

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ *ALCHEMILLA VULGARIS* L.S.L.

**Ж.С. Лесовая**  
**Д.И. Писарев**  
**О.О. Новиков**  
**Т.А. Романова**

*Белгородский  
государственный  
университет*

*e-mail:  
zhannalesovaya@yandex.ru*

В надземной части манжетки обыкновенной обнаружен богатый комплекс биологически активных веществ, среди которых преобладают фенольные соединения, а именно флавоноиды, которые, как известно, обладают широким спектром терапевтического эффекта. На основании этого в статье изложена методика оценки качества травы манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L. по флавоноидам.

Ключевые слова: трава манжетки обыкновенной, флавоноиды, кверцетин, лютеолин-7-гликозид (цинарозид).

Оценку качества травы манжетки обыкновенной предложено проводить по содержанию флавоноидов. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в пересчете на кверцетин и лютеолин-7-гликозид (цинарозид). Наличие данных флавоноидов подтверждено также хроматографически и методом масс-спектроскопии.

Изучены условия извлечения флавоноидов из сырья последовательной сменой этанола 96%, 70% и 40% концентрации. Соотношение сырья и общего объема экстрагента 1:100, время трехкратного извлечения на кипящей водяной бане 90 минут.

Для расчета суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин оптическую плотность измеряли по собственному поглощению спиртового извлечения травы манжетки обыкновенной после гидролиза при длине волны 370 нм. Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием оптической плотности раствора стандартного образца кверцетина. Относительная ошибка предложенной методики 1,77%. Содержание флавоноидов в надземной части манжетки обыкновенной составляет  $1,378\% \pm 0,03\%$ .

Для расчета суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид измеряли оптическую плотность окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида, при длине волны 400 нм. Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием теоретического значения удельного показателя поглощения государственного стандартного образца лютеолина-7-гликозида (цинарозида). Относительная ошибка предложенной методики 3,88%. Содержание флавоноидов в траве манжетки обыкновенной составляет  $2,492\% \pm 0,06\%$ .

**Введение.** Манжетка обыкновенная – многолетнее травянистое растение из семейства розоцветных (*Rosaceae*) с округло-сердцевидными мягко опушёнными коротко пальчато-лопастными листьями, складчато сложенными до распускания.

Ареал манжетки чрезвычайно обширен и охватывает все районы Европы, Африки и Азии, она обычна во всех областях Средней России.

В научной медицине России манжетка обыкновенная в настоящее время не применяется по причине отсутствия нормативной документации на сырьё, хотя в народной медицине с успехом используется при широком спектре заболеваний, в первую очередь женской половой сферы [2].

Для введения растения в список официально используемых, в первую очередь необходима разработка объективных методов количественной оценки действующих биологически активных веществ. Экспериментально установлено, что основным действующим началом манжетки обыкновенной является полифенольный комплекс и в первую очередь флавоноиды.

**Целью** настоящего исследования является разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки обыкновенной с использованием метода УФ-спектрофотометрии.

**Экспериментальная часть.** В результате проведенных исследований нами было установлено, что максимум оптической плотности УФ-спектра собственного поглощения спиртового извлечения из травы манжетки после гидролиза совпадает с максимумом

оптической плотности УФ-спектра раствора государственного стандартного образца кверцетина (рис. 1).

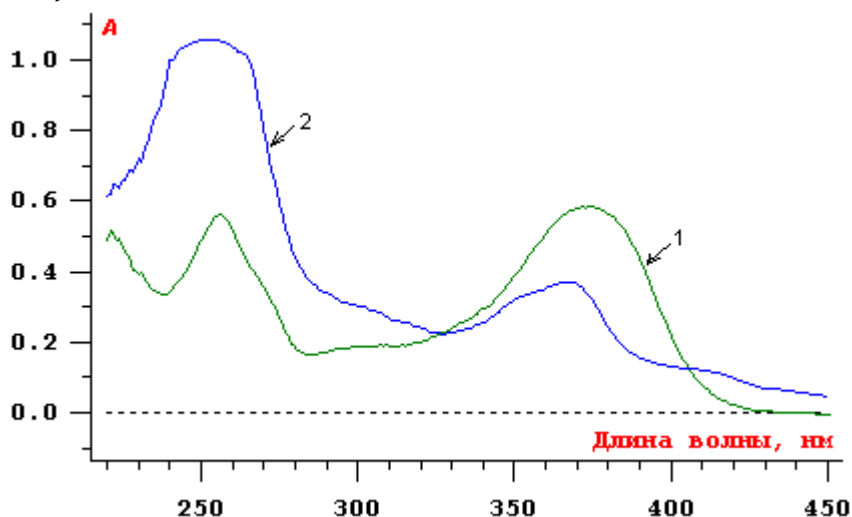


Рис. 1. УФ-спектры раствора ГСО кверцетина (1) и спиртового извлечения травы манжетки обыкновенной после гидролиза (2)

Для выбора оптимального режима экстрагирования травы манжетки обыкновенной нами сравнивались два метода экстракции:

1) с использованием этанола 70% концентрации (как наиболее универсального экстрагента для флавоноидов);

2) с последовательной сменой этанола 96%, 70% и 40% концентрации.

Расчеты показали, что при экстрагировании первым методом сумма флавоноидов в пересчете на кверцетин составила около 0,9%. Относительная погрешность единичного измерения – 2,68%.

При экстрагировании сырья вторым методом, с последовательной сменой спиртов различной концентрации, сумма флавоноидов в пересчете на кверцетин составила около 1,378%. Относительная погрешность единичного измерения – 1,77%.

Таким образом, наиболее оптимальным методом экстракции для травы манжетки оказался метод с последовательной сменой этанола 96%, 70% и 40% концентрации.

**Методика получения спиртового извлечения из травы манжетки обыкновенной (метод экстракции с последовательной сменой этанола 96%, 70% и 40% концентрации).** Точную навеску травы манжетки, измельченной до размера частиц 1-3 мм, около 1,0 г помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 30 мл 96% этанола, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждали под струей воды до комнатной температуры и содержимое колбы фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Затем указанным выше способом экстракцию повторяли поочередно 70% и 40% этанолом. Извлечения фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем фильтрата доводили до метки 96% спиртом. Полноту извлечения флавоноидов из сырья подтверждали отрицательной цианидиновой пробой.

**Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки обыкновенной в пересчете на кверцетин.** 10 мл полученного спиртового извлечения из сырья манжетки обыкновенной упаривали на водяной бане, остаток высушивали в сушильном шкафу при 110°C в течение 15 минут, затем растворяли в 10 мл 10% серной кислоты. Гидролиз вели в колбе, подсоединенной к обратному холодильнику, при нагревании на кипящей водяной бане в течение 2 часов. В данных условиях происходит гидролиз только 3-О-гликозидов, 7-О-гликозиды, как более устойчивые, гидролизу подвергаются в более жестких условиях. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и содержимое ее фильтровали через бумажный фильтр. Осадок, оставшийся на фильтре, промывали водой очищенной и растворяли в 100 мл горячего 96% этанола.

Аликвоту полученного раствора объемом 10 мл доводили до метки в колбе на 25 мл 96% спиртом этиловым и измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре Sf56 в диапазоне длин волн 250-450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин вели по формуле 1:

$$X = \frac{A_x \times C_{no} \times W \times 100}{A_{no} \times N_o \times V_a} \quad (1),$$

где  $A_x$  – оптическая плотность исследуемого раствора;

$C_{ст}$  – концентрация раствора стандартного образца кверцетина;

$W$  – разведение, мл;

$A_{ст}$  – оптическая плотность раствора стандартного образца кверцетина;

$C_x$  – концентрация исследуемого раствора;

$V_a$  – объем аликвоты, мл.

Результаты статистической обработки данных параллельных измерений показали, что содержание флавоноидов в траве манжетки обыкновенной в пересчете на кверцетин составило  $1,378\% \pm 0,02438\%$ , ошибка единичного определения при доверительной вероятности 98% составила 1,77% (табл. 1).

Таблица 1

**Результаты количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки обыкновенной в пересчете на кверцетин**

$X$ (%)	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
1,300	0,078	0,006084	$\bar{X} = 1,378\%$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,001809$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,007765$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,02438$ $\varepsilon = 1,77\%$
1,358	0,02	0,0004	
1,372	0,006	0,000036	
1,436	-0,058	0,003364	
1,401	-0,023	0,000529	
1,399	-0,021	0,000441	
$X=1,378$		$\Sigma=0,001809$	

**Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки в пересчете на лютеолин-7-гликозид (цинарозид).** В основу количественного определения флавоноидов в сырье в пересчёте на лютеолин-7-гликозид положен метод спектрофотометрического анализа в непосредственном извлечении из сырья, основанный на химическом взаимодействии флавоноидов с алюминия хлоридом безводным в среде кислоты хлористоводородной разведённой с образованием окрашенных продуктов – хелатных комплексов. При этом максимум поглощения первой полосы смещается на 35–50 нм к видимой области (батохромный сдвиг), по сравнению с исходным флавоноидом. При добавлении кислоты хлористоводородной нестабильные комплексы в орто-дигидроксигруппах разрушаются, а комплексы между карбонильной группой при  $C_4$  и гидроксильными группами при  $C_3$  и  $C_5$  сохраняются.

У спиртовых извлечений из исследуемых образцов максимум поглощения при добавлении  $AlCl_3 + HCl$  находился при 400 нм (рис. 2).

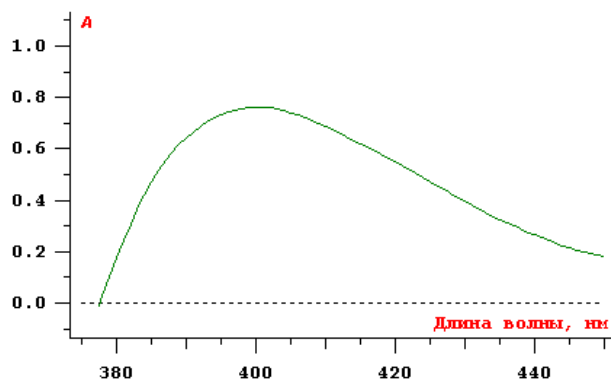


Рис. 2. УФ-спектр комплекса спиртового извлечения из травы манжетки обыкновенной с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида

Аналогичный максимум поглощения отмечен для комплекса ГСО лютеолин-7-гликозида (цинарозида).

5 мл спиртового извлечения из травы манжетки помещали в колбу на 25 мл, прибавляли 5 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и 2–3 капли разведенной соляной кислоты. Объем смеси доводили до метки 96% спиртом этиловым. Время прохождения реакции комплексообразования в защищенном от света месте 45 минут.

Для приготовления раствора сравнения в колбу вместимостью 25 мл помещали 5 мл спиртового извлечения из травы манжетки, 2–3 капли разведенной соляной кислоты и доводили объем до метки 96% этанолом.

С целью пересчета содержания суммы флавоноидов на цинарозид использован удельный показатель поглощения заимствованный из литературных источников. Согласно найденным данным удельный показатель поглощения комплекса раствора ГСО цинарозида с алюминия хлоридом при аналитической длине волны 400 нм составляет  $145,0 \pm 2,3$ . На этом основании в формулу расчета включено теоретическое значение  $E_{1\%1\text{см}} = 145$  [1].

Расчет вели по формуле 2:

$$X = \frac{A_x \times W \times W_2}{E_{\%}^{lni} \times m \times V_a} \quad (2),$$

где  $A_x$  – оптическая плотность исследуемого раствора;

$W, W_2$  – разведения, мл;

$E_{1\%1\text{см}}$  – удельный показатель поглощения стандартного раствора цинарозида;

$m$  – масса навески исследуемого сырья, г;

$V_a$  – объем аликвоты, мл.

Статистическая обработка данных параллельных измерений показала, что сумма флавоноидов в траве манжетки обыкновенной в пересчете на лютеолин-7-гликозид  $2,492\% \pm 0,06\%$ . Ошибка единичного измерения равна  $3,88\%$  (табл. 2).

Таблица 2

**Результаты количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки обыкновенной в пересчете на лютеолин-7-гликозид**

$X$ (%)	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
2,395	0,097	0,009409	$\bar{X} = 2,492\%$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,028473$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,030807$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,096735$ $\varepsilon = 3,88\%$
2,517	-0,025	0,000625	
2,490	0,002	0,000004	
2,601	-0,109	0,011881	
2,419	0,073	0,005329	
2,527	-0,035	0,001225	
$\bar{X} = 2,492$		$\Sigma = 0,028473$	

**Выводы.** 1. Проанализированы методы экстракции травы манжетки. В качестве наиболее оптимального метода для данного вида сырья выбран метод экстракции с последовательной сменой этанола 96%, 70% и 40% концентрации.

2. Предложена методика дифференциального количественного определения 7-О-гликозидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид (относительная ошибка определения при доверительной вероятности 98% составляет 3,88%) и 3-О-гликозидов в пересчете на кверцетин (относительная ошибка определения при доверительной вероятности 98% составляет 1,77%) после кислотного гидролиза, что позволяет наиболее полно определить содержание флавоноидов в сырье. Общая сумма флавоноидов по результатам данной методики составила  $3,87\% \pm 0,1\%$ .

*Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.*

### **Литература**

1. Андреева, В.Ю. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla Vulgaris L.S.L.* / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – №1. – С. 85-88.
2. Дикорастущие полезные растения России / Отв.ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.

## **DEVELOPMENT OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN *ALCHEMILLA VULGARIS* LSL**

Zh. S. Lesovaya  
D. I. Pisarev  
O. O. Novikov  
T. A. Romanova

**Belgorod State University**

**e-mail: zhannalesovaya@yandex.ru**

In the overground part of *Alchemilla Vulgaris* LSL a rich complex of biologically active substances was found, which are dominated by phenolic compounds, namely flavonoids, which are known to possess a wide range of therapeutic effect. On the basis of this article the technique of assessing the quality of herb of *Alchemilla vulgaris* LSL by flavonoids.

Key words: herb of *Alchemilla Vulgaris* LSL, flavonoids, quercetin, luteolin-7-glycoside (cinarosid)