

Рекомендована д. фармац. наук, проф. В. М. Ковальовим

УДК 615.322:582.689.1:577.127.4

ВИВЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ ТРАВИ ВЕРБОЗІЛЛЯ ЛУЧНОГО

© **А. Є. Демид**

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: представлено результати ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів трави вербозілля лучного. Показано, що якісний склад флавоноїдів трави вербозілля лучного представлений глікозидами мірицетину. Вміст флавоноїдів у дикорослих зразках сировини становить $(1,07 \pm 0,02)$ % у перерахунку на рутин.

Ключові слова: трава вербозілля лучного, флавоноїди, хроматографія, спектрофотометрія, мірицетин, рутин, кількісний вміст.

Вступ. Офіційна медицина не застосовує траву вербозілля лучного і лише невелика кількість зборів від кашлю та простуди містять цю рослинну сировину [1]. Досвід його використання у народній медицині (гемостатичний, жовчогінний, тонізуючий, протицинготний, протизапальний, в'яжучий, антисептичний засіб) [1–4] робить перспективним дослідження цієї лікарської рослинної сировини. Її фармакологічна активність зумовлена наявністю таких різних груп біологічно активних речовин (БАР), як конденсовані дубильні речовини, вітамін С, сапоніни тритерпенового ряду, лактони, смоли, кремнієва кислота та флавоноїди [2, 3, 5]. Тому ідентифікація та кількісне визначення БАР трави вербозілля лучного та її стандартизація є актуальними.

Флавоноїди беруть активну участь у загальній дії будь-якої з лікарських рослин. Потрапляючи в організм людини з їжею, вони впливають на регуляцію ферментних процесів у клітинах, мають сильні антиоксидантні властивості – нейтралізують вільні радикали, що утворюються при дії ультрафіолетового випромінювання, захищають тканини від пошкоджень, які є наслідком алергічних реакцій та запальних процесів.

Гемостатична, жовчогінна, седативна, протизапальна, антибактеріальна, антиоксидантна дії пов'язані із вмістом флавоноїдів у лікарській рослинній сировині (ЛРС). Дія кожної ЛРС визначається її точним хімічним складом. Тому метою даної роботи було дослідження якісного та кількісного складу флавоноїдів трави вербозілля лучного.

Методи дослідження. Для досліджень використовували дикорослий рослинний матеріал, зібраний у Тернопільському районі Тернопільської області.

Для ідентифікації флавоноїдів використовували методи тонкошарової хроматографії (ТШХ) і

високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), для кількісного визначення – метод спектрофотометрії.

Спиртові витяги для ТШХ-аналізу отримували таким чином: 0,5 г (точна наважка) сировини, подрібненої і просіяної через сито діаметром 2 мм, поміщали в конічну колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл спирту етилового потрібної концентрації (10, 20, 40, 60, 95 %) і нагрівали із зворотним холодильником впродовж 45 хв на киплячій водяній бані. Після охолодження спиртовий витяг фільтрували в мірну колбу місткістю 100 мл, двічі промивали колбу тим же спиртом, додаючи отримані розчини до фільтрату. Об'єм фільтрату доводили спиртом відповідної концентрації до позначки.

Вивчення якісного складу агліконів флавоноїдів трави вербозілля лучного проводили після попереднього гідролізу з отриманих етилацетатних витягів.

Етилацетатні витяги для ТШХ- і ВЕРХ-аналізу отримували за такою методикою: у конічну колбу місткістю 100 мл відважували 0,5 г (точна наважка) сировини, подрібненої і просіяної через сито діаметром 2 мм, додавали 1,0 мл розчину гексаметилентетраміну Р (5 г/л), 25 мл ацетону Р і 7,0 мл хлористоводневої кислоти Р1. Кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджували і фільтрували рідину через фільтр "синя стрічка" у мірну колбу місткістю 100 мл. Витягнення повторювали ще два рази по 25 мл ацетону Р, кожного разу прокип'ятивши зі зворотним холодильником 10 хв, промивали колбу і фільтр ацетоном Р.

Ацетоновий витяг переносили у випарну чашку і упарювали на водяній бані до об'єму близько 20 мл після чого переносили у ділильну лійку місткістю 100 мл. У ділильну лійку додавали 20 мл води Р і 15 мл етилацетату Р, струшували протягом 15 хв. Після розділення шарів, нижній

(водний) шар зливали у конічну колбу, місткістю 50 мл, а верхній (органічний) зливали у конічну колбу 100 мл і закривали корком. Екстракцію водного шару повторювали 2 рази по 15 мл етилацетату Р за вказаних вище умов. Об'єднані етилацетатні витягнення за допомогою 25 мл води Р переносили назад у ділильну лійку і струшували 2 рази з водою Р по 25 мл і 50 мл, відповідно, протягом 5 хв. Етилацетатні витяги фільтрували через фільтр "біла стрічка" з 5 г натрію сульфату безводного Р у випарну чашку місткістю 50 мл (фільтр з натрію сульфатом безводним Р попередньо змочували етилацетатом Р) і упарювали на водяній бані до сухого залишку. Отриманий сухий залишок розчиняли в 20 мл метанолу.

Методика ТШХ-аналізу спиртових витягів з трави вербозілля лучного. На лінію старту хроматографічної пластинки з шаром силікагелю (Silica gel 60 F254 «Merk») окремо смугами по 10 мм наносили по 20 мкл випробовуваних спиртових витягів, отриманих за допомогою різних концентрацій спирту етилового, та по 5 мкл розчинів стандартних зразків речовин-свідків. Пластинку поміщали у камеру із сумішшю розчинників кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р (6:9:90). Коли фронт розчинників пройшов 12 см від лінії старту, пластинку виймали з камери, сушили на повітрі, а потім витримували при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 2 хв, після чого теплі пластинки обприскували розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, сушили на повітрі. Через 10 хв пластинки обприскували розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, сушили на повітрі протягом 30 хв і переглядали в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Як речовини-свідки використано лютеолін, лютеолін-7-глюкозид, апігенін, апігенін-7-глюкозид, рутин, гіперозид, ізосаліпурпозид, кверцетин, розмаринова, хлорогенова, ферулова, цинкорієва і кофейна кислоти.

Методика ТШХ-аналізу етилацетатних витягів із трави вербозілля лучного після попереднього гідролізу. На лінію старту хроматографічної пластинки з шаром силікагелю (Silica gel 60 F254 «Merk») окремо смугами по 10 мм наносили по 5 мкл випробовуваних метанольних розчинів етилацетатного витягу, отриманого як вказано вище, та по 5 мкл розчинів стандартних зразків речовин-свідків. Пластинку поміщали у камеру із сумішшю розчинників хлороформ Р – метанол Р – метилетилкетон Р – ацетилацетон Р (70:10:5:1) або хлороформ Р – кислота оцтова Р (5:2). Коли фронт розчинників пройшов 12 см від лінії старту, пластинку виймали з камери, су-

шили на повітрі, а потім витримували при температурі від 100 до 105 °С протягом 2 хв, після чого теплі пластинки обприскували розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, сушили на повітрі. Через 10 хв пластинки обприскували розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, сушили на повітрі протягом 30 хв і переглядали в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Як речовини-свідки використано лютеолін, кемпферол, ізорамнетин, кверцетин, нарингенін, мірицетин, апігенін.

Методика ВЕРХ-аналізу етилацетатних витягів з трави вербозілля лучного після попереднього гідролізу. Хроматографування проводили на рідинному хроматографі із спектрофотометричним детектором із використанням колонки "XTerra C 18" (фірми "Waters", Ірландія), розміром 4,6 x 250 мм, заповненої сорбентом з розміром частинок 5 мкм, застосовуючи градієнтне елюювання ацетонітрилом і розчином натрій дигідрофосфату з кислотою фосфорною (рН = 2,5) зі швидкістю рухомої фази 1,0 мл/хв. Детектування проводили за довжини хвилі 210, 330 нм, 370 нм.

Як речовини-свідки використано лютеолін, кемпферол, ізорамнетин, кверцетин, нарингенін, мірицетин, апігенін.

Порядок виходу піків на хроматограмі розчинів стандартних зразків речовин-свідків наступний: мірицетин, лютеолін, кверцетин, нарингенін, апігенін, ізорамнетин, кемпферол.

Всі використовувані розчини реактивів відповідали вимогам і були приготовлені, відповідно до вимог ДФУ [6,7].

Для спектрофотометричних досліджень використовували спиртові витяги, підготовлені як було вказано вище. Запис електронних спектрів поглинання і вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі Carry – 50 М.

Методика кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів.

Випробовуваний розчин. Аліквотну частину спиртового витягу, достатню для отримання оптичної густини розчину в межах 0,4-0,6, поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 3,00 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводили об'єм розчину спиртом етиловим (70 % об./об.) до позначки, перемішували і залишали стояти 45 хв.

Компенсаційний розчин для випробовуваного розчину. Аліквотну частину відповідного спиртового витягу поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл та доводили об'єм розчину спиртом етиловим (70 % об./об.) до позначки, перемішували і залишали стояти 45 хв.

Розчин стандартного зразка рутину. 0,05 г (точна наважка) стандартного зразка рутину поміща-

ли у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл спирту етилового (70 % об./об.) і розчиняють, доводять об'єм отриманого розчину тим же спиртом до позначки, перемішують.

Розчин порівняння. 1,0 мл розчину стандартного зразка рутину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 3,00 мл 3 % розчину алюмінію хлориду і доводили об'єм розчину спиртом етиловим (70 % об./об.) до позначки, перемішували і залишали стояти 45 хв.

Компенсаційний розчин для розчину порівняння. 1,0 мл розчину стандартного зразка рутину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину спиртом етиловим (70 % об./об.) до позначки, перемішували і залишали стояти 45 хв.

Записували електронні спектри поглинання в діапазоні довжин хвиль 350 – 450 нм і вимірювали оптичну густину випробовуваних розчинів в максимумі поглинання.

Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння при довжині хвилі 412 нм.

Вміст суми флавоноїдів у сировині в перерахунок на рутин (X) розраховували за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot A_x \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot V \cdot m_{\text{нав}} \cdot (100 - W)},$$

де A_x – оптична густина випробовуваного розчину; m_0 – маса наважки стандартного зразка рутину, в г; A_0 – оптична густина розчину порівняння; $m_{\text{нав}}$ – маса сировини, взятої для аналізу, в г; V – об'єм аликвоти досліджуваного спиртового витягу, необхідний для отримання оптичної густини в межах 0,400–0,600; W – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

Результати й обговорення. Першим етапом наших досліджень було вивчення якісного складу флавоноїдів методом ТШХ без попереднього гідролізу у системі розчинників кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р (6:9:90). Спостерігали різні за кольором, розміром та інтенсивністю зони. Узагальнені результати ТШХ-аналізу флавоноїдів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Результати виявлення фенольних сполук трави вербозілля лучного у його спиртових вилученнях методом ТШХ

Забарвлення зони на хроматограмі випробовуваного розчину	R_f	Речовина
Жовто-оранжева флуоресценція	0,08	Рутин
Блакитна флуоресценція	0,25	Кислота хлорогенова
Жовто-оранжева флуоресценція	0,37	Невідомий глікозид (основна зона)
Жовто-оранжева флуоресценція	0,49	Невідомий глікозид
Жовто-оранжева флуоресценція	0,96	Невідомий аглікон

Результати цих досліджень вказують на наявність рутину і кислоти хлорогенової, трьох невідомих сполук одного аглікону і двох глікозидів.

Для вивчення агліконової природи флаво-

ноїдів проводили попередній гідроліз, як описано вище. Отримані метанольні розчини агліконів аналізували методами ТШХ і ВЕРХ. Узагальнені результати ТШХ-вивчення флавоноїдів у цій серії досліджень наведено в таблиці 2.

Таблиця 2. Результати виявлення флавоноїдів трави вербозілля лучного після попереднього гідролізу методом ТШХ

Забарвлення зони на хроматограмі випробовуваного розчину	R_f	Речовина
<i>Система розчинників 1.</i>		
Жовто-оранжева флуоресценція	0,11	Мірицитин
Жовто-оранжева флуоресценція	0,29	Кверцетин
<i>Система розчинників 2.</i>		
Жовто-оранжева флуоресценція	0,08	Мірицитин
Жовто-оранжева флуоресценція	0,19	Кверцетин

Примітка. Система розчинників 1 – хлороформ Р – метанол Р – метилетилкетон Р – ацетилацетон Р (70:10:5:1); Система розчинників 2 – хлороформ Р – кислота оцтова Р (5:2)

Результати цих досліджень доводять наявність таких речовин: мірицитин та сліди кверцетину.

Результати, отримані методом ТШХ, підтверджено методом ВЕРХ. У траві вербозілля лучного

ідентифіковано два аглікони, що за часом утримання збігаються з часом утримання стандартних зразків, які були ідентифіковані як мірицитин і кверцетин (рис. 1).

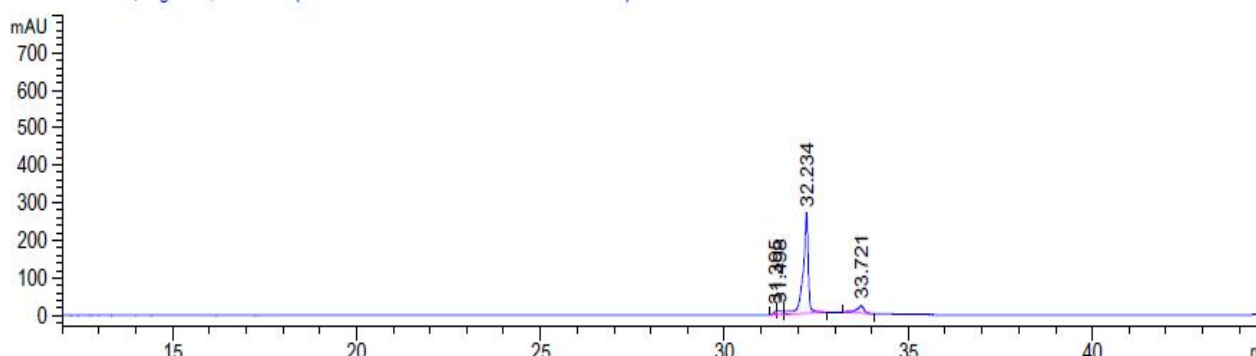


Рис. 1. ВЕРХ-хроматограма метанольного розчину агліконів флавоноїдів трави вербозілля лучного (час виходу мірицетину – 32,2 хв, кверцетину – 33,7 хв).

Електронний спектр поглинання спиртових витягів трави вербозілля лучного в умовах комплексоутворення флавоноїдів з алюмінію хлоридом подібний до електронного спектра поглинання рутину за положенням максимуму поглинання та за ходом кривої світлопоглинання (рис. 2). Максимум поглинання комплексної сполуки мірицетину з алюмінію хлоридом, як і для всіх агліконів порівняно з їхніми глікозидами, зміщений батохромно – довжина хвилі максимуму

поглинання 437 ± 2 нм (рис. 3), що не дозволяє використати мірицетин для кількісного розрахунку вмісту суми флавоноїдів трави вербозілля лучного. Трава містить глікозидну форму мірицетину, тому неможливо проводити перерахунок вмісту флавоноїдів на аглікон мірицетин. Зважаючи на присутність слідових кількостей рутину (за результатами ТШХ-аналізу) і подібність спектрів поглинання, кількісний вміст флавоноїдів визначали в перерахунку на рутин.

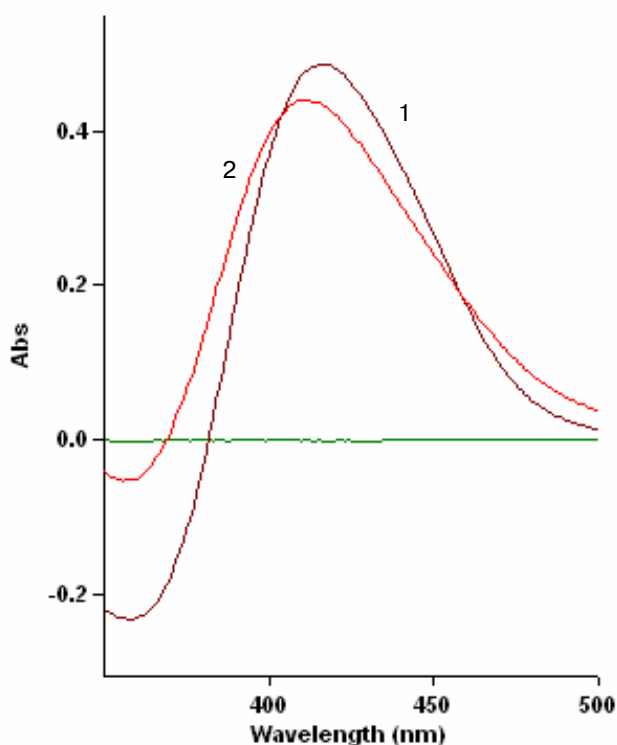


Рис. 2. Диференціальні електронні спектри поглинання розчинів флавоноїдів з алюмінію хлоридом: 1 – рутину ($\lambda_{\text{макс.}} = 412 \pm 2$ нм); 2 – флавоноїдів зі спиртового витягу трави вербозілля лучного ($\lambda_{\text{макс.}} = 411 \pm 2$ нм).

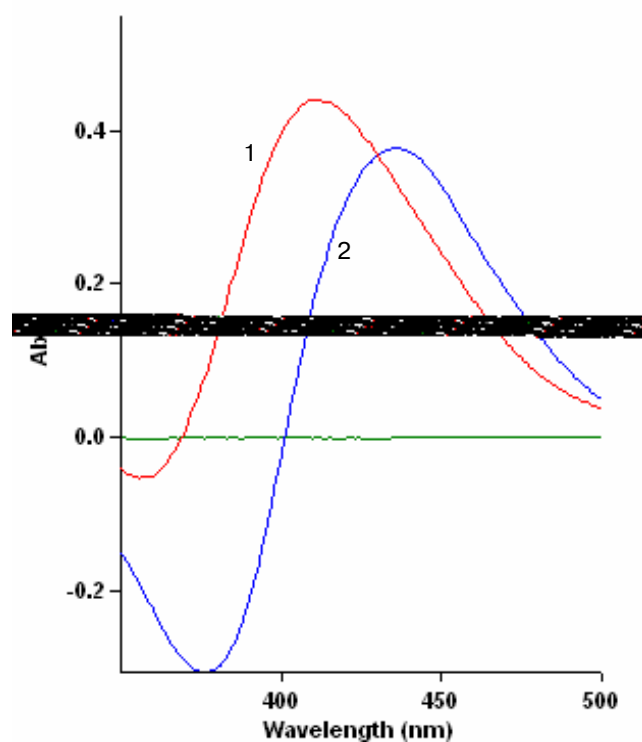


Рис. 3. Диференціальні електронні спектри поглинання розчинів флавоноїдів з алюмінію хлоридом: 1 – флавоноїдів зі спиртового витягу трави вербозілля лучного ($\lambda_{\text{макс.}} = 411 \pm 2$ нм); 2 – мірицетину ($\lambda_{\text{макс.}} = 437 \pm 2$ нм).

У результаті додатково проведених досліджень встановлено, що найбільш повне вилучення флавоноїдів з трави вербозілля лучного досягають шляхом використання спирту

етилового (60 – 80 % об./об.) як екстрагента. При збільшенні концентрації спирту в екстрагенті вміст флавоноїдів не збільшувався (табл. 3).

Таблиця 3. Результати визначення вмісту суми флавоноїдів у траві вербозілля лучного залежно від концентрації спирту етилового, використаного при приготуванні спиртових витягів (n = 5, P = 0,95)

Вміст спирту в екстрагенті, який використовували для отримання витягу, %	Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин, %
10	0,05 ± 0,01
20	0,09 ± 0,01
30	0,32 ± 0,01
40	0,46 ± 0,02
50	0,98 ± 0,01
60	1,07 ± 0,01
70	1,07 ± 0,02
80	1,05 ± 0,01
90	0,94 ± 0,01
95	0,84 ± 0,02

Таким чином, кількісний вміст флавоноїдів, визначений методом диференціальної спектрофотометрії, становить (1,07 ± 0,02) % у перерахунку на рутин. Для кількісного вилучення флавоноїдів в процесі подальших досліджень слід використовувати 60–70 % (об./об.) спирт етиловий.

Висновки. 1. Методом ТШХ та ВЕРХ було вивчено склад флавоноїдів трави вербозілля лучного. Встановлено, що у досліджуваній сировині присутній рутин і невідомого складу два глікозиди мірицетину, агліконовий склад представлений кверцетином і мірицетином (основний представник), з фенолкарбонових кислот присутня кислота хлорогена.

2. Досліджено, що для кількісного визначення флавоноїдів у траві вербозілля лучного можна застосовувати спектрофотометричну методику із застосуванням реакції комплексоутворення з алюмінію хлоридом та перерахунком вмісту на рутин.

3. Зважаючи на значний вміст флавоноїдів у траві вербозілля лучного (1,07 ± 0,02 %), перспективним є подальше вивчення їх біологічної активності з метою визначення специфічних видів активності і дослідження можливостей застосування цієї сировини для створення нових лікарських засобів.

Література

1. Палов М. А. Энциклопедия лекарственных растений; пер. с нем. / М. А. Палов, И. А. Губанова. – М.: Мир, 1998. – 467 с.
2. Святош І. В. Фармакогностичне дослідження рослин роду *Lysimachia* / І. В. Святош, Т. О. Краснікова // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: наук.-практ конф. студентів та молодих вчених, 21 - 22 квітня 2011 р.: матеріали конф. – Харків : НФау. – С. 118-119.
3. Лавренова Г. В. Энциклопедия лекарственных растений. Том 1. / Г. В. Лавренова, В. К. Лавренъев. – Донецк : Издательство “Донеччина”, 1997. – 656 с.
4. Марчишин С. М. Лікарські рослини Тернопільщини / С. М. Марчишин, Н. О. Сушко. – Тернопіль : Навчаль-

на книга – Богдан, 2007. – 312 с.

5. Георгиевский В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. – Новосибирск : Наука, 1990. – 328 с.

6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків : Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. – 620 с.

7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків : PIPEГ, 2001. – 556 с

ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ ВЕРБЕЙНИКА МОНЕТЧАТОГО

А. Е. Демид

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: представлены результаты идентификации и количественного определения флавоноидов травы вербейника монетчатого. Показано, что качественное содержание флавоноидов травы вербейника монетчатого представлен гликозидами мирицетина. Содержание флавоноидов в дикорастущих образцах сырья ($1,07 \pm 0,02$) % в пересчете на рутин.

Ключевые слова: трава вербейника монетчатого, флавоноиды, хроматография, спектрофотометрия, мирицетин, рутин, количественное содержание.

INVESTIGATION OF FLAVONOIDS IN MONEYWORT HERBS

A. Ye. Demyd

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: there are presented the results of flavonoids identification and quantification in the moneywort herb. It is shown that the total flavonoids quality content in the herb moneywort is represented myricetin glycosides. Flavonoids content in wild specimens of raw materials is ($1,07 \pm 0,02$) % in the re-calculation of routine.

Key words: moneywort herb, flavonoids, chromatography, spectrophotometry, myricetin, routine, quantitative content.