

УДК 615:322

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

© А.А. Лобанова^{1*}, В.В. Будаева², Г.В. Сакович³

¹ФГУП «Федеральный научно-производственный центр «Алтай»», Бийск, 659322 (Россия), e-mail: post@frpc.secna.ru

²ЗАО «Алтехнохим», Бийск, 659322 (Россия) e-mail: atch@frpc.secna.ru

³Институт проблем химико-энергетических технологий, Бийск, 659322 (Россия) e-mail: admin@ipcet.ru

Разработаны методики качественного и количественного определения флавоноидов и исследовано их содержание в экстрактах из растительного сырья различного происхождения.

Работа выполнена по проекту ХТРС 8.1.17

Введение

Биофлавоноиды – это обширная группа фенольных соединений растительного происхождения, имеющих общую дифенилпропановую структуру и обладающих капилляроукрепляющей (так называемой Р-витаминной активностью).

Успешное использование Р-витаминных препаратов при лечении и профилактике целого ряда заболеваний привлекло внимание многих исследователей с целью поиска новых источников и разработки технологии Р-витаминных препаратов.

Нами проведены исследования по возможности получения известных и новых препаратов, содержащих биофлавоноиды, с учетом растительных ресурсов Алтайского края.

Новые Р-витаминные препараты: экстракты шрота облепихи (жидкий и густой), экстракт шрота калины, экстракт корневищ бадана (жидкий и сухой), экстракт листа лопуха. Известные препараты: экстракты левзеи, боярышника, календулы.

Для оптимизации способов получения вышеуказанных экстрактов, стандартизации полученных препаратов очень важно разработать методику качественного и количественного определения биофлавоноидов в рассматриваемых объектах, которая является простой, нетрудоемкой и обладает хорошей точностью и воспроизводимостью.

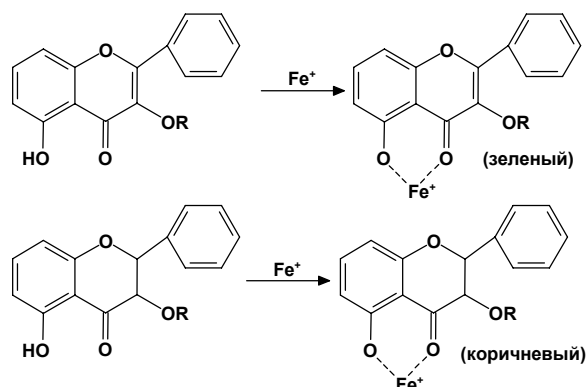
Обсуждение результатов

Биофлавоноиды – сложные соединения с большим количеством реакционных групп, поэтому их химические свойства представлены в литературе достаточно широко.

Для качественного определения биофлавоноидов нами выбраны две наиболее характерные реакции: это реакция с хлоридом железа (III) и цианидиновая проба.

При взаимодействии биофлавоноидов с хлоридом железа (III) флавонолы (рутин, кверцетин, кемпферол) образуют комплексы, окрашенные в зеленый цвет, а флаваноны (дигидрофлавоны) — комплексы, окрашенные в коричневый цвет.

* Автор, с которым следует вести переписку.



В таблице 1 представлены результаты взаимодействия вышеуказанных экстрактов с хлорным железом.

Коричнево-зеленую окраску дают экстракты, имеющие в своем составе широкий спектр флавоноидов. Черное окрашивание с кратковременным появлением зеленого связано с присутствием дубильных веществ, содержание которых значительно превосходит содержание флавоноидов. Для лучшего наблюдения за окрашиванием сухие, густые и непрозрачные экстракты необходимо разбавлять в 10–50 раз.

Взаимодействие карбонильной группы флавоноидов со свободным водородом приводит к образованию насыщенного пиранового цикла, который под действием соляной кислоты превращается в оксониевые соединения, имеющие окраску от оранжевого до красно-фиолетового цвета.

В таблице 2 приведены результаты цианидиновой пробы. Обязательным является нагревание, некоторый временной интервал и сравнение с контрольной пробой на белом фоне.

Таблица 1. Результаты взаимодействия флавоноидов с хлорным железом

№ п/п	Наименование экстракта	Наблюдаемое окрашивание
1	Раствор рутина	Зеленое
2	Экстракт из шрота облепихи а) жидкий б) густой	Коричнево-зеленое Коричнево-зеленое
3	Экстракт из шрота калины	Темно-зеленое
4	Экстракт из листа лопуха	Интенсивно зеленое
5	Экстракт корневищ бадана а) жидкий б) сухой	Черное с кратковременным появлением зеленого Черное с кратковременным появлением зеленого
6	Экстракт левзеи	Зеленое
7	Экстракт боярышника	Интенсивно зеленое
8	Экстракт календулы	Зеленое

Таблица 2. Результаты качественного анализа флавоноидов с помощью цианидиновой пробы

№ п/п	Наименование экстракта	Условия приготовления пробы	Наблюдаемое окрашивание
1	Раствор рутина	1 мл	Красно-коричневое
2	Экстракт из шрота облепихи а) жидкий б) густой	1 мл, 40 °С, 4–5 мин 1 г в 25 мл, 40 °С, 4–5 мин	Красно-коричневое Красно-коричневое
3	Экстракт из шрота калины	1 мл, 40 °С, 10 мин	Розовое
4	Экстракт из листа лопуха	1 мл, 40 °С, 5 мин	Красно-коричневое
5	Экстракт корневищ бадана а) жидкий б) сухой	1 мл 0,5 г в 50 мл	Не наблюдается Не наблюдается
6	Экстракт левзеи	1 мл, 40 °С, 4–5 мин	Красно-коричневое
7	Экстракт боярышника	1 мл, 40 °С, 15 мин	Красно-коричневое
8	Экстракт календулы	1 мл, 40 °С, 10 мин	Красно-коричневое

Неудача с цианидиновой пробой в экстракте бадана связана с небольшим содержанием флавоноидов и интенсивной темной окраской исходного экстракта.

Из всех известных методов количественного определения флавоноидов наиболее интересными являются хроматографический метод [1] и метод, основанный на спектрофотометрировании комплексов флавоноидов с ионами металлов [2].

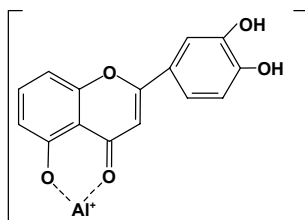
Нами был выбран метод спектрофотометрического анализа комплексов в связи с его большей экспрессностью и использованием оборудования, доступного для любой центральной заводской и других контролирующих лабораторий.

В качестве основы для разработки методики мы использовали метод [2], предполагающий спектрофотометрический анализ комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия.

Отличие разработанной нами методики от описанной в литературе состоит в том, что:

- в качестве стандарта используется тот флавоноид (ГСО рутин, кверцетин, гесперетин и т.д.), максимум поглощения комплекса которого наиболее соответствует максимуму поглощения комплекса с хлоридом алюминия исследуемого образца;
- построение калибровочного графика проводят на основе раствора стандартного образца в 60%-ном спирте, а не в абсолютном спирте или ацетоне;
- в процессе анализа не используются добавки кислот, поскольку нами установлено, что они не оказывают стабилизирующего действия.

На рисунке 1 приведены спектры поглощения комплексов биофлавоноидов с хлоридом алюминия.

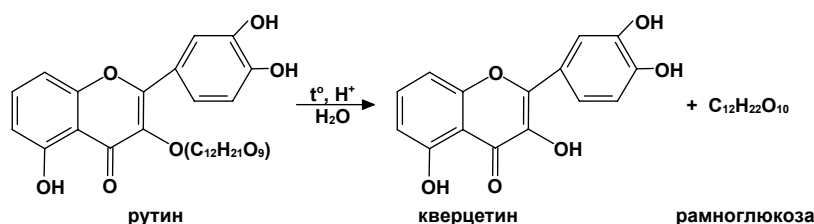


Как видно, для большинства исследуемых экстрактов в качестве стандарта может служить рутин, а определение содержания суммы биофлавоноидов в пересчете на рутин следует проводить в интервале λ_{max} 408–420 нм. Для экстрактов, имеющих максимум поглощения в области 421–435 нм, следует использовать в качестве стандарта кверцетин. В таблице 3 представлены результаты анализа некоторых экстрактов.

Как следует из приведенных данных, определение содержания флавоноидов в препаратах имеет удовлетворительную относительную погрешность измерения от 1 до 7%. По результатам исследований выпущены методики: «Определение массовой доли суммы Р-активных флавоноидов в жидких экстрактах из растительного сырья» (7508906.01007.00109); «Определение массовой доли суммы Р-активных флавоноидов в экстракте густом из шрота облепихи» (7508906.01007.00093).

Разработанная методика была использована при оптимизации способов получения Р-витаминных препаратов из плодово-ягодных жомов и шротов.

В частности, при оптимизации режимов получения экстрактов из шрота облепихи мы проследили изменение соотношения рутин : кверцетин в случае отклонения от температурного режима. Рутин — гликозид кверцетина — при перегревах реакционной массы гидролизуется с образованием кверцетина и соотношение рутин : кверцетин уменьшается, при этом наблюдается смещение максимума поглощения от 415 до 424 нм с небольшим изменением оптической плотности. Такое явление не снижает качества Р-витаминного препарата, поскольку кверцетин более активен, чем рутин.



Результаты представлены в таблице 4.

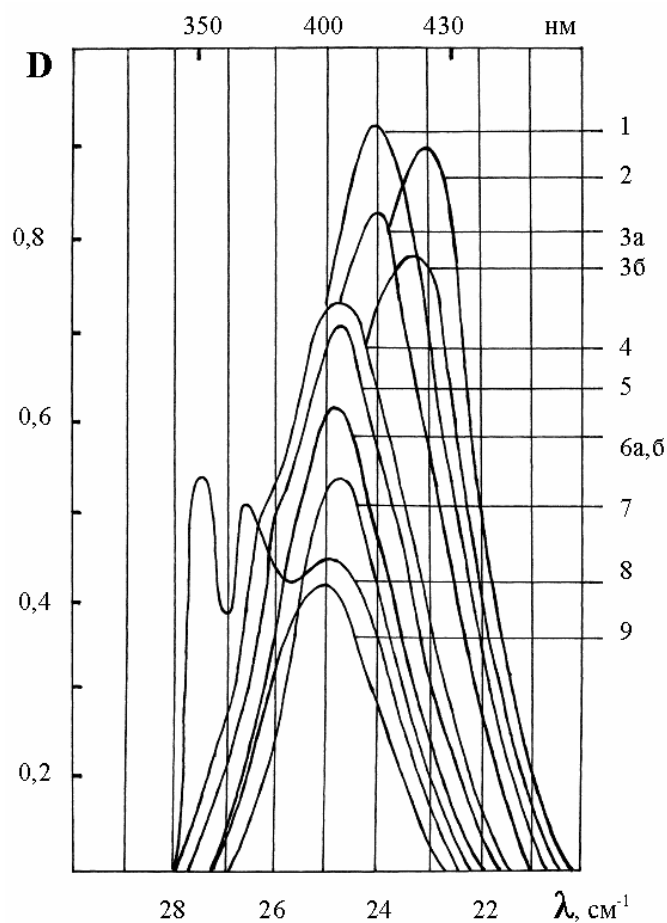


Рис. 1. УФ-спектры поглощения комплексов биофлавоноидов с AlCl_3 :
1 – рутин; 2 – кверцетин; 3а, 3б – экстракты шрота облепихи жидкий и густой;
4 – экстракт листа лопуха; 5 – экстракт левзеи; 6а,б – экстракты корневищ бадана жидкий и сухой; 7 – экстракт боярышника; 8 – экстракт шрота калины; 9 – экстракт календулы

Для установления соотношения флавоноидов предварительно строили калибровочную кривую зависимости λ_{max} от соотношения рутин:кверцетин. В качестве стандартных образцов использовали ГСО рутина и кверцетина.

Таблица 3. Содержание суммы флавоноидов в препаратах

№ п/п	Наименование экстракта	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин	Стандартное отклонение	Относительная погрешность измерения, %
1	Экстракт из шрота облепихи а) жидкий б) густой	1,45 г/л 1,65 %	0,04 г/л 0,05 %	2,7 3,2
2	Экстракт из листа лопуха	1,06 г/л	0,07 г/л	6,6
3	Экстракт левзеи	0,99 г/л	0,01 г/л	1,4
4	Экстракт боярышника	0,39 г/л	0,02 г/л	6,1
5	Экстракт календулы	0,48 г/л	0,02 г/л	3,3

Таблица 4. Соотношение рутина и кверцетина в продуктах переработки шрота облепихи

№ п/п	Наименование	λ_{max} комплекса, нм	Соотношение рутин : кверцетин, вес. ч.	Отклонение от технологии
1	Шрот облепихи	415	1 : 0	—
2	Экстракт жидкий	415	1 : 0	—
3	Экстракт густой	419	4 : 1	Перегрев, длительное пребывание в аппарате
4	Жевательная резинка с экстрактом густым	424	5 : 3	Перегрев при смешении

Метод количественного определения флавоноидов в виде комплекса можно использовать для стандартизации известного фармпрепарата – жидкого экстракта левзеи; поскольку предложенный сегодня метод стандартизации этого экстракта по активному веществу плохо воспроизводится и является сложным и громоздким [3].

Кроме того, указанная методика позволила дополнительно провести анализ не только экстрактов из ягодного сырья, но и медицинских препаратов, которые ранее не исследовались на содержание флавоноидов.

Комплексы с $AlCl_3$, полученные из вышеуказанных веществ, имеют следующие максимумы поглощения:

		λ_{max} , нм
экстракт черноплодной рябины	—	405; 525
экстракт жомы брусники	—	415; 560
экстракт из листа облепихи	—	400
экстракт из веток лимонника	—	409
экстракт элеутерококка	—	376
настойка аралии	—	360

Полученные результаты свидетельствуют о широких возможностях разработанного метода и при использовании соответствующих стандартных образцов, можно провести количественное определение флавоноидов в известных фармпрепаратах.

Очевидно, что описанный выше метод может быть использован для контроля качества серии пищевых продуктов: бальзамов алкогольных и безалкогольных, имеющих очень сложный состав, включающий до 40 наименований лекарственного растительного сырья Алтайского края. Таким образом, проблема идентификации бальзамов и исключения фальсификатов с потребительского рынка может быть решена любой контролирующей организацией (органами госсанэпиднадзора, сертификации и т.д.), имеющей химическую лабораторию и оригиналы производителей бальзамов в качестве эталона.

Кроме того, в экстрактах из плодово-ягодного сырья при соответствующей доработке метода можно дополнительно определять содержание антоцианов (λ_{max} 520–580 нм), а также с помощью метода контролировать качество пищевых красителей, содержащих антоцианы.

Экспериментальная часть

Для получения экстрактов использовалось высушенное растительное сырье с влажностью не более 13%.

Жидкие экстракты получали многоступенчатой противоточной экстракцией с чередованием настоя и движением жидкости через экстракторы. Содержание сухих веществ в жидких экстрактах составляло 8–18% в зависимости от используемого сырья.

Густые экстракты получали сгущением жидких путем упаривания в вакууме. Содержание сухих веществ в густых экстрактах — 60–70%.

Использовали соответствующие Госфармакопее известные фармпрепараты.

УФ-спектры снимали на приборе Specord M-40.

Общая методика определения содержания суммы флавоноидов в жидких экстрактах.

В мерную колбу вместимостью 25 мл, предварительно взвешенную, переносят с помощью пипетки аликвоту анализируемого экстракта, равную 1 мл, и вновь взвешивают. В колбу с помощью пипетки добавляют 4 мл 5% раствора хлорида алюминия. Для приготовления раствора сравнения во вторую колбу вместимостью 25 мл с помощью пипетки переносят аликвоту (1 мл) анализируемого экстракта, после чего объем обеих колб доводят до метки 60% спиртом и оставляют на 30 мин. В случае помутнения растворов их фильтруют через бумажные фильтры в чистые стаканы.

Оптическую плотность измеряют в интервале 408–616 нм на длине волны максимума поглощения в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см, в рабочую кювету помещают раствор с добавленным хлоридом алюминия, в кювету сравнения – раствор сравнения. Если максимум поглощения расположен в области 408–420 нм, в качестве стандарта используют ГСО рутина.

Для построения калибровочного графика зависимости оптической плотности от количества рутина в растворе точную навеску ГСО рутина около 0,05 г количественно переносят в мерную колбу

вместимостью 50 см³, прибавляют отмеренные 40 мл 60% водного спирта, нагревают до 50–60 °С до растворения рутина, затем охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки 60% спиртом.

Для приготовления комплекса с хлоридом алюминия в мерные колбы А и Б вместимостью 25 мл переносят по аликвоте раствора рутина и обрабатывают аналогично указанному выше, получая при этом раствор с комплексом и раствор сравнения. Используют аликвоты раствора рутина, см³: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2. При этом количество рутина в 25 см³ спектрофотометрируемого раствора равно соответственно $г \times 10^3$: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 415 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см; в рабочую кювету помещают раствор А, в кювету сравнения — раствор Б.

Калибровочный график зависимости оптической плотности (D) от количества рутина в спектрофотометрируемом растворе (с) имеет вид прямой линии, проходящей через начало координат.

Массовую долю суммы Р-активных флавоноидов в исследуемых экстрактах в пересчете на рутин в мг/100 г (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{с \cdot F_p \cdot 10^5}{M}$$

где с — количество рутина в анализируемой аликвоте экстракта, соответствующее измеренной оптической плотности по калибровочному графику, г/25 см³; F_p — фактор разбавления (если такое проводилось); 10⁵ — коэффициент пересчета в мг/100 г; М — масса экстракта, г.

Аналогично проводят определение при расположении максимума поглощения в области 421–435 нм. В качестве стандартного образца используют ГСО кверцетина.

Выводы

Разработаны методики качественного и количественного определения содержания суммы Р-активных флавоноидов и проведены исследования растительного сырья, экстрактов из плодово-ягодного сырья, нетрадиционных экстрактов из веток и листьев, а также известных фармпрепаратов на содержание витамина Р.

Список литературы

1. Киселева Т.Л., Самошина И.А. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах боярышника // МРЖ. Сер. 22. №4. 1988. С. 30–32.
2. А. с. СССР № 1507394. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье / В.В. Беликов, Н.Т. Колесник. 1989.
3. Фармакопейная статья ФС 42-1995-99 «Экстракт левзеи жидкий»

Поступило в редакцию 16 января 2004 г.