

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 615.1: 615.322: 615.036

DOI 10.21685/2307-9150-2020-2-1

*Н. А. Гаврилова, М. С. Шурыгина,
Е. Е. Курдюков, О. А. Водопьянова, Д. В. Кривов*

НОВАЯ МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЦВЕТКАХ ЛИПЫ

Аннотация.

Актуальность и цели. Цветки липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill, сем. Липовых – *Tiliaceae*) в виде различных лекарственных форм используются в качестве потогонного и отхаркивающего средства. Фармакологические свойства препаратов цветков липы в основном обусловлены эфирным маслом (фарнезол) и полисахаридами. Однако по литературным данным, в сырье липы присутствуют флавоноиды, которые представлены тилианином, кверцетином, гиперозидом, рутином. Важным фармакологическим свойством флавоноидов является повышение прочности стенок капилляров (Р-витаминная активность) за счет антиоксидантного действия, данное свойство важно при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с увеличением проницаемости кровеносных капилляров [1, 2]. Наиболее ярким представителем в данной группе веществ является рутин, относящийся к группе витамина Р. В этом отношении большой интерес представляют цветки липы, содержащие данные соединения. Проблемы химической стандартизации сырья данного растения решены не в полной мере, актуальным является разработка методов стандартизации по количественному содержанию суммы флавоноидов. На наш взгляд, несмотря на сложный химический состав цветков липы, представленный такими группами биологически активных соединений (БАС), как эфирное масло, полисахариды, флавоноиды, стандартизацию данного растения целесообразно проводить и по содержанию флавоноидов. Цель исследования – исследование по разработке методики количественного определения содержания флавоноидов в сырье липы.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали три образца высушенных цветков липы, собранных в условиях Пензенской, Самарской и Московской областей. Количественное определение флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии.

Результаты. Для количественного определения суммы флавоноидов в лекарственном растительном сырье в качестве экстрагента используются водно-спиртовые растворы различной концентрации. Обнаружено, что по сравнению с 70 % спиртовыми экстрактами интенсивность пиков в 40 и 95 % спиртовых экстрактах меньше. Следовательно, для экстракции флавоноидов из цветков

© Гаврилова Н. А., Шурыгина М. С., Курдюков Е. Е., Водопьянова О. А., Кривов Д. В., 2020. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

липы целесообразно использование этанола 70 %. Показано, что УФ-спектры экстрактов цветков липы имеют один четкий максимум поглощения при 279 нм вне зависимости от концентраций этанола-экстрагента. В результате количественного определения флавоноидов в цветках липы изучены УФ-спектры их комплексных соединений с хлоридом алюминия. Было установлено, что в присутствии хлорида алюминия максимум поглощения комплексного соединения флавоноидов липы находится в области 408 ± 2 нм. В результате исследования было выявлено, что наилучшая концентрация спирта – 70 %, наилучшее соотношение сырья и экстрагента – 1:100, наилучшее время для экстракции – 60 мин.

Выводы. С использованием разработанной методики определения флавоноидов были проанализированы образцы липы, выращенной в различных регионах России. Было установлено, что содержание флавоноидов в цветках липы варьирует от 1,5–2,0 %.

Ключевые слова: *Tilia cordata* Mill, флавоноиды, спектрофотометрия, количественное определение.

N. A. Gavrilova, M. S. Shurygina,
E. E. Kurdyukov, O. A. Vodop'yanova, D. V. Krivov

A NEW METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN LINDEN FLOWERS

Abstract.

Background. Linden flowers (*Tilia cordata* Mill) in the form of various medicinal forms is used as a diaphoretic and expectorant. The pharmacological properties of Linden flower preparations are mainly due to the essential oil (farnesol) and polysaccharides. However, according to literature data, the raw materials of Linden contain flavonoids, which are represented by tilianin, quercetin, hyperoside, and rutin. One of the most important properties of flavonoids is the ability to increase the strength of capillary walls (P-vitamin activity) due to the antioxidant effect, which is important in the treatment of chronic venous insufficiency, hypertension and other cardiovascular diseases associated with increased permeability of blood capillaries [1, 2]. The most striking representative in this group of substances is rutin, which belongs to the group of vitamin R. In this case, Linden flowers are of great interest. The problem of chemical standardization of raw materials of this plant is not fully solved, it is important to develop methods of standardization for the quantitative content of the amount of flavonoids. In our opinion, despite the complex chemical composition of Linden flowers, represented by such groups of biologically active compounds as essential oil, polysaccharides, flavonoids, it is advisable to standardize this plant according to the content of flavonoids. Objective – research on the development of a method for quantifying the content of flavonoids in Linden raw materials.

Materials and methods. The object of the study was used 3 samples of dried Linden flowers grown in the Penza, Samara and Moscow regions. Quantitative determination of flavonoids was performed by the method of differential spectrophotometry.

Results. In methods of quantitative determination of flavonoids of plant raw materials, water-alcohol solutions of different concentrations are used for extraction. It was found that in comparison with 70 % alcohol extracts, the intensity of peaks in 40 and 95 % alcohol extracts is less. Therefore, for the extraction of flavonoids from Linden flowers, it is advisable to use 70 % ethanol. It is shown that the UV spectra of Linden flower extracts have one clear maximum absorption at 279 nm, regardless

of the concentration of ethanol-extractant. In the development of quantitative determination of flavonoids in Linden flowers, UV spectra of their complex compounds with aluminum chloride were studied. It was found that in the presence of aluminum chloride, the maximum absorption of the complex compound of Linden flavonoids is in the region of 408 ± 2 nm. As a result of the study, it was revealed that the best concentration of alcohol is 70 %, the best ratio of raw materials and extractant is 1:100, the best time for extraction is 60 minutes.

Conclusions. Samples of Linden grown in different regions of Russia were analyzed using the developed technique for determining flavonoids. It was found that the content of flavonoids in Linden flowers varies from 1,5–2,0 %.

Keywords: *Tilia cordata* Mill, flavonoids, spectrophotometry, quantitative determination.

Введение

Липа сердцевидная (*Tilia cordata* Mill) – известное растение семейства *Tiliaceae*, имеющее многолетний опыт применения в медицине. Анализ научной литературы показал, что химический состав цветков липы достаточно разнообразный, содержатся эфирные масла, полисахариды, тритерпеновые сапонины, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и органические кислоты. Флавоноиды липы сердцевидной представлены тилианином, кверцетином, гиперозидом, рутином [1, 2]. Данный вид сырья оказывает антибактериальное, спазмолитическое, противовоспалительное и жаропонижающее действие. В частности, установлено, что противовоспалительная и спазмолитическая активность обусловлены преимущественно флавоноидами [2]. Следует учитывать, что цветки липы содержат значительные количества рутина и могут служить потенциальным сырьем для создания лекарственных средств источников флавоноидов.

Материалы и методы

В качестве материала использовали высушенные измельченные цветки липы, собранные в Пензенской, Самарской и Московской областях, заготовленных в фазу цветения.

Извлечение флавоноидов из цветков липы проводили путем однократной экстракции раствором этанола различной концентрации при нагревании на кипящей водяной бане в течение 90 мин. Наличие флавоноидов подтверждали следующими реакциями: цианидиновая проба, с раствором аммиака, гидроксидом натрия, хлоридом железа (III), спиртовым раствором $AlCl_3$ [2]. Для проведения качественных реакций извлечение готовили в соотношении «сырье : экстрагент» 1:10, для спектрофотометрического анализа – 1:100.

Содержание флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии. В результате взаимодействия с хлоридом алюминия происходит bathochromный сдвиг поглощения флавоноидов в видимую часть спектра, что позволяет исключить влияние сопутствующих окрашенных веществ. Спектры собственного поглощения флавоноидов цветков липы регистрировали в интервале длин волн 200–500 нм (спектрофотометр СФ-104). Использовали методику дифференциальной спектрофотометрии с хлоридом алюминия. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья (0,5 мм) помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта различ-

ной концентрации (40, 70 и 95 %). Колбу с обратным холодильником нагревали на кипящей водяной бане при температуре 90 °С в течение 60 мин. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 95 % и через 10 мин 2 капли разведенной кислоты уксусной. Объем раствора доводили спиртом этиловым 70 % до 25 мл и оставляли на 30 мин (раствор Б). В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный при тех же условиях, но без $AlCl_3$. Содержание суммы флавоноидов рассчитывали по удельному показателю поглощения рутина, за основу взята формула расчета флавоноидов в сырье гинкго двулопастного [3–8]. В данной формуле в результате разработки методики изменили количество экстрагента с 30 на 100 мл, количество раствора А с 1 на 2 мл.

Все измерения проведены в пятикратных аналитических повторностях, в таблицах приведены средние значения. Определялись основные статистические характеристики (Statistica 6.0, BIOSTAT): среднее, ошибка среднего. Достоверность различий рассчитана с помощью T -критерия Стьюдента. Критическая величина уровня значимости принята равной 0,05. Во всех данных, приведенных в статье, количественные показатели выражены в виде $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного анализа выявлено, что спектры поглощения экстрактов цветков липы имеют один четкий максимум поглощения при 279 нм (рис. 1). Следует отметить, что при использовании различных концентраций этанола-экстрагента эти параметры спектра постоянны.

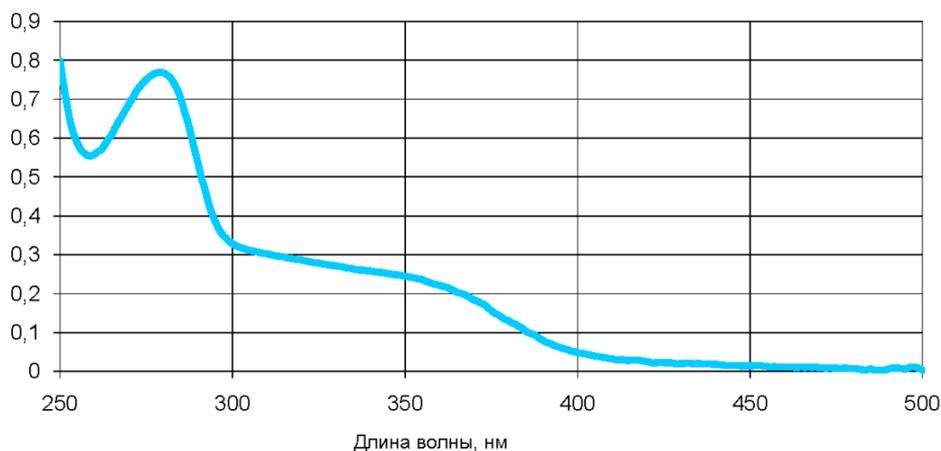


Рис. 1. УФ-спектр спиртового экстракта цветков липы (спирт 70 %)

Для определения оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов исследовали влияние следующих факторов: концентрацию экстрагента, время экстракции и соотношение «сырье : экстрагент».

В результате исследования обнаружено, что, по сравнению с 70 % спиртовым экстрактом (содержание флавоноидов – 1,93 %), интенсивность пиков поглощения у 40 % (содержание флавоноидов – 1,45 %) и 95 % (содер-

жание флавоноидов – 1,81 %) спиртовых экстрактов меньше. Следовательно, для экстракции флавоноидов из цветков липы целесообразно использование 70 % этанола (рис. 2). Для подтверждения доброкачественности цветков липы, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 408 нм, оптическая плотность исследуемого образца не должна быть меньше 0,42.

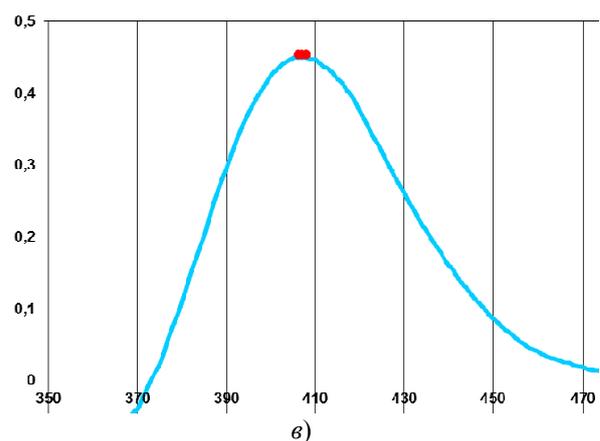
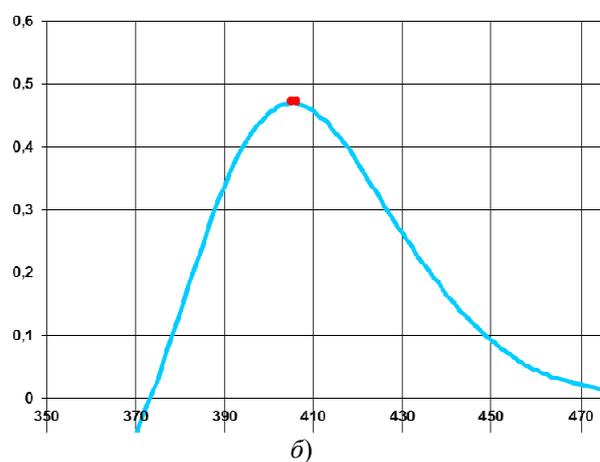
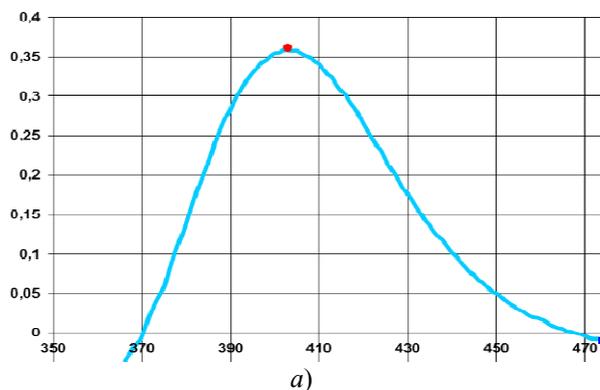


Рис. 2. УФ-спектр извлечений из сырья цветков липы (2:25) с добавлением $AlCl_3$; концентрации этанола: а – 40 %; б – 70 %; в – 95 %

В процессе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов определены оптимальные условия экстракции (исследование проводили в пяти повторностях): экстрагент – 70 % спирт; соотношение «сырье : экстрагент» – 1:100; время экстракции – 60 мин; степень измельченности сырья – 0,5 мм. При соблюдении данных параметров извлекается большее количество флавоноидов (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов

Экстрагент	Соотношение «сырье : экстрагент»	Степень измельченности, мм	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин
Экстрагент				
Спирт 40 %	1:100	1	90	1,38 ± 0,15
Спирт 70 %		1	90	1,59 ± 0,08*
Спирт 95 %		1	90	1,50 ± 0,11*
Соотношение «сырье : экстрагент»				
Спирт 70 %	1:30	1	90	1,39 ± 0,12
	1:50	1	90	1,52 ± 0,10*
	1:100	1	90	1,59 ± 0,08*
	1:200	1	90	1,28 ± 0,15
Степень измельченности				
Спирт 70 %	1:100	0,2	90	1,61 ± 0,07*
		0,5	90	1,64 ± 0,05*
		1	90	1,56 ± 0,08*
		2	90	1,47 ± 0,14
Время экстрагирования				
Спирт 70 %	1:100	0,5	45	1,56 ± 0,10*
		0,5	60	1,68 ± 0,08*
		0,5	90	1,64 ± 0,09*
		0,5	120	1,61 ± 0,16

Примечание. *Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

С использованием разработанной методики проанализировали ряд образцов сырья липы и определили, что в цветках липы содержится относительно высокое количество флавоноидов от 1,53 до 1,93 % (табл. 2) для использования в медицине.

Результаты статистической обработки результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения не превышает значения 3,75 %. Для оценки доброкачественности сырья цветков липы по содержанию суммы флавоноидов их количество в пересчете на рутин не должно быть меньше 1,5 %.

Таблица 2

Содержание флавоноидов в различных образцах сырья липы, ($M \pm m$)

Регион произрастания	Содержание, %
1. Пензенская область	1,68 ± 0,09*
2. Московская область	1,53 ± 0,17
3. Самарская область	1,93 ± 0,07*

Примечание. *Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Заключение

1. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в цветках липы возможно с использованием дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 408 нм. При этом положение максимумов поглощения не меняется при концентрации спирта в качестве экстрагента в 40, 70 и 95 %.

2. Содержание флавоноидов незначительно варьирует в интервале 1,5–2,0 %. В образцах сырья цветков липы из Пензенской области содержание флавоноидов незначительно снижено по сравнению с сырьем цветков липы, заготовленного в Самарской области.

3. Полученные результаты позволяют рекомендовать цветки липы как источник флавоноидов наряду с другими уже используемыми лекарственными растениями.

Библиографический список

1. Куркин, В. А. Фармакогнозия : учеб. для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / В. А. Куркин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара : Офорт : СамГМУ Росздрава, 2007. – 1239 с.
2. Куркина, А. В. Флавоноиды фармакопейных растений : монография / А. В. Куркина. – Самара : Офорт : СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
3. Куркина, А. В. Актуальные вопросы химической стандартизации лекарственных растений, содержащих флавоноиды / А. В. Куркина // Фармация. – 2012. – Т. 60, № 7. – С. 44–48.
4. Бубенчиков, Р. А. Флавоноиды фиалки трехцветной / Р. А. Бубенчиков, И. Л. Дроздова // Фармацевтическая химия и фармакогнозия. – 2004. – № 2. – С. 11, 12.
5. Курдюков, Е. Е. К вопросу стандартизации по содержанию флавоноидов листьев стевии как нового вида лекарственного растительного сырья / Е. Е. Курдюков, А. В. Кузнецова, Е. Ф. Семенова, И. Я. Моисеева // Химия растительного сырья. – 2019. – № 1. – С. 217–224.
6. Куркин, В. А. Количественное определение суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 4. – С. 34–37.
7. Иванов, В. В. Флавоноидный состав надземной части рейнотрии сахалинской (*Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai) / В. В. Иванов, М. И. Кодониди, О. Н. Денисенко // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – Пятигорск, 2011. – Вып. 66. – С. 102, 103.
8. Леонова, В. Н. Определение флавоноидов в листьях форзиции промежуточной (*Forsythia intermedia* Zabel.) / В. Н. Леонова, О. И. Попова, И. А. Савенко // Химия растительного сырья. – 2013. – № 1. – С. 175–178.

References

1. Kurkin V. A. *Farmakognosiya: ucheb. dlya studentov farmatsevticheskikh vuzov (fakul'tetov)* [Pharmacognosy: textbook for students of pharmaceutical universities (faculties)]. 2nd ed., rev. and suppl. Samara: Ofort: SamGMU Roszdrava, 2007, 1239 p. [In Russian]
2. Kurkina A. V. *Flavonoidy farmakopeynykh rasteniy: monografiya* [Pharmacopoeia plant flavonoids: monograph]. Samara: Ofort: SamGMU Minzdravsotsrazvitiya Rossii, 2012, 290 p. [In Russian]
3. Kurkina A. V. *Farmatsiya* [Pharmacy]. 2012, vol. 60, no. 7, pp. 44–48. [In Russian]
4. Bubenchikov R. A., Drozdova I. L. *Farmatsevticheskaya khimiya i farmakognosiya* [Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy]. 2004, no. 2, pp. 11, 12. [In Russian]
5. Kurdyukov E. E., Kuznetsova A. V., Semenova E. F., Moiseeva I. Ya. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw materials]. 2019, no. 1, pp. 217–224. [In Russian]
6. Kurkin V. A., Ryazanova T. K. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Chemical and pharmaceutical journal]. 2013, vol. 47, no. 4, pp. 34–37. [In Russian]
7. Ivanov V. V., Kodonidi M. I., Denisenko O. N. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii* [Development, research and marketing of new pharmaceutical products]. Pyatigorsk, 2011, iss. 66, pp. 102, 103. [In Russian]
8. Leonova V. N., Popova O. I., Savenko I. A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw materials]. 2013, no. 1, pp. 175–178. [In Russian]

Гаврилова Наталья Александровна
студентка, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: Natashagavril121314@icloud.com

Шурыгина Мария Сергеевна
студентка, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Курдюков Евгений Евгеньевич
кандидат фармацевтических наук,
доцент, кафедра общей и клинической
фармакологии, Пензенский
государственный университет
(Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Водопьянова Ольга Александровна
кандидат медицинских наук, доцент,
кафедра общей и клинической
фармакологии, Пензенский
государственный университет
(Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: ol.vodopjanova@yandex.ru

Gavrilova Natal'ya Aleksandrovna
Student, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Shurygina Mariya Sergeevna
Student, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Kurdyukov Evgeniy Evgen'evich
Candidate of pharmaceutical sciences,
associate professor, sub-department
of general and clinical pharmacology, Penza
State University (40 Krasnaya street, Penza,
Russia)

Vodop'yanova Ol'ga Aleksandrovna
Candidate of medical sciences, associate
professor, sub-department of general and
clinical pharmacology, Penza State
University (40 Krasnaya street, Penza,
Russia)

Кривов Дмитрий Валерьевич

студент, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: Krivovdima98@mail.ru

Krivov Dmitriy Valer'evich

Student, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Образец цитирования:

Новая методика количественного определения флавоноидов в цветках
липы / Н. А. Гаврилова, М. С. Шурыгина, Е. Е. Курдюков, О. А. Водопьянова,
Д. В. Кривов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион.
Естественные науки. – 2020. – № 2 (30). – С. 5–13. – DOI 10.21685/2307-9150-
2020-2-1.