

УДК 615.322:547.972.2].074(571.15)

DOI 10.17816/pmj35195-101

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ХАТЬМЫ ТЮРИНГЕНСКОЙ ТРАВЕ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ

*Л.М. Федосеева, О.А. Мызникова\**

*Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул, Россия*

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN LAVATERA THURINGIACA L., GROWING IN ALTAI KRAI TERRITORY

*L.M. Fedoseeva, O.A. Myznikova\**

*Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation*

**Цель.** Определение количественного содержания флавоноидов в хатьмы тюрингенской траве, произрастающей на территории Алтайского края.

**Материалы и методы.** Объект исследования – хатьмы тюрингенской трава, заготовленная в разные фазы вегетации на территории Алтайского края. Количественное определение флавоноидов в исследуемом сырье проводили методом дифференциальной спектрофотометрии.

**Результаты.** Установлено, что максимальное накопление флавоноидов в хатьмы тюрингенской траве происходит в период бутонизации (1,14 %) и цветения (1,02 %). Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, извлекаемых 70%-ным спиртом этиловым из сырья, заготовленного в разных районах, меняется незначительно и составляет 1,00–1,23 %.

**Выводы.** Результаты работы свидетельствуют о целесообразности изучения хатьмы тюрингенской в качестве источника флавоноидов.

**Ключевые слова.** *Lavatera thuringiaca L.*, трава, флавоноиды.

**Aim.** To determine the quantitative content of flavonoids in *Lavatera thuringiaca L.*, the grass, growing in Altai Krai.

**Materials and methods.** The object of the study: *Lavatera thuringiaca L.* grass, stored at different phases of vegetation in Altai Krai territory. Quantitative determination of flavonoids in the investigated raw material was fulfilled, using differential spectrophotometry method.

**Results.** Maximum accumulation of flavonoids in *Lavatera thuringiaca L.* grass was found to occur in the period of budding (1.14 %) and blossoming (1.02 %). The sum of flavonoids in terms of rutin, extracted with 70 % ethanol from raw material, stored in different regions, is changed insignificantly and makes 1.00–1.23 %.

**Conclusions.** The results of this work testify expediency of studying *Lavatera thuringiaca L.* as a source of flavonoids.

**Key words.** *Lavatera thuringiaca L.*, grass, flavonoids.

© Федосеева Л.М., Мызникова О.А., 2018

тел. +7 923 713 44 85

e-mail: olga\_myznikova@mail.ru

[Федосеева Л.М. – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармации; Мызникова О.А.

(\*контактное лицо) – аспирант кафедры фармации].

## ВВЕДЕНИЕ

Хатьма тюрингенская (*Lavatera thuringiaca* L.) семейства Мальвовые (*Malvaceae* Juss.) – многолетнее травянистое растение, широко распространённое на территории Алтайского края. Комплекс биологически активных соединений (БАС) хатьмы тюрингенской травы отличается значительным структурным разнообразием и включает полисахариды, фенолокислоты, флавоноиды, конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества, кумарины, что свидетельствует о целесообразности изучения и внедрения данного сырья в научную медицину [4–5]. Необходимо сравнить качественный состав и количественное содержание различных групп соединений в хатьмы тюрингенской траве.

Ранее нами были изучены спиртовое извлечение, эфирная, этилацетатная, бутанольная фракции хатьмы тюрингенской травы и обнаружены фенолокислоты, флавоноиды групп флавона, флавонола, катехина и другие соединения [5].

*Целью данной работы* является определение количественного содержания флавоноидов в хатьмы тюрингенской траве, произрастающей в Алтайском крае.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила хатьмы тюрингенской трава, заготовленная в период бутонизации (июнь), цветения (июль) и плодоношения (август) в 2017 г. Заготовку проводили в семи районах Алтайского края, различающихся по климатическим условиям и уровню техногенной нагрузки: Бийский, Быстроистокский, Калманский, Красногор-

ский, Солтонский, Целинный районы, окрестности города Барнаула.

На первоначальном этапе работы, используя воду очищенную и водно-спиртовые растворы различной концентрации, подбирали экстрагент, извлекающий максимальное количество флавоноидов хатьмы тюрингенской травы.

Количественное содержание суммы флавоноидов в хатьмы тюрингенской траве определяли методом дифференциальной спектрофотометрии по методике Государственной фармакопеи (ГФ) XIII издания (ФС.2.5.0015.15) [1].

Оптическую плотность испытуемых растворов, растворов стандартного образца рутина («Sigma-Aldrich», каталожный номер R5143) измеряли на спектрофотометре «Schimadzu UV-mini 1240» при длине волны 410 нм, что соответствует максимуму поглощения комплексного соединения рутина с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье определяли в пересчёте на рутин. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII издания (ФС.1.1.0013.15) [1].

Валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов в хатьмы тюрингенской траве проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15. Оценивали такие параметры методики, как специфичность, линейность, правильность, повторяемость (сходимость) [1].

Для определения специфичности готовили спиртовое извлечение хатьмы тюрингенской травы и раствор стандартного образца рутина. Проводили реакцию комплексобразования с алюминия хлоридом. Полученные растворы исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии.

Сравнивали спектральные характеристики исследуемого и стандартного образцов.

Для определения линейности в мерные колбы вместимостью 25 мл помещали аликвоты спиртового извлечения хатьмы тюрингенской травы объёмом 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 мл, прибавляли по 2 мл спиртового раствора 2%-ного алюминия хлорида. Доводили объём раствора 96%-ным спиртом этиловым до метки, перемешивали. Далее поступали так, как описано в ФС.2.5.0015.15.

Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов. Составляли уравнение регрессии, рассчитывали коэффициент корреляции ( $r$ ).

Для оценки правильности методики из спиртового извлечения хатьмы тюрингенской травы готовили разведения трёх уровней: 1 : 1; 1 : 1,5; 1 : 2. Определяли количественное содержание суммы флавоноидов в соответствии с валидируемой методикой. Рассчитывали открываемость ( $R$ , %) и относительное стандартное отклонение ( $RSD$ , %).

Повторяемость (сходимость) методики проверяли путём приготовления спиртовых извлечений хатьмы тюрингенской травы из 6 навесок сырья. Определяли количественное содержание суммы флавоноидов в ис-

следуемых образцах в соответствии с тестируемой методикой. Определение проводили в одной лаборатории, в одинаковых условиях, в короткий промежуток времени.

Рассчитывали относительное стандартное отклонение ( $RSD$ , %).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе определения оптимального экстрагента для извлечения флавоноидов хатьмы тюрингенской травы использовали воду очищенную и водно-спиртовые смеси различной концентрации (от 30 до 90 %). Экстракцию проводили трижды по 30 мин, нагревая извлечения с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Далее полученные извлечения исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Выход флавоноидов в пересчёте на рутин при экстракции водой очищенной составил 0,59 %. При использовании в качестве экстрагента водно-спиртовых смесей в концентрации от 30 до 90 % установили, что при использовании спирта этилового 70%-ного выход флавоноидов составляет 1,02 % (рис. 1). Данный растворитель применяли для дальнейших исследований.

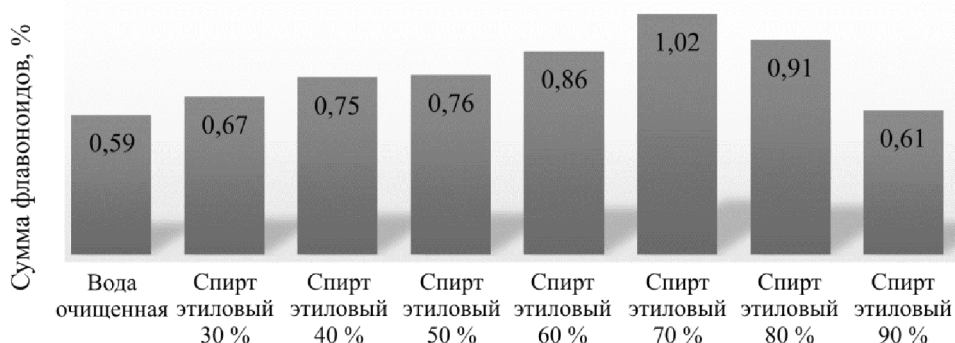


Рис. 1. Зависимость выхода флавоноидов хатьмы тюрингенской травы от концентрации спирта этилового

При проведении валидации методики количественного определения суммы флавоноидов хатмы тюрингенской травы оценивали следующие показатели: специфичность, линейность, правильность, повторяемость.

В ходе определения специфичности снимали дифференциальные спектры продуктов реакции флавоноидов исследуемого сырья и стандартного образца рутина с алюминия хлоридом. Полученные спектры имеют максимумы поглощения при длине волны 410 нм. Другие группы фенольных соединений не дают характерных максимумов в данной области, что свидетельствует о достаточной специфичности методики [2].

Для оценки линейности готовили спиртовое извлечение хатмы тюрингенской травы, как описано выше. Отбирали аликвоты извлечения объемом 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 мл. Определяли количественное содержание суммы флавоноидов в полученных растворах в соответствии с валидируемой методикой.

Строили график зависимости оптической плотности растворов от количественного содержания суммы флавоноидов (рис. 2).

Уравнение графика имеет следующий вид:  $y = 0,0932x + 0,0001$ . Значение коэффициента корреляции стремится к единице, что свидетельствует о наличии линейной зависимости оптической плотности от концентрации исследуемых растворов в пределах аналитической области методики.

Для оценки правильности методики из спиртового извлечения хатмы тюрингенской травы готовили разведения, отбирая аликвоты объемом 1,0; 1,5; 2,0 мл. На каждом уровне концентраций определяли количественное содержание суммы флавоноидов в трёх пробах в соответствии с валидируемой методикой (табл. 1).

Границы открываемости методики находятся в пределах 93,45–99,10 %, относительное стандартное отклонение составляет 1,88 %, что свидетельствует о высокой степени соответствия между значением расчётного и полученного содержания суммы флавоноидов в исследуемых образцах.

Оценку повторяемости (сходимости) проводили, измеряя оптическую плотность извлечений хатмы тюрингенской травы, приготовленных из шести навесок, в соответствии с валидируемой методикой. Результаты представлены в табл. 2.

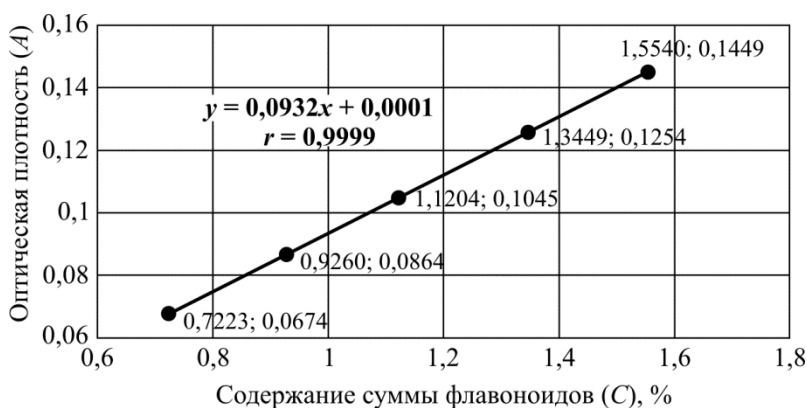


Рис. 2. График зависимости оптической плотности от содержания суммы флавоноидов в извлечении хатмы тюрингенской травы

Таблица 1

**Результаты оценки правильности методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в хатмы тюрингенской траве**

№ п/п	Разведение модельной смеси	Расчётное содержание суммы флавоноидов, %	Полученное содержание суммы флавоноидов, %	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	1:1	1,12	1,08	96,43	$\bar{x} = 97,24 \%$ $s = 1,83$ $RSD = 1,88 \%$
2			1,10	98,21	
3			1,07	95,54	
1	1:1,5	1,68	1,57	93,45	
2			1,66	98,80	
3			1,64	97,62	
1	1:2	2,24	2,21	98,66	
2			2,22	99,10	
3			2,18	97,32	

Таблица 2

**Результаты оценки сходимости методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в хатмы тюрингенской траве**

Навеска, г	Оптическая плотность	Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин, %	Метрологические характеристики
1,0028	0,1012	1,09	$P = 95 \%$ , $n = 6$ , $f = 2,57$ , $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 1,12 \pm 0,04 \%$ , $s = 0,02$ , $\bar{e} = 2,04 \%$ , $RSD = 1,79 \% < 3 \%$
1,0036	0,1068	1,15	
1,0043	0,1027	1,10	
1,0016	0,1042	1,12	
1,0031	0,1056	1,14	
1,0012	0,1035	1,12	

Из табл. 2 следует, что относительное стандартное отклонение результатов не превышает 3 %. Валидируемая методика удовлетворяет требованиям по сходимости.

Таким образом, методика количественного определения суммы флавоноидов хатмы тюрингенской травы специфична, имеет линейный характер. Метрологические характеристики параметров, правильность и сходимость не превышают валидационные критерии. Методика пригодна для достижения цели исследования.

Общеизвестно, что содержание БАС зависит от срока заготовки сырья и места произрастания. Следующим этапом работы являлось изучение динамики накопления флавоноидов в зависимости от фенологической фазы.

Максимальное количество флавоноидов отмечено в хатмы тюрингенской траве в период бутонизации и цветения – 1,02–1,14 %, минимальное – в период плодоношения – 0,77 % (табл. 3). Данная закономерность согласуется с информацией о важной роли флавоноидов в процессах роста, развития и размножения растений, а также с рекомендациями по срокам заготовки морфологической группы сырья «Трава» [1–3].

Далее проводили определение содержания суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в хатмы тюрингенской траве, произрастающей в разных районах Алтайского края. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Выявлено, что содержание флавоноидов в хатмы тюрингенской траве, заготовленной

**Результаты количественного определения суммы флавоноидов в хатмы тюрингенской траве**

Экстракт	Метрологические характеристики, $P = 95 \%, n = 5, f = 2,78$		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}, \%$	$s$	$\bar{\epsilon}, \%$
Вода очищенная	0,59 ± 0,05	0,03	5,36
Спирт этиловый 30%-ный	0,67 ± 0,05	0,03	4,82
Спирт этиловый 40%-ный	0,75 ± 0,06	0,03	4,67
Спирт этиловый 50%-ный	0,76 ± 0,07	0,04	5,66
Спирт этиловый 60%-ный	0,86 ± 0,05	0,03	3,53
Спирт этиловый 70%-ный	1,02 ± 0,07	0,04	3,88
Спирт этиловый 80%-ный	0,91 ± 0,06	0,03	3,83
Спирт этиловый 90%-ный	0,61 ± 0,05	0,03	4,96
Фенологическая фаза	Метрологические характеристики, $P = 95 \%, n = 5, f = 2,78$		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}, \%$	$s$	$\bar{\epsilon}, \%$
Бутонизации	1,14 ± 0,06	0,04	3,25
Цветения	1,02 ± 0,07	0,04	3,88
Плодоношения	0,77 ± 0,05	0,03	4,19
Район заготовки сырья	Метрологические характеристики, $P = 95 \%, n = 5, f = 2,78$		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}, \%$	$s$	$\bar{\epsilon}, \%$
Бийский	1,02 ± 0,07	0,04	3,88
Быстроистокский	1,22 ± 0,07	0,04	3,50
Калманский	1,23 ± 0,07	0,04	3,28
Красногорский	1,06 ± 0,05	0,03	2,91
Солтонский	1,14 ± 0,05	0,03	2,54
Целинный	1,16 ± 0,05	0,03	2,81
Окрестности Барнаула	1,00 ± 0,04	0,02	2,08

в разных районах Алтайского края в период цветения, меняется незначительно и составляет 1,00–1,23 %.

Таким образом, можно рекомендовать сбор сырья в фазы бутонизации и цветения повсеместно на территории Алтайского края.

**Выводы**

1. В ходе работы установлено, что максимальное количество флавоноидов в пересчёте на рутин хатмы тюрингенской травы извлекает спирт этиловый 70%-ный. Данный экстрагент следует использовать при определении количественного содержания суммы флавоноидов исследуемого сырья.

2. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в хатмы тюрингенской траве по показателям: специфичность, линейность, правильность, повторяемость. Доказано, что методика пригодна для исследования.

3. Методом дифференциальной спектрофотометрии установлено, что наибольшее накопление флавоноидов в хатмы тюрингенской траве происходит в фазы бутонизации (1,14 %) и цветения (1,02 %).

4. Сумма флавоноидов в пересчёте на рутин в хатмы тюрингенской траве, заготовленной в различных местах произрастания, имеет сопоставимые значения и составляет 1,00–1,23 %, что свидетельствует о воз-

возможности заготовки сырья на территории разных районов Алтайского края.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. М. 2015, available at: <http://www.femb.ru/feml>.

2. *Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музыкакина Р.А., Толстиков Г.А.* Природные флавоноиды. Новосибирск: Гео 2007; 232.

3. *Макаренко О.А., Левицкий А.П.* Физиологические функции флавоноидов в растениях. Физиология и биохимия культурных растений 2013; 45 (2): 100–112.

4. *Федосеева Л.М., Мызникова О.А.* Определение состава БАС хатмы тюрингенской травы, произрастающей на территории Алтайского края. Актуальные проблемы фармакологии и фармации 2016; 13: 191–197.

5. *Федосеева Л.М., Мызникова О.А., Кудрикова Л.Е.* Изучение фенольных соединений надземной части хатмы тюрингенской, произрастающей на территории Алтайского края. Химия растительного сырья 2017; 2: 107–112.

Материал поступил в редакцию 25.12.2017