

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ АСТРАГАЛА ШЕРСТИСТОЦВЕТКОВОГО (*ASTRAGALUS DASYANTHUS* L.)

Т.А. Позднякова

к.фарм.н., Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (г. Орел)
E-mail: pozdneyakova.tatyana.72@mail.ru

Р.А. Бубенчиков

д.фарм.н., Курский государственный медицинский университет (г. Курск)

Представлены результаты изучения качественного состава флавоноидов травы астрагала шерстистоцветкового, а также разработка методики определения их количественного содержания методом спектрофотометрии. Выбраны оптимальные условия экстрагирования сырья и протекания реакции комплексообразования.

Ключевые слова: астрагал шерстистоцветковый, флавоноиды, реакция комплексообразования, спектрофотометрический метод.

Для цитирования: Позднякова Т.А., Бубенчиков Р.А. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(6):10–15. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-02>

В настоящее время астрагал шерстистоцветковый (*Astragalus dasyanthus* L.) – единственный представитель многочисленного рода Астрагал (*Astragalus*), нашедший применение в научной медицине. Астрагал шерстистоцветковый зарегистрирован в государственном реестре лекарственных средств России, разрешенных к медицинскому применению, как сырье растительное цельное (тюки) и измельченное «Астрагала шерстистоцветкового трава». Применяется в качестве седативного, гипотензивного, диуретического и противовоспалительного средства [1, 2].

Анализ литературных источников показал, что химический состав астрагала шерстистоцветкового разнообразен и представлен различными классами биологически активных соединений: флавоноиды (кемпферол, кверцетин, изорамнетин, нарциссин, астрагалозид) [3], дубильные вещества, кумарины, оксикумарины, сапонины, полисахариды, высшие жирные кислоты, эфирное масло, калий и микроэлементы [4, 5].

Однако в нормативной документации на лекарственное растительное сырье «Трава астрагала шерстистоцветкового» приведены данные по установлению доброкачественности сырья только по общим товароведческим показателям (содержание влаги, золы, примесей). Учитывая современные требования фармацевтической промышленности, лекарственное растительное сырье

должно быть стандартизовано по содержанию основных групп действующих веществ.

Цель работы – разработка методики определения количественного содержания флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового, как одной из основных групп действующих веществ растения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась измельченная воздушно-сухая трава астрагала шерстистоцветкового, заготовленная в 2016–2017 гг. на территории Курской области в период массового цветения растения.

Установление наличия флавоноидов в исследуемом сырье проводили в водном остатке спиртового извлечения из травы астрагала шерстистоцветкового, а также фракциях, полученных с помощью органических растворителей (этилацетат и бутанол) с помощью общеизвестных качественных реакций: цианидиновой (с кислотой хлористоводородной концентрированной и магниевой стружкой), цианидиновой по Брианту, со спиртовым раствором алюминия хлорида 2%-ного, с раствором натрия гидроксида 10%-ного, с реактивом Вильсона, с раствором ацетата свинца основным, с раствором хлорида железа (III); реакции азосочетания [6].

Для разделения и идентификации индивидуальных флавоноидов был использован метод

тонкослойной хроматографии на пластинках «Сорбфил». Подбор системы растворителей осуществлялся на основе литературных и опытных данных пробных экспериментов с учетом лучшего разделения сумм флавоноидов, четкости пятен индивидуальных веществ [7]. Хроматографирование проводили восходящим способом в следующих условиях: хроматографическая камера, хроматографическая пластинка «Сорбфил», система растворителей: этилацетат – кислота уксусная безводная – вода (65:15:20), СО рутина, астрагалина, гиперозида и кверцетрина (ООО «Фитопанacea», Россия). Пятна флавоноидов на хроматограммах отмечали в УФ-свете, затем обрабатывали проявляющими реактивами (пары аммиака, спиртовой раствор алюминия хлорида 2%-ного, метанольный раствор циркония хлороксида 2%-ной) и далее снова рассматривали в УФ-свете.

Для стандартизации травы астрагала шерстистоцветкового по содержанию флавоноидов была разработана методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов непосредственно в извлечениях из сырья. В основе данной методики лежит реакция комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом, при которой происходит батохромный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 до 390–410 нм [8]. Применение в качестве контроля исследуемого извлечения без алюминия хлорида позволило исключить стадию очистки извлечений от экстрактивных веществ. Для получения более воспроизводимых результатов реакцию комплексообразования проводили в кислой среде [9].

При разработке методики были установлены оптимальные условия экстрагирования суммы флавоноидов из сырья и спектрофотометрирования комплекса, образующегося при взаимодействии исследуемого экстракта с алюминия хлоридом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью качественных реакций в извлечениях из травы астрагала шерстистоцветкового было установлено наличие флавоноидов, причем их результаты указывают на наличие в изучаемом растении как флавоноидных гликозидов, так и агликонов.

Хроматографическое исследование позволило установить в траве астрагала шерстистоцветкового наличие четырех веществ в виде пятен с темной флуоресценцией, отнесенных к флавоноидным соединениям с R_f : 0,52; 0,71; 0,78; 0,94. С

достоверными образцами были идентифицированы астрагалин и гиперозид.

При определении количественного содержания действующих веществ в лекарственном растительном сырье наиболее важной и продолжительной стадией является их количественная экстракция, которая зависит от ряда факторов, в частности, от степени измельчения сырья, времени и температуры экстракции, типа экстрагента, соотношения сырье-экстрагент. Оптимальные условия экстракции суммы флавоноидов из травы астрагала шерстистоцветкового определяли на одном образце сырья. Как показало изучение влияния измельченности сырья на экстракцию флавоноидов, их максимальное извлечение из травы исследуемого растения достигается при степени измельчения 1 мм (табл. 1).

Для экстрагирования суммы флавоноидов из растительного сырья в литературе описано применение спиртов и спирто-водных растворов. Было установлено, что максимальное извлечение суммы флавоноидов достигается 70%-ным спиртом этиловым (табл. 1). Для извлечения суммы флавоноидов была использована экстракция с нагреванием на кипящей водяной бане до наступления равновесия, которое в данном случае наступает через 45 мин (табл. 1).

Таблица 1. Влияние условий экстракции на извлечение суммы флавоноидов из травы астрагала шерстистоцветкового

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов (на абсолютно сухое сырье) в пересчете на гиперозид, %
Степень измельчения сырья, мм	
1	2,02±0,0075
2	1,24±0,0039
3	1,15±0,0021
Экстрагент	
Вода	1,52±0,0045
Спирт этиловый 30%-ный	1,82±0,0057
Спирт этиловый 50%-ный	1,91±0,0069
Спирт этиловый 70%-ный	2,02±0,0075
Спирт этиловый 90%-ный	1,96±0,0063
Время экстракции спиртом этиловым 70%-ным, мин	
30	1,87±0,0061
45	2,05±0,0073
60	1,95±0,0059
75	1,91±0,0043

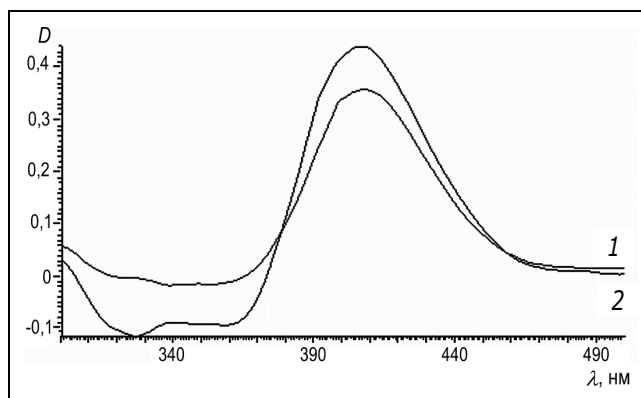


Рис. 1. Спектр окрашенного комплекса извлечения из травы астрагала шерстистоцветкового и СО гиперозида с алюминия хлоридом: 1 – гиперозид; 2 – извлечение из травы астрагала шерстистоцветкового

Таблица 2. Влияние концентрации и количества раствора алюминия хлорида на полноту протекания реакции комплексообразования

Условия реакции комплексообразования	Содержание суммы флавоноидов (на абсолютно сухое сырье) в пересчете на гиперозид, %
Концентрация раствора алюминия хлорида, %	
1	1,80±0,0045
2	1,82±0,0039
3	1,87±0,0021
4	1,89±0,0047
5	2,09±0,0075
Количество 5%-ного раствора алюминия хлорида, мл	
1	1,81±0,0045
2	2,03±0,0051
3	1,83±0,0019
4	1,80±0,0025
5	1,75±0,0023

Таблица 3. Зависимость устойчивости окраски извлечения из травы астрагала шерстистоцветкового с алюминия хлоридом от времени

Время, мин	Оптическая плотность извлечения травы астрагала шерстистоцветкового ($\lambda = 395$ нм)
15	0,4232
30	0,4341
45	0,4322
60	0,4241
75	0,4213
90	0,4116

При исследовании спектров поглощения спиртовых извлечений из травы астрагала шерстистоцветкового с алюминия хлоридом максимум поглощения находится при 405 нм и совпадает с максимумом поглощения гиперозида с алюминия хлоридом (рис. 1). Поскольку при изучении качественного состава флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового установлено наличие гиперозида, то в качестве стандартного образца при спектрофотометрировании был использован СО гиперозид ООО «Фитопанацея».

Измерение оптической плотности рекомендуется проводить в области максимума поглощения 405 ± 5 нм, так как данная область спектра достаточно удалена от спектров поглощения сопутствующих фенольных и других органических веществ, содержащихся в экстрактах из сырья.

При изучении условий спектрофотометрирования установлено, что оптимальным является использование 2 мл 5%-ного раствора алюминия хлорида. Результаты исследования по изучению влияния концентрации и количества раствора алюминия хлорида на полноту протекания реакции комплексообразования приведены в табл. 2.

Устойчивое окрашивание извлечений из сырья с алюминия хлоридом наступает через 15 мин и сохраняется в течение 1,5 ч, что достаточно для проведения анализа (табл. 3).

На основании проведенных исследований разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового.

Приготовление растворов. Раствор стандартного образца гиперозида: около 0,02 г (точная навеска) СО гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 35 мл спирта этилового 70%-ного и растворяют при периодическом помешивании, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО гиперозида).

Раствор А СО гиперозида (1 мл) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 5%-ного в спирте этиловом 70%-ном и через 10 мин – 2 капли кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки (раствор Б СО гиперозида).

Алюминия хлорида раствор 5%-ный в спирте этиловом 70%-ном, 5,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта этилового 70%-ного в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70%-ного спирта этилового и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 70%-ным спиртом этиловым. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Раствор А испытуемого раствора (2 мл) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 5%-ного в спирте этиловом 70%-ном и через 10 мин – 2 капли кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 15 мин (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность образующегося окрашенного комплекса измеряют на спектрофотометре при длине волны 405 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения исполь-

зуют раствор, состоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора, 2 капель кислоты уксусной разведенной и доведенный спиртом этиловым 70%-ным до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО гиперозида в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО гиперозида, 2 капель кислоты уксусной разведенной и доведенный спиртом этиловым 70%-ным до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле

$$\frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора Б СО гиперозида; a – навеска сырья, г; a_0 – навеска СО гиперозида, г; P – содержание основного вещества в СО гиперозида, %; W – влажность сырья, %.

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового в пересчете на гиперозид представлены в табл. 4.

Таблица 4. Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового

N	f	$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$p, \%$	Δx	$E, \%$
6	5	2,01	0,0013	0,0358	95	0,0919	4,57

Согласно результатам проведенного исследования, содержание флавоноидов в траве исследуемого растения в пересчете на гиперозид составляет 2,01%, ошибка единичного определения с вероятностью 95% не превышает 4,57%.

Выводы

1. С помощью качественных реакций и тонкослойной хроматографии в траве астрагала шерстистоцветкового установлено наличие флавоноидов и определен их качественный состав.
2. Определены оптимальные условия экстрагирования флавоноидов из сырья исследуемого растения. Выбраны условия полноты протекания реакции комплексообразования ис-

следуемого извлечения со спиртовым раствором алюминия хлорида.

3. Разработанная методика количественного определения флавоноидов в траве астрагала шерстистоцветкового может быть использована для стандартизации сырья «Трава астрагала шерстистоцветкового» по содержанию флавоноидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный Реестр лекарственных средств. М. 2010. Электронная версия.
2. Фармакопейная статья ФС 42-533-72 «Трава астрагала шерстистоцветкового», утв. 13.12.1972. 3 с.
3. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae-

- Ариаса. СПб.-М.: Товарищество научных изданий КМК. 2010. 610 с.
- Сергалиева М.У., Мажитова М.В., Самотруева М.А. Растения рода астрагал: перспективы применения в фармации // Астраханский медицинский журнал. 2015. 10(2): 17–31.
 - Гужва Н.Н., Хачатрян М.М., Кладова Т.В., Гужва Л.Б. Определение микроэлементов в различных видах астрагалов // Материалы 58 Межрегион. конф. по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Пятигорск. 2003. С. 25–27.
 - Гейсман Т.А. Цветные реакции на флавоноидные соединения // Сб. статей «Химические методы анализа растений». М. 1960. 469 с.
 - Мальцева А.А., Тринеева О.В., Чистякова А.С., Брежнева Т.А., Сливкин А.И., Сорокина А.А. Тонкослойная хроматография в анализе флавоноидов растительных объектов // Фармация. 2013. № 1. С. 13–16.
 - Беликов В.В., Точкова Т.В. Спектрофотометрия комплексных соединений флавоноловых смесей // Тезисы докл. II съезда фармацевтов УССР «Современные проблемы фармацевтической науки и практики». Киев. 1972. С. 572–575.
 - Позднякова Т.А., Бубенчиков Р.А. Стандартизация сырья герани сибирской (*Geranium sibiricum* L.) по содержанию флавоноидов // Ученые записки Орловского государственного университета. 2013. № 3(53). С. 288–291.

Поступила 19 марта 2018 г.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR QUANTITATION OF THE AMOUNT OF FLAVONOIDS IN THE HERB *ASTRAGALUS DASYANTHUS* L.

© Т.А. Pozdnyakova, R.A. Bubenchikov, 2018

T.A. Pozdnyakova

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Pharmacy, I.S. Turgenev Orel State University (Orel, Russia)

R.A. Bubenchikov

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Botany, Kursk State Medical University (Kursk, Russian)

Currently *Astragalus dasyanthus* is the only representative of the many kinds of *Astragalus*, which was used in scientific medicine as antihypertensive and diuretic. However, in the FS for medicinal plant material «Herb *Astragalus dasyanthus*» there is no data for standardization of raw materials on the content of active substances. Therefore, the aim of our work was to develop a methodology for determining the quantitative content of flavonoids in the herb of *Astragalus dasyanthus* as one of the major groups of active substances of the plant.

Materials and methods. The object of the study was the crushed air-dry herb *Astragalus dasyanthus*, harvested in 2016–2017 on the territory of Kursk region in the period of mass flowering. Establishing the presence of flavonoids in the studied raw materials was carried out using the well-known qualitative reactions, and their identification using thin layer chromatography. For standardization of the herb *Astragalus dasyanthus* on the content of flavonoids, we developed a methodology for spectrophotometric determination of the sum of flavonoids directly in the extraction of raw materials, based on the reaction of complex formation of flavonoids with aluminium chloride.

Results and discussion. The optimal conditions for the extraction of the sum of flavonoids from the herb *Astragalus dasyanthus* are: the extent of grinding 1 mm, extractant – ethanol 70%, extraction by heating in a boiling water bath for 45 minutes. In the study of the conditions spectrophotometry established that the optimal is the use of 2 ml of a 5% solution of aluminum chloride. Staining sustainable extraction of raw materials with aluminum chloride occurs within 15 minutes and lasts for 1,5 hours. Measurement of optical density was carried out in the region of maximum absorption (405±5 nm), which coincides with the maximum of absorbance of hyperoside with aluminum chloride, so as the standard sample we used with hyperoside, ООО «Fitopanatseya».

According to the results of the study, the content of flavonoids in the herb of *Astragalus dasyanthus* calculated as hyperoside is 2,01%, the error of single determination with 95% probability not to exceed is 4,57%.

Conclusion. The developed method of quantitative determination of flavonoids in the herb of *Astragalus dasyanthus* can be used for standardization of raw materials «Herb *Astragalus dasyanthus*» the content of flavonoids.

Key words: *Astragalus dasyanthus* L., flavonoids, the reaction of complex formation, a spectrophotometric method.

For citation: Pozdnyakova T.A., Bubenchikov R.A. Development of methods for quantitation of the amount of flavonoids in the herb *Astragalus dasyanthus* L. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(6):10–15. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-02>

REFERENCES

- The state Register of medicines. M. 2010. The electronic version.
- Pharmacopoeial article FS 42-533-72 «Herba *Astragalus dasyanthus*», approved.13.12.1972. 3 p.
- Plant resources of Russia: wild flowering plants, their component composition and biological activity. Vol.3. Familia Fabaceae-Apiaceae / Pod red. A.L. Budanceva. Spb. M.: Tovarishhestvo nauchny`x izdanij KMK. 2010. 610 p.
- Sergaliev M.U., Mazhitova M.V., Samotrueva M.A. Plants of the genus *Astragalus*: prospects of application in pharmacy // Astrakhan medical journal. 2015, 10(2):17–31.

Фармацевтическая химия

5. Guzhva N.N., Xachatryan M.M., Kladova T.V., Guzhva L.B. Determinatio vestigium elementa in diversis Astragalus // Materialy` 58 mezhregional`noj konferencii po farmacii i farmakologii «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». Pyatigorsk. 2003. P. 25–27.
6. Gejssman T.A. Color reactions of flavonoid compounds // Chemical methods of analysis of plants: collection of articles. M. 1960. 469 p.
7. Mal'ceva A.A., Trineeva O.V., Chistyakova A.S., Brezhneva T.A., Slivkin A.I., Sorokina A.A. Thin-layer chromatography in the analysis of flavonoids of the plant // Pharmacy. 2013, 1:13–16.
8. Belikov V.V., Tochkova T.V. Spectrophotometry of complex compounds flavonovy mixes // Modern problems of pharmaceutical science and practice: Tez. dokl. II Congress of pharmacists of USSR. Kiev. 1972. P. 572–575.
9. Pozdnyakova T.A., Bubenchikov R.A. Standardization of raw materials of Geranium sibiricum L. on the content of flavonoids // Scientific notes of Orel state University. 2013, 3(53):288–291.