

Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Абдулкарим Аффиф, А.А. Гилева, О.Л. Блинова, В.Д. Белоногова, А.Ю. Турышев
Пермская государственная фармацевтическая академия,
614990, Российская Федерация, Пермь, ул. Полевая, д. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абдулкарим Аффиф – аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА). Тел.: +7 (965) 575-40-94. E-mail: aboud.bashar89@gmail.com

Гилева Ангелина Александровна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (964) 185-60-96. E-mail: angelinaustanova@mail.ru

Блинова Ольга Леонидовна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (952) 328-76-22. E-mail: oblinova@mail.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (919) 715-93-17. E-mail: belonogova@pfa.ru

Турышев Алексей Юрьевич – ректор ПГФА, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (342) 233-55-01. E-mail: perm@pfa.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Оценка качества травы якорцев стелющихся, согласно нормативному документу, предусмотрена по фураностановым гликозидам. В литературе представлены сведения, что сырье содержит не только стероидные сапонины, но и комплекс биологически активных веществ (БАВ), в частности флавоноиды, по содержанию которых можно быстро и объективно оценить качество сырья.

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

Материал и методы. Объектами исследования служили образцы травы якорцев стелющихся, собранные в ботаническом саду ВИЛАР (Москва), Крыму, Республике Молдове, Сирии в течение 2016–2018 гг. Спектральные исследования проводили в диапазоне длин волн 350–430 нм с шагом 1 нм с помощью спектрофотометра СФ-2000.

Результаты и обсуждение. Для определения аналитической длины волны были изучены УФ-спектры спиртовых извлечений. Дифференциальный спектр извлечения с алюминия хлоридом имеет максимум при длине волны 410 ± 2 нм, который совпадает с максимумом Стандартного образца (СО) рутин.

Наибольшее количество флавоноидов экстрагируется 80% этанолом. Максимальная оптическая плотность и наибольший выход суммы флавоноидов из сырья наблюдается при степени измельченности 2 мм при однократной экстракции в течение 60 мин.

В условиях комплексообразования оптимальным соотношением объема исследуемого раствора и 2% спиртового раствора алюминия хлорида является соотношение 2:5. Стабильность комплекса с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдается через 15 мин после начала реакции и сохраняется в течение 1 ч.

Заключение. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся в пересчете на рутин с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

Ключевые слова: якорцы стелющиеся, *Tribulus terrestris* L., трава, стандартизация, флавоноиды, спектрофотометрия.

Для цитирования: Абдулкарим Аффиф, Гилева А.А., Блинова О.Л., Белоногова В.Д., Турышев А.Ю. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся. Фармация, 2020; 69 (1): 17–22. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-01-03>

DEVELOPMENT OF A PROCEDURE FOR QUANTIFICATION OF THE TOTAL FLAVONOID CONTENT IN THE GROUND BURNUT (*TRIBULUS TERRESTRIS*) HERB

Abdulkarim Affuf, A.A. Gileva, O.L. Blinova, V.D. Belonogova, A.Yu. Turyshev
Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya St., Perm 614990, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Abdulkarim Affuf – postgraduate student of the department of the pharmacognosy with a course of botany, Perm State Pharmaceutical Academy (PSPHA). Tel.: +7 (965) 575-40-94. E-mail: aboud.bashar89@gmail.com

Gileva Angelina Alexandrovna – associate professor of the department of the pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, PhD of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (964) 185-60-96. E-mail: angelinaustinova@mail.ru

Blinova Olga Leonidovna – associate professor of the department of the pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, PhD of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (952) 328-76-22. E-mail: oblinova@mail.ru

Belonogova Valentina Dmitrievna – Head of the department of pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (919) 715-93-17. E-mail: belonogova@pfa.ru

Turyshv Alexey Yurevich – Rector of PSPhA, associate professor of the department of the pharmacognosy with a course of botany, PSPhA, PhD of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (342) 233-55-01. E-mail: perm@pfa.ru

SUMMARY

Introduction. Evaluating the quality of ground burnut (*Tribulus terrestris*) herb is regulated by the normative document for furostanol glycosides. The literature presents information that raw materials contain not only steroidal saponins, but also a complex of biologically active substances, in particular flavonoids, the content of which can be used to quickly and objectively assess the quality of the raw materials.

Objective: to develop a procedure for quantifying the total flavonoid content in the ground burnut herb, by using differential spectrophotometry.

Material and methods. The investigation objects were samples of ground burnut herb gathered in the Botanic Garden, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR) (Moscow), in Crimea, the Republic of Moldova, and Syria during 2016–2018. Spectral studies were conducted in the wavelength range of 350–430 nm with a 1-nm increment, by using an SF-2000 spectrophotometer.

Results and discussion. The UV spectra for alcoholic extracts were investigated to determine an analytical wavelength. The differential spectrum for extraction with aluminum chloride had a maximum emission at 410±2 nm, which coincided with that of the State standard sample (SSS) of rutin.

The highest amount of flavonoids was extracted with 80% ethanol. The maximum optical density and the greatest yield of total flavonoids from the raw material were observed at a grinding fineness of 2 mm with a single extraction for 60 minutes.

Under complexing conditions, the optimal ratio of the volume of the test solution to 2% alcoholic aluminum chloride solution was 2:5. The stability of the complex with the latter was observed 15 minutes after the start of the reaction and retained it for 1 hour.

Conclusion. The procedure was developed for quantifying the sum of flavonoids in the ground burnut herb calculated with reference to rutin, by using differential spectrophotometry.

Key words: ground burnut, *Tribulus terrestris* L., herb, standardization, flavonoids, spectrophotometry.

For citation: Abdulkarim Affuf, Gileva A.A., Blinova O.L., Belonogova V.D., Turyshv A.Yu. Development of a procedure for quantification of the total flavonoid content in the ground burnut (*Tribulus terrestris*) herb. . Farmatsiya (Pharmacy), 2020; 69 (1): 17–22. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-01-03>

Введение

Лекарственные растения и фитопрепараты из них все чаще применяются в клинической практике. Фитопрепараты обладают широким спектром фармакологического действия при меньшем числе противопоказаний и более редких побочных эффектах.

Для эффективного использования лекарственных средств (ЛС) важно установить видовую принадлежность исходного сырья, провести качественную и количественную оценку содержания в нем наиболее перспективных групп биологически активных веществ (БАВ).

Действующим нормативным документом на сырье якорцев стелющихся является временная фармакопейная статья 42-827-79 «*Herba Tribuli terrestris* – Трава якорцев стелющихся», согласно которой оценка качества сырья должна осуществляться по фураностаноловым гликозидам. Согласно данным литературы трава якорцев стелющихся содержит комплекс БАВ, включающий не только стероидные сапонины диосгенин, трибестин, трибулозин, триллин, грациллин, гитоген-

нин, хлорогенин, рускогенин, трибуспонин, но и флавоноиды: рутин, кверцетин, изокверцитрин, кемпферол, кемпферол-3-глюкозид, астрагалин [1–4]. Вещества фенольной природы, содержащиеся в траве якорцев стелющихся, являются перспективной группой БАВ [5, 6].

Однако содержание суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся не нормируется. Поэтому стандартизация данного лекарственного растительного сырья по содержанию суммы флавоноидов весьма актуальна для его дальнейшего изучения.

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

Материал и методы

Объектами исследования служили образцы травы якорцев стелющихся, собранные в ботаническом саду ВИЛАР (Москва), Крыму, Республике Молдове, Сирии в течение 2016 – 2018 гг.

Спектральные исследования проводили в соответствии с рекомендациями ОФС 1.2.1.1.0003.15. «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» Государственной фармакопеи РФ XIV издания (ГФ РФ XIV) [7]. Использовали диапазон длин волн 350–430 нм с шагом 1 нм. Для измерения оптической плотности использовали кюветы с толщиной слоя 10 мм. УФ-спектры этанольных извлечений из сырья и дифференциальные спектры с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида снимали с помощью спектрофотометра СФ-2000

Результаты и обсуждение

Для определения аналитической длины волны были изучены УФ-спектры спиртовых извлечений из сырья. Установлено, что собственный спектр этанольного извлечения травы якорцев стелющихся имеет максимум при длине волны 371 нм. Дифференциальный спектр того же извлечения с раствором алюминия хлорида имеет максимум при длине волны 410 ± 2 нм, который совпадает с максимумом Стандартного образца (СО) рутина (рис. 1, 2).

Для выбора оптимального экстрагента использовали воду и этиловый спирт 50, 70, 80 и 90% концентрации. Установлено, что наибольшее количество флавоноидов экстрагируется 80% этиловым спиртом, поэтому он был выбран в качестве экстрагента для дальнейших исследований (табл. 1). Изучено влияние степени измельченности сырья и массы навески на максимальный выход флавоноидов из якорцев стелющихся травы. Максимальная оптическая плотность и наибольший выход суммы флавоноидов из сырья наблюдался при размере частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм и навеске сырья 3 г (табл. 2, 3). С целью определения оптимального времени и кратности экстракции было проведено экстрагирование: однократно – в течение 30, 45 и 60 мин, двукратно и трехкратно – по 30 мин. Максимальное содержание суммы флавоноидов определено при однократной экстракции в течение 60 мин (см. табл. 4).

Для определения полноты протекания реакции и устойчивости комплекса флавоноидов с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида проведен анализ этанольных извлечений с различными вариантами соотношений: извлечение – хромогенный реактив. Оптимальным соотношением объема исследуемого раствора и 2% спиртового раствора алюминия хлорида является соотноше-

ние 2:5, при котором наблюдается максимальная плотность и наибольшее содержание суммы флавоноидов (табл. 5).

Практическое значение при проведении спектрофотометрического измерения имеет время образования хелатного комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия. Для проведения этого анализа измеряли величину оптической плотности фотометрируемого раствора через каждые 10 мин в течение 1 ч с момента получения комплекса. Установлено, что стабильность комплекса с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдается через 15 мин после начала реакции и сохраняется в течение 1 ч (рис. 3).

На основании полученных данных была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве в пересчете на рутин.

Методика количественного определения. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстия-

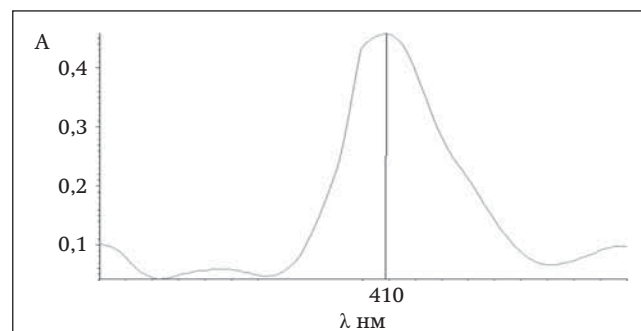


Рис. 1. УФ-спектр извлечения комплекса суммы флавоноидов якорцев стелющихся травы с алюминия хлоридом

Fig. 1. UV spectrum for aluminum chloride-flavonoid complex to determine the total flavonoid content in the ground burnt herb

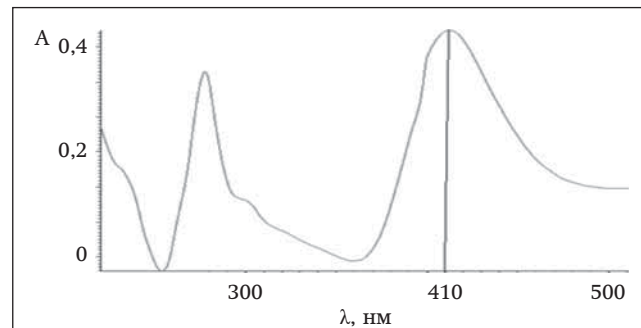


Рис. 2. УФ-спектр комплекса раствора СО рутина с алюминия хлоридом

Fig. 2. UV spectrum for state standard sample (SSS) rutin-aluminum chloride complex

Таблица 1

Содержание суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся в зависимости от использованного экстрагента

Table 1

Total flavonoid content in the ground burnut herb according to the extraction solvent used

| Экстрагент | Оптическая плотность, А (среднее значение) | Содержание суммы флавоноидов, % |
|---|--|---------------------------------|
| Вода | 0,1659 | 0,489±0,040 |
| <i>Концентрация этилового спирта, %</i> | | |
| 50 | 0,1730 | 0,510±0,030 |
| 70 | 0,2432 | 0,717±0,050 |
| 80 | 0,2986 | 0,811±0,020 |
| 90 | 0,1405 | 0,414±0,040 |

Таблица 2

Влияние измельченности сырья на определение содержания флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 2

Impact of the raw material's grinding fineness on the determination of flavonoid content in the ground burnut herb

| Измельченность сырья, мм | Оптическая плотность, А (среднее значение) | Содержание суммы флавоноидов, % |
|--------------------------|--|---------------------------------|
| 2 | 0,3602 | 1,049±0,040 |
| 3 | 0,3187 | 0,854±0,060 |
| 5 | 0,2879 | 0,846±0,070 |
| 7 | 0,3579 | 0,972±0,020 |

Таблица 3

Влияние используемой навески сырья на определение содержания флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 3

Impact of the raw material's quantity used on the determination of flavonoid content in the ground burnut herb

| Навеска сырья, г | Оптическая плотность, А (среднее значение) | Содержание суммы флавоноидов, % |
|------------------|--|---------------------------------|
| 1,0 | 0,1486 | 1,09±0,020 |
| 2,0 | 0,2095 | 1,202±0,030 |
| 3,0 | 0,3384 | 1,317±0,010 |
| 4,0 | 0,4024 | 1,160±0,050 |
| 5,0 | 0,4212 | 0,980±0,020 |

ми диаметром 2 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл 80% этилового спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр «Filtrak» в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. После охлаждения фильтр промывают 80% этиловым спиртом, доводят объем извлечения до метки и перемешивают (раствор А).

Таблица 4

Влияние режима экстракции на определение содержания флавоноидов в траве якорцев стелющихся

Table 4

Impact of extraction mode on the determination of flavonoid content in the ground burnut herb

| Время экстракции, мин | Оптическая плотность, А (среднее значение) | Содержание суммы флавоноидов, % |
|-----------------------|--|---------------------------------|
| Одно-кратная | 30 | 0,1896 |
| | 45 | 0,2328 |
| | 60 | 0,3041 |
| Двукратная по 30 мин | 0,1692 | 0,499±0,070 |
| Трехкратная по 30 мин | 0,1519 | 0,448±0,060 |

Таблица 5

Зависимость оптической плотности от соотношения извлечения (раствор А) и алюминия хлорида

Table 5

Relationship between the optical density and the ratio of extraction (solution A) to aluminum chloride

| Соотношение извлечения и реактива | Оптическая плотность, А (среднее значение) | Содержание суммы флавоноидов, % |
|-----------------------------------|--|---------------------------------|
| 1:1 | 0,2210 | 0,651±0,030 |
| 1:2 | 0,2383 | 0,702±0,060 |
| 1:3 | 0,2412 | 0,711±0,010 |
| 2:2 | 0,4270 | 1,258±0,020 |
| 2:3 | 0,4389 | 1,293±0,030 |
| 2:4 | 0,4443 | 1,309±0,040 |
| 2:5 | 0,4709 | 1,388±0,020 |
| 2:6 | 0,4568 | 1,346±0,050 |

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, 1 каплю 5% уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (раствор Б). Через 15 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения готовят следующим образом: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю 5% уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность (раствор Б) испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность (рас-

твор Б) СО рутина; а – навеска сырья, г; а₀ – навеска СО рутина, г; Р – содержание основного вещества в СО рутина, %; W – потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135°C в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96% этилового спирта, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А) СО рутина.

2 мл раствора А СО рутина, 1 каплю 5% уксусной кислоты, 5 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида помещают в мерную колбу, вместимостью 25 мл и доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор Б) СО рутина.

Для расчета ошибки метода результаты исследования обрабатывали статистически по методикам ОФС.1.1.0013.15. «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ РФ XIV [7], пользуясь программой STAT, согласно которой относительная ошибка метода не должна превышать 3–5%. Согласно результатам исследования, ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения (2,89%) при доверительной вероятности 95%. Это свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (табл. 6).

Заключение

Разработана методика и определены параметры количественного определения суммы флавоноидов в траве якорцев стелющихся в пересчете на рутин с использованием дифференциальной спектрофотометрии: длина волны – 410 нм, экстрагент – 80% этиловый спирт, время однократной экстракции – 60 мин, измельченность сырья – проходящее сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, оптимальное соотношение объема извлечения и 2% спиртового раствора алюминия хлорида – 2:5, время образования устойчивого комплекса – 15 мин.

Таблица 6

Table 6

*Конфликт интересов
Авторы заявляют
об отсутствии
конфликта интересов*

*Conflict of interest
The authors declare
no conflict of interest*

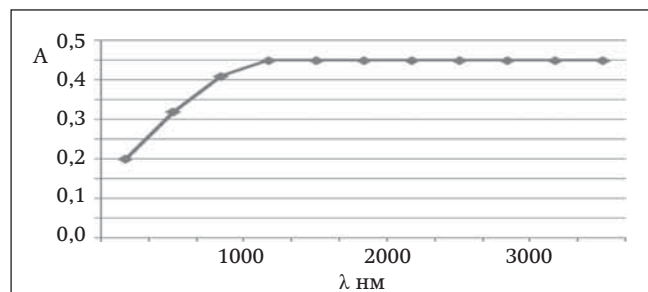


Рис. 3. Устойчивость комплекса суммы флавоноидов якорцев стелющихся с алюминия хлоридом во времени
Fig. 3. Stability of flavonoid-aluminum chloride complex to determine the total flavonoid content in the ground burnt herb over time

Метрологическая характеристика спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве якорцев стелющихся

Metrological characteristics of spectrophotometric procedure for quantifying the sum of flavonoids calculated with reference to rutin in the ground burnt herb

| n | f | \bar{x} | S2 | S | P, % | t (p, f) | $\Delta\bar{x}$ | ϵ | $\delta, \%$ |
|---|---|-----------|--------|--------|------|----------|-----------------|------------|--------------|
| 5 | 4 | 2,086 | 0,0596 | 0,2441 | 95 | 2,78 | 0,03 | 0,77 | 2,89 |

Литература

1. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 3. Семейства *Fabaceae* – *Apiaceae*. (Отв. ред. А.Л. Буданцев). СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010: 102–5.
2. Dincher D., Janda B., Evstatieva L., Oleszek W., Aslani M.R., Kostova I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, 2008; 69: 176–86.
3. Худенко П.Е. и др. Флавоноиды в траве якорцев стелющихся. *Фармация и фармакология*, 2015; 2 (9): 18–23.
4. Ashwani Kumar. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in North Indian population of *Tribulus terrestris* L. by HPLC. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2012; 3 (4): 69–79.
5. Худенко П.Е., Терешина Н.С., Морохина С.Л. Фармакогностическое исследование травы *Tribulus terrestris* L. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств, 2016; 2 (12): 45–58.
6. Худенко П.Е., Терешина Н.С., Морохина С.Л. Определение флавоноидов в траве якорцев стелющихся методом ВЭЖХ. *Фармация*, 2016; 65 (5): 19–22.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/feml>

References

1. Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. T. 3. Families

Fabaceae–*Apiaceae*. (by ed. A.L. Budancev). SPb.; M.: Partnership of scientific publications KMK, 2010: 102–5 (in Russian).

2. Dincher D., Janda B., Evstatieva L., Oleszek W., Aslani M.R., Kostova I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, 2008; 69: 176–86.
3. Hudenko P.E. et al. Flavonoids in the grass of the *Tribulus terrestris*. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2015; 2 (9): 18–23 (in Russian).
4. Ashwani Kumar. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in North Indian population of *Tribulus terrestris* L., by HPLC. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2012; Oct, 3 (4): 69–79.
5. Hudenko P.E., Tereshina N.S., Morohina S.L. Pharmacognostic study of the herb *Tribulus terrestris* L. *Voprosi obespecheniya kachestva lekarstvennikh sredstv*, 2016; 2 (12): 45–58 (in Russian).
6. Hudenko P.E., Tereshina N.S., Morohina S.L. Determination of flavonoids in the grass of the *Tribulus terrestris* by HPLC. *Farmatsiya*, 2016; 65 (5): 19–22 (in Russian).
7. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. [Electronic edition]. Access mode: <http://femb.ru/feml> (in Russian).

Поступила 22 июля 2019 г.

Received 22 July 2019

Принята к публикации 14 ноября 2019 г.

Accepted 14 November 2019