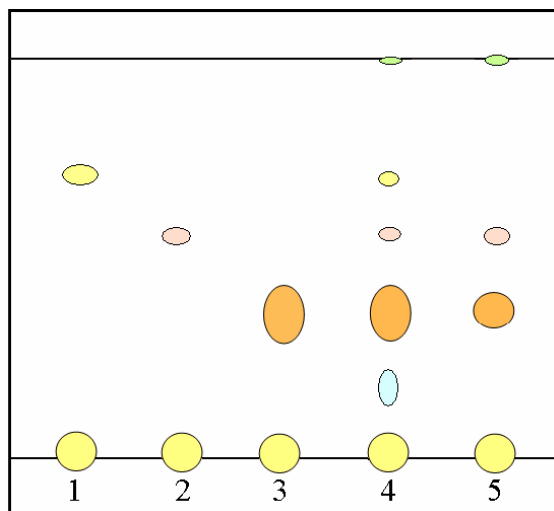


Рис. 1. ТСХ анализ водно-спиртовых извлечений из травы гречихи посевной:

1 – кверцетин; 2 – изокверцитрин; 3 – рутин; 4 – водно-спиртовое извлечение из травы гречихи посевной на 70% этиловом спирте; 5 – водно-спиртовое извлечение из травы гречихи посевной на 96% этиловом спирте

Для оценки количественного содержания суммы флавоноидов, содержащихся в траве гречихи посевной, был предложен метод спектрофотометрии и была обоснована целесообразность использования ГСО рутина. С целью исключения вклада сопутствующих веществ в оптическую плотность нами применен спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с алюминием хлоридом. При этом происходит bathochromic сдвиг полосы поглощения флавоноидов (рис. 2.).

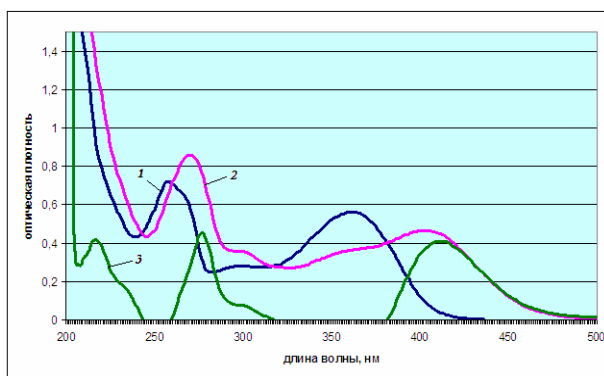


Рис. 2. Электронные спектры водно-спиртовых извлечений травы гречихи посевной:

1 – р-р водно-спиртового извлечения из травы гречихи посевной; 2 – р-р водно-спиртового извлечения из травы гречихи посевной с добавлением $AlCl_3$; 3 – дифференциальный спектр

Для оптимизации методики анализа было изучено влияние концентрации алюминия хлорида, времени комплексообразования. Установлено, что на результаты анализа влияют концентрация раствора алюминия хлорида (оптимальным является 2% раствор) и время (устойчивое окрашивание наступает через 30 минут и сохраняется в течение 2 часов). С целью определения максимума поглощения анализируемой группы флавоноидов от перекрывающихся их полос поглощения других (неанализируемых) соединений используют вариант проведения дифференциальной спектрофотометрии, с применением комплексообразующей добавки ($AlCl_3$) (рис. 2 и 3). Расчет содержания суммы флавоноидов в гречихе посевной проводится в пересчете на рутин, так как их дифференциальные спектры поглощения совпадают по положению с максимумом ГСО (государственный стандартный образец) рутина, поэтому при определении суммы флавоноидов в гречихе посевной мы сочли возможным проводить пересчет на ГСО рутина. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * m_0 * 40 * 25 * 100 * 100}{D_0 * m * 5 * 50 * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО рутина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

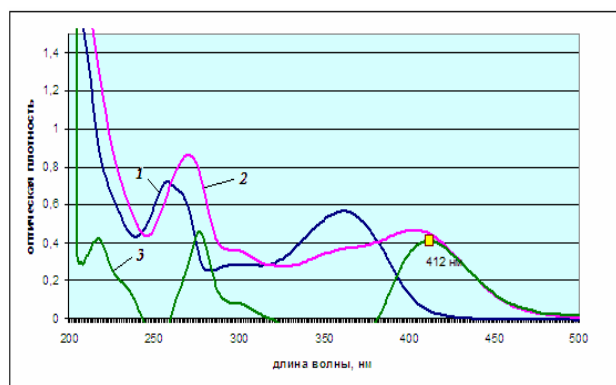


Рис. 3. Электронные спектры растворов рутина: 1 – раствор рутина; 2 – раствор рутина с добавлением $AlCl_3$; 3 – дифференциальный спектр

Содержание суммы флавоноидов в гречихе посевной варьирует от 5,30 до 6,10% в зависимости от места культивирования и года сбора. Этот факт свидетельствует также о перспективности получения препарата из травы гречихи посевной на основе флавоноидного комплекса,

обладающего ангиопротекторными и антиоксидантными свойствами. Для изучения динамики накопления флавоноидов определяли спектрофотометрическую зависимость концентрации флавоноидов в сырье от фазы вегетации гречихи посевной. Для всех образцов отсняли полный

спектр поглощения по методике определения суммы флавоноидов в гречихе посевной. При сравнении оптических плотностей из табл. 1 видно, что фенольные соединения в наибольшем количестве локализованы в верхней части растения.

Таблица 1. Содержание рутина в зависимости от времени сбора

Время сбора	№ образца	Часть растения	Оптическая плотность при 412 нм
18 июля	1	все растение	0,204
	2	верхушка	0,524
28 июля	3	все растение	0,224
	4	верхушка	0,756
7 августа	5	все растение	0,272
	6	верхушка	0,916
17 августа	7	все растение	0,328
	8	верхушка	0,316
17 августа	9	цветки	1,480

Проведенные исследования при сравнении образцов, собранных в разные фазы вегетации, свидетельствуют о том, что по мере роста гречихи концентрация рутина в вегетативной массе вначале возрастает, достигает максимума во время полного (массового) цветения (в возрасте 30-40 дней), а далее постепенно уменьшается во время завязывания плодов. Наибольшее содержание флавоноидов в образцах, собранных 17 августа. Фаза сбора – массовое цветение.

Методика качественного ТСХ-анализа травы гречихи посевной. На линию старта пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» микропипеткой наносят 0,02 мл извлечения (см. методику количественного определения) и 0,02 мл 0,1% раствора ГСО рутина в виде пятен диаметром около 5 мм. Около 0,02 мл извлечения с помощью микропипетки наносят на стартовую линию, проведенную на расстоянии 1,5-2 см от нижнего края хроматографической пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ». Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру, которую предварительно насыщают смесью растворителей: хлороформ-метанол-вода (26:14:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 8 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут. Детекцию веществ осуществляли в УФ-свете (254 нм и 366 нм). На хроматограмме обнаруживается доминирующее пятно с величиной R_f около 0,4 (рутин), а также проявляются другие пятна, в частности, пятно фиолетового цвета с величиной R_f - 0,2 (хлорогеновая кислота), с R_f - 0,8 (кверцетин) и с R_f - 0,6 (изокверцитрин).

1. **Подготовка пластинок.** Пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89) разрезают поперек линий наклейки соответственно на 2 части размером 10 x 5 см и перед использованием активируют в сушильном шкафу

при 100-105°C в течение 1 ч.

2. **Приготовление раствора диазобензолсульфонокислоты.** 0,01 г диазобензолсульфонокислоты (ГФ Х, стр. 876) растворяют в 10 мл 10% раствора натрия карбоната. Раствор используют свежеприготовленным.

3. **Приготовление раствора ГСО рутина.** (см. методику количественного определения: раствор А). Срок годности раствора 1 мес.

Методика количественного определения флавоноидов в траве гречихи посевной. Около 1 г (точная навеска) воздушно-сухого образца измельченного сырья с размером частиц 3 мм помещают в колбу с притертой крышкой емкостью 100 мл, добавляют 40 мл 70% этилового спирта. Колбу взвешивают на тарирных весах с точностью до 0,01 г и присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию осуществляют при нагревании на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После экстракции извлечение охлаждают и отфильтровывают через бумажный фильтр с красной полосой. Извлечение доводят на тарирных весах до первоначальной массы 70% этиловым спиртом.

1 мл полученного извлечения (1:40) переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят 70% этиловым спиртом до метки (раствор А). 5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл 2% раствора алюминия хлорида и доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор Б + $AlCl_3$). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный по методике: 1 мл полученного извлечения (1:40) переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят 70% этиловым спиртом до метки (раствор А). 5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор Б). Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО

рутина при длине волны 412 нм.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в траве гречихи посевной в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * m_0 * 40 * 25 * 100 * 100}{D_0 * m * 5 * 50 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО рутина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Приготовление государственного стандартного образца рутина. Около 0,025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После растворения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят 70% этиловым спиртом до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3% раствора алюминия хлорида и доводят 95% этиловым спиртом до метки (испытуемый раствор Б). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А рутина, помещенного в мерную колбу на 25 мл и доведенного 95% этиловым спиртом до метки (раствор сравнения Б рутина).

Выводы:

1. Разработана методика качественного анализа гречихи посевной.
2. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в гречихе посевной.
3. Изучена динамика накопления флавоноидов в зависимости от времени сбора, части растения и времени экстракции.
4. Обосновано использование ГСО рутина в методиках анализа флавоноидов гречихи посевной.
5. Предложен новый вид лекарственного растительного сырья «Гречихи посевной трава» как перспективного источника флавоноидов, в том числе рутина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Государственный реестр лекарственных средств. Том I. Официальное издание. – М., 2008. – 1398 с.
2. Евдокимова, О.В. Препараты растительного происхождения при хронической венозной недостаточности // Новая аптека. 2006. № 4. С. 11-12.
3. Крикова, А.В. Биологическая активность растительных источников флавоноидов / А.В. Крикова, Р.С. Давыдов, Ю.Н. Мокин и др. // Фармация. 2006. Т. 54, № 3. С. 17-18.
4. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. 1239 с.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FLAVONOIDS IN BUCKWHEAT SOWING GRASS

© 2010 M.M. Anisimova, V.A. Kurkin, V.N. Ezhkov

Samara State Medical University

Now the special place in the pharmaceutical market is occupied with the medicinal preparations of phyto-genesis containing flavonoids which possess a wide spectrum of biological activity, including antioxidative, hepatoprotective, capillar-strengthen and angioprotective. To the perspective sources of reception the flavonoid preparations, including rутinum, it is possible to refer buckwheat sowing grass (*Fagopyrum sagittatum* Gilib.), widely cultivated in Russian Federation, however still has unresolved a problem of standardization of raw material of the given plant. New approaches to standardization of sowing buckwheat raw material are offered. Original techniques of definition the parameters of quality of raw material which are recommended for including in normative documentation are developed. The contents of rутinum in a buckwheat sowing grass cultivated in Samara oblast, is in the range of 2,50-3,70%. Dynamics of flavonoids accumulation depending on phase of vegetation of a plant is studied.

Key words: *sowing buckwheat, Fagopyrum sagittatum Gilib., angioprotective action, rутinum, flavonoids*

Mariya Anisimova, Post-graduate Student. E-mail: margola@inbox.ru
Vladimir Kurkin, Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the
Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy.
E-mail: vakur@samaramail.ru
Vladimir Ezhkov, Candidate of Pharmacy, Professor at the Department
of Organization and Economy of Pharmacy