

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕЛКОЛЕПЕСТНИКА КАНАДСКОГО (ERIGERON CANADENSIS L.)

А.Ю. Ботов, В.Я. Яцюк, Г.В. Сипливый, Л.Е. Сипливая

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет (г. Курск)

The study of *Erigeron canadensis* L. phenolic compounds

A.Y. Botov, V.Y. Yatsuk, G.V. Siplivyi, L.E. Siplivaya

Kursk State medical university (Kursk, Russia)

РЕЗЮМЕ

Методом ВЭЖХ проведен анализ качественного состава и количественного соотношения фенольных соединений травы мелколепестника канадского (*Erigeron canadensis* L.). В спирто-водном извлечении, полученном методом экстракции при нагревании, найдено 22 вещества, 17 из них идентифицированы: среди них фенолкарбоновые кислоты, кумарины, флавоноиды.

Разработана методика спектрофотометрического определения количественного содержания суммы флавоноидов в траве мелколепестника канадского и проведена ее валидация. Установлены следующие валидационные параметры методики: прецизионность (сходимость, внутрилабораторная воспроизводимость), правильность (точность) и линейность.

В ходе определения линейности методики установлено, что графики зависимости имеют линейный характер. Коэффициент корреляции близок к единице и равен 0,9992 для ГСО Рутина и 0,9991 для спирто-водного извлечения из травы мелколепестника канадского. Относительное стандартное отклонение при определении сходимости составило 2,97 %. Критерий приемлемости, выраженный величиной относительного стандартного отклонения, не превышал 3,84 %.

В ходе проведенных исследований установлено, что данный экспресс-метод воспроизводим и доступен.

Ключевые слова: мелколепестник канадский, ВЭЖХ, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, валидация.

RESUME

Analysis of the qualitative and quantitative composition of herb *Erigeron canadensis* L. phenolic compounds has been made by us using HPLC method. In water-spirit fraction obtained by extraction with heating, we have found 22 substances, 17 of them have been identified: phenolic acids, coumarins, flavonoids.

The technique of the spectrophotometric determination of quantitative content of amount of flavonoids in the herb of *Erigeron canadensis* L. has been developed and its validation has been carried out. We have established the following validation parameters of technique: precision (repeatability, reproducibility), accuracy and linearity.

In determining linearity of the techniques we have established that the plots are linear. The correlation coefficient is close to one and it is equal to 0,9992 and 0,9991 for rutin and water-spirit extract of *Erigeron canadensis* L. herb respectively. In determining repeatability value of the relative standard deviation (RSD) was equal to 2,97 %. Acceptance criteria, expressed by value of RSD don't exceed 3,84 %.

As a result of the spent researches we have concluded that the technique is reproducible, affordable and express.

Keywords: *Erigeron canadensis* L., HPLC, phenolic acids, flavonoids, validation.

ВВЕДЕНИЕ

На нынешнем этапе развития медицинской науки немало внимания уделяется проблеме применения фармацевтических препаратов растительного происхождения. Эта тенденция связана, в первую очередь, с достаточно широким спектром фармакологической активности и низкой токсичностью средств природного происхождения.

Фенольные соединения – одна из самых распространенных и многочисленных групп природных соединений, вызывающих интерес

исследователей, благодаря широкому спектру их биологической активности.

Род мелколепестник (*Erigeron*) – один из крупных в семействе сложноцветных, насчитывает около 200 видов, распространенных на всех материках, но преимущественно в Северной Америке. В России мелколепестник представлен примерно 70 видами [4]. Объектом данного исследования был выбран мелколепестник канадский (*Erigeron canadensis* L.), являющийся одним из самых распространенных видов данного рода в нашей стране и обладаю-

щий большой сырьевой базой в частности и на территории Центрально-Черноземного района. Мелколепестник канадский не применяется в официальной медицине, что объясняется, на наш взгляд, его недостаточной химической и фармакологической изученностью.

Целью данной работы было изучение фенольного состава надземной части мелколепестника канадского.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для фитохимического исследования использовали надземные органы растения, собранные в фазу вегетации: «конец цветения – начало плодоношения» на территории Курской области в 2010–2011 гг.

Изучение *фенольных соединений* травы мелколепестника канадского проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы «Gilston» (инжектор ручной, модель «Rheodyne» 7125 USA) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «Мультихром» для Windows. В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 4,6 x 250 мм Kromasil C 18, размер частиц 5 микрон. В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей метанола-вода-фосфорная кислота концентрированная, в соотношении 400:600:5. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0,8 мл/мин. Продолжительность анализа 70 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора «Gilston» UV/VIS, при длине волны 254 нм.

Сырье измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (ГОСТ 214-83). В колбу вместимостью 200,0 мл помещали 7,0 г сырья, прибавляли 60 мл 70 % спирта этилового, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут с момента закипания спирто-водной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 100,0 мл и доводили 70 % спиртом этиловым до метки (исследуемый раствор).

Параллельно готовили серию 0,05 % растворов стандартных образцов (ГСО) в 70 % спирте этиловом: рутина, кверцетина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, гесперидина, апигенина, гиперозида, дигидрокверцетина,

кемпферола, витексина, изовитексина, нарингенина, байкалина, изорамнетина, галловой, кофейной, хлорогеновой, цикориевой, коричной, феруловой, эллаговой, о-кумаровой кислот, умбеллиферона, эскулетина, кумарина, метоксикумарина, эпигаллокатехина галлата, эпикатехина. По 50 мкл исследуемого раствора и ГСО вводили в хроматограф и хроматографировали по вышеприведенной методике.

Количественное определение флавоноидных соединений в траве мелколепестника канадского, проводили с использованием спектрофотометрического метода анализа [2, 6]. Аналитическую пробу воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито диаметром 1 мм. 1,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 100,0 мл, прибавляли 50,0 мл 70 % спирта этилового. Колбу закрывали, взвешивали с точностью до 0,01 г и нагревали с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу с содержимым охлаждали, взвешивали, доводили массу колбы до первоначальной 70 % спиртом этиловым и фильтровали (раствор А). Параллельно готовили 0,05 % спиртовой раствор ГСО рутина: около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 часов, растворяли в 85,0 мл 70 % этанола в мерной колбе вместимостью 100,0 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, доводили объем до метки спиртом той же концентрации (раствор В).

Исследуемый раствор. 2,5 мл раствора А и 2,0 мл 2 % раствора алюминия хлорида (в 70 % этаноле) помещали в мерную колбу на 50,0 мл и доводили до метки 70 % спиртом этиловым.

Раствор сравнения. 2,0 мл раствора В и 2,0 мл 2 % раствора алюминия хлорида (в 70 % этаноле) помещали в мерную колбу на 50,0 мл и доводили до метки 70 % спиртом этиловым.

Компенсационный раствор (а). 2,5 мл раствора А помещали в мерную колбу на 50,0 мл и доводили объем раствора до метки 70 % этанолом.

Компенсационный раствор (b). 2,0 мл раствора В помещали в мерную колбу на 50,0 мл и доводили объем раствора до метки 70 % этанолом.

Измеряли оптическую плотность исследуемого раствора и раствора сравнения при 414 нм через 30 минут, используя в качестве нулевых растворов компенсационный раствор (а) и компенсационный раствор (b) соответственно.

Содержание суммы флавоноидных соединений в траве мелколистника канадского в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times V_{k1} \times V_{k2} \times V_{п0} \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times V_{k3} \times V_{k4} \times V_{п} \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; D₀ – оптическая плотность ГСО рутина; m – масса навески сырья в граммах; m₀ – масса навески ГСО рутина в граммах; W – потеря в массе при высушивании в процентах; V_{k1} – объем экстрагента для извлечения флавоноидов из травы; V_{k2} – объем колбы для разведения экстракта травы мелколистника канадского; V_{k3} – объем колбы для 1-го разведения ГСО рутина; V_{k4} – объем колбы для 2-го разведения ГСО рутина; V_п – объем пипетки (объем экстракта из травы мелколистника канадского взятый для разведения); V_{п0} – объем пипетки (объем раствора ГСО рутина взятый для разведения).

Для экспериментального доказательства пригодности разработанной методики проведена валидация описанной выше методики количественного определения суммы флавоноидов в траве мелколистника канадского. Валидация разработанной методики проведена по показателям: прецизионность (сходимость, внутрилабораторная воспроизводимость), правильность (точность) и линейность [3].

Сходимость, как характеристику точности методики, определяли на одном образце в 6 повторностях в одинаковых условиях. Критерий приемлемости выражали величиной относительного стандартного отклонения (RSD), которое не должно превышать 10%.

Оценку линейности методики проводили на 8 уровнях концентрации для ГСО рутина и на 5 для извлечения. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции, величина которого должна быть не ниже 0,99.

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики выполнялось параллельно двумя исследователями. Испытания проводили на трех различных образцах в трех повторностях. Три повторности выпол-

няли в разное время и на разных приборах. Использовали спектрофотометр СФ-2000 и спектрофотометр СФ-46. Критерий приемлемости выражали величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%.

Для проверки правильности методики готовили модельный препарат с максимально возможным содержанием определяемого компонента. Далее модель разбавляли 70% спиртом этиловым, получая, таким образом, 3 уровня концентрации, причем, исходный препарат (модель) в число опытных разведений не входит. При этом содержание определяемого компонента принимали за опорное значение. Критерий приемлемости – открываемость, величина, которая должна находиться в пределах 100±5% и относительное стандартное отклонение [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные с использованием ВЭЖХ, свидетельствуют о содержании в тра-

Таблица 1

Результаты исследования фенольных соединений методом ВЭЖХ в траве мелколистника канадского

№	Время удерживания, с	Количественное соотношение, %	Наименование вещества
1	179,7	4,17	Умбеллиферон
2	189,7	5,82	Галловая кислота
3	224,1	2,23	Неидентифиц.
4	237,0	4,94	Эпигаллокатехин галлат
5	299,1	5,07	Цикориевая кислота
6	314,4	5,89	Хлорогеновая кислота
7	385,0	2,63	Кофейная кислота
8	450,1	6,53	Феруловая кислота
9	548,9	3,72	Дигидрокумарин
10	694,7	4,88	Эпикатехин
11	803,5	4,24	Лютеолин-7-гликозид
12	872,2	9,70	Гесперидин
13	968,4	1,99	Гиперозид
14	1084,2	2,61	Рутин
15	1100,0	16,03	Дигидрокверцетин
16	1413,0	0,71	Коричная кислота
17	1636,0	5,80	Неидентифиц.
18	1874,0	3,37	Неидентифиц.
19	2133,0	1,95	Неидентифиц.
20	2459,0	1,67	Катехин
21	2776,0	2,74	Неидентифиц.
22	3516,0	3,30	Кверцетин

ве мелколепестника канадского разнообразных фенольных соединений: производных фенилбензо-γ-пирона (флавоноиды), бензо-α-пирона (кумарины), а также фенолкарбоновых кислот (табл. 1).

Количественное соотношение веществ полифенольной природы в изучаемом извлечении установлено методом нормировки по площадям хроматографических пиков [5]. На основании данных, представленных в табл. 1, из идентифицированных флавоноидов преобладают дигидрокверцетин и гесперидин (в меньшей степени лютеолин-7-гликозид, кверцетин и рутин), из фенолкарбоновых кислот – хлорогеновая, галловая, цикориевая и феруловая. Кумарины представлены умбеллифероном и дигидрокумарином.

Анализ различных партий сырья показал, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в траве мелколепестника канадского колеблется от 0,89 до 1,24 %, что позволяет рекомендовать в качестве числового показателя сырья мелколепестника канадского содержание суммы флавоноидов не менее 0,8 %.

При разработке спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов с целью выбора аналитической длины волны были изучены спектры поглощений комплексов флавоноидов спирто-водного извлечения из травы мелколепестника канадского и стандартного образца ГСО рутин с алюминия хлоридом (рис. 1). Так как интервал между максимумом дифференциального спектра поглощения извлечения и длинноволновой полосы поглощения стандартного образца не превышает половины полуширины полосы поглощения стандартного образца, то

погрешность будет незначительной. Это дает возможность использовать длину волны 414 ± 2 нм в качестве рабочей, а ГСО рутин в качестве стандартного образца в данном опыте.

В ходе определения линейности (линейная зависимость оценивалась для ГСО рутин и спирто-водного извлечения в отдельности) для методики количественного определения флавоноидов в траве мелколепестника канадского установлено, что графики зависимости имеют линейный характер и описываются уравнениями $y = 246,46x - 0,0186$ и $y = 2,41x - 0,0046$ для ГСО рутин и извлечения из травы мелколепестника канадского соответственно. Коэффициенты корреляции для ГСО рутин и спирто-водного извлечения равны 0,9992 и

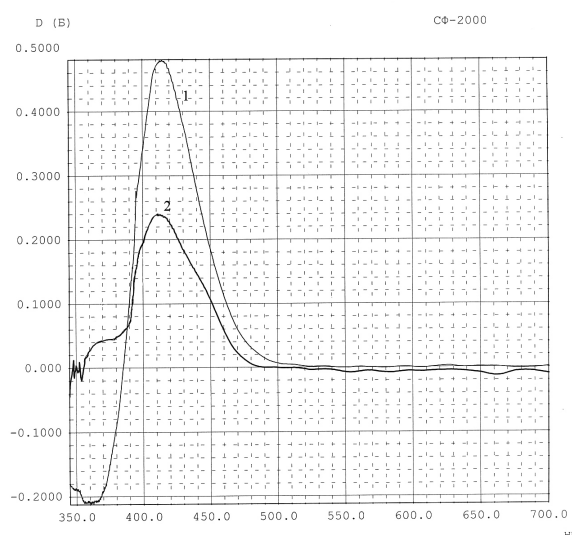


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения спирто-водного извлечения из травы мелколепестника канадского (2) и ГСО рутин (1), снятые в одинаковых условиях.

Таблица 2

Определение линейности методики количественного определения флавоноидов в траве мелколепестника канадского

№	ГСО Рутин		Спиртово-водное извлечение	
	Аналитический отклик (оптическая плотность)	Концентрация, г/100 мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)	Концентрация, г/100 мл
1	0,1157	0,0005	0,0931	0,04
2	0,2216	0,0010	0,1358	0,06
3	0,3476	0,0015	0,1889	0,08
4	0,4781	0,0020	0,2401	0,10
5	0,5944	0,0025	0,2816	0,12
6	0,7164	0,0030	—	—
7	0,8260	0,0035	—	—
8	0,9881	0,0040	—	—

0,9991, соответственно. Это свидетельствует о линейной зависимости значений оптической плотности от концентрации действующих веществ в диапазоне определенных концентраций (диаграммы 1, 2; табл. 2).

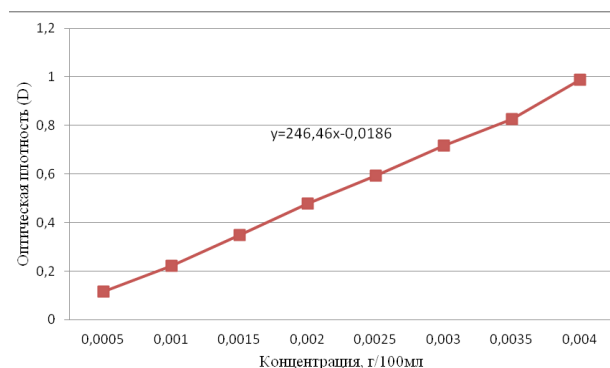


Диаграмма 1. Зависимости оптической плотности от концентрации ГСО рутина.

Относительное стандартное отклонение при определении сходимости разработанной методики составило 2,97 %, что свидетельствует о прецизионности методики (табл. 3).

При определении внутрилабораторной вос-

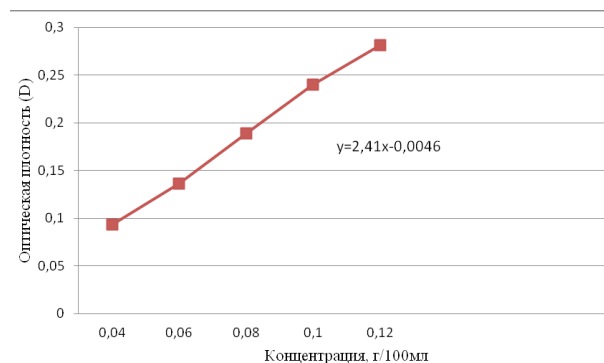


Диаграмма 2. Зависимость оптической плотности от разведения спирто-водного извлечения из травы мелколепестника канадского.

Таблица 3

Определение сходимости разработанной методики количественного определения флавоноидов в траве мелколепестника канадского

Количество повторностей	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
1	1,1282
2	1,1056
3	1,1568
4	1,1243
5	1,1345
6	1,0593
Среднее значение ($\bar{X}$)	1,1181
Стандартное отклонение (SD)	0,0332
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	2,9719

Таблица 4

Определение внутрилабораторной точности методики количественного определения флавоноидов в траве мелколепестника канадского

Повторяемость	Аналитик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %					
		Образец 1	Дата	Образец 2	Дата	Образец 3	Дата
1	1	1,1845	13.12.11	1,1349	14.12.11	0,9512	15.12.11
2	1	1,2103	13.12.11	1,1487	14.12.11	0,8893	15.12.11
3	1	1,1754	13.12.11	1,1211	14.12.11	0,8959	15.12.11
4	2	1,1732	13.12.11	1,1054	14.12.11	0,9321	15.12.11
5	2	1,1643	13.12.11	1,1566	14.12.11	0,9456	15.12.11
6	2	1,2368	13.12.11	1,0942	14.12.11	0,8945	15.12.11
Среднее значение ($\bar{X}$)		1,1908		1,1268		0,9181	
Стандартное отклонение (SD)		0,0275		0,0244		0,0280	
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		2,3106		2,1689		3,0525	

Таблица 5

**Оценка правильности методики определения суммы флавоноидов
в траве мелколепестника канадского
(исходное содержание 1,24%)**

№	Разведение препарата	Найденное содержание суммы флавоноидов, % (с учетом показателя разведения)	Расчетное содержание суммы флавоноидов, % (с учетом показателя разведения)	Открывае- мость (R), %	Метрологические характеристики
1	1:2	0,39	0,41	95,12	$R_{cp} = 100,14$ $SD = 3,84$ $RSD = 3,84 \%$
2	1:2	0,43	0,41	104,88	
3	1:2	0,42	0,41	102,44	
4	1:1	0,65	0,62	104,84	
5	1:1	0,60	0,62	96,77	
6	1:1	0,61	0,62	98,39	
7	1:0,5	0,85	0,82	103,66	
8	1:0,5	0,79	0,82	96,34	
9	1:0,5	0,81	0,82	98,78	

производимости двумя химиками значение относительного стандартного отклонения не превышало 3,05 %, что указывает на прецизионность методики в условиях повторности (табл. 4).

Определение правильности показало, что открываемость лежит в допустимых пределах, а величина RSD равна 3,84 %, что соответствует оптимальному значению для данного метода анализа (табл. 5).

В ходе исследований установлено, что описанный экспресс-метод воспроизводим и доступен.

Полученные данные о составе полифенольной фракции и количественном содержании суммы флавоноидов в траве мелколепестника канадского определяют перспективность его дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилин М.В., Сенченко С.П. Валидация аналитических методик: методические указания для аспирантов и студентов [Текст]. – Пятигорск: ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава, 2009. – С. 8–25.
2. Губанова Е.А. Количественное определение флавоноидов в траве шалфея мускатного // Фармация из века в век: сб. тр. СПХФА. – СПб, 2008. – Ч. III. – С. 20–24.
3. Евдокимова О.В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы // Фармация. – 2008. – №7. – С. 14–17.
4. Жизнь растений: Цветковые растения [Текст]. – М, 1981. Т.5., Ч.II. – С. 470–471.
5. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография [Текст]. – М., 1986. – 204 с.

6. Шимко О.М., Хишова О.М. Количественное определение флавоноидов в траве лапчатки белой // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Материалы 64-й юбилейной научной сессии университета, посвященной 75-летию его образования. – Витебск, 2009. – С. 110–112.

Адрес автора

Ботов А.Ю.
Кафедра общей и биоорганической химии.
ГБОУ ВПО Курский государственный ме-
дицинский университет
dasbot777@gmail.com