



УДК 543.544.943.3.068.7

Определение флавоноидов и исследование влияния условий хранения на их содержание в плодах облепихи методом ТСХ

Тринеева О.В., Сафонова И.И., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 21.05.2012 г.

Аннотация

Разработана методика идентификации флавоноидов (на примере рутина) и исследован флавоноидный состав плодов облепихи методом хроматографии в тонком слое сорбента. По данным хроматографического анализа, в плодах облепихи содержатся флавоноиды, два из которых являются рутином и кверцетином, что свидетельствует о перспективности использования плодов облепихи в качестве дополнительного источника флавоноидов. Изучено влияние различных условий хранения плодов на стабильность флавоноидов. Установлено, что рутин и кверцетин сохраняется в плодах даже через 6 месяцев хранения в условиях морозильной камеры.

Ключевые слова: флавоноидный состав, плоды облепихи, ТСХ.

The identification technique of flavonoides (on an example routine) is developed and the flavonoidny structure of fruits of Hippophaes by a chromatography method in a thin layer of a sorbent is investigated. According to the analysis of chromatography, in fruits of Hippophaes contain of flavonoides, two of which are routine and quercetine that testifies to prospects of use of fruits of Hippophaes as an additional source of flavonoides. Influence of various storage conditions of fruits on stability of flavonoides is studied. It is established that routine and quercetine remains in fruits even in 6 months of storage in the conditions of the freezing chamber.

Keywords: flavonoides structure, fruits of Hippophaes, TLC

Введение

Для качественного анализа флавоноидных соединений наиболее широко применяется бумажная и тонкослойная хроматография [1]. Определение индивидуальных флавоноидов в лекарственном растительном сырье (ЛРС), в основном, проводят с помощью методов ВЭЖХ или спектрофотометрии в ультрафиолетовой области после разделения их суммы с применением хроматографии на бумаге или в тонком слое [2-6].

Плоды облепихи широко используются в народной и официальной медицине. Согласно нормативной документации [7], содержание флавоноидов в данном виде ЛРС не нормируется. По литературным данным [8-10], в плодах растения рода *Hippophaes* содержится целый комплекс биологически активных веществ (БАВ) флавоноидной природы (гиперозид, кверцитрин, рутин, астрагалин,

кемпферол-3-арабинозид, кемпферол-3-рамногликозид и др.). В литературе не были найдены данные по исследованию флавоноидов плодов облепихи методом ТСХ.

Целью настоящей работы являлась разработка методики идентификации и исследование флавоноидного состава плодов облепихи методом хроматографии в тонком слое сорбента, а также изучение влияния условий их хранения на стабильность флавоноидов.

Эксперимент

Объектом исследования служили плоды растения рода *Hippophaë*, собранные в Воронежской области согласно правилам заготовки ЛРС в нативном, высушенном и замороженном виде. Сушку плодов производили при температуре 80° до остаточной влажности не более 20%. Замораживание и хранение осуществляли в условиях морозильной камеры при $t = -18^{\circ}\text{C}$ градусов в течении 6 месяцев.

В ТСХ на процесс хроматографирования влияют существенным образом растворитель, сорбент и условия анализа. Поэтому на первом этапе работы были экспериментально выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования флавоноидов (на примере стандартного образца рутина) методом ТСХ.

Для визуальной оценки качества разделения хроматографическую пластину после проведения элюирования необходимо обработать каким-либо проявителем. Выбор проявителя (табл. 1) осуществляли с учетом таких требований как специфичность, чувствительность, доступность, высокое качество получаемой картины, а также контрастностью хроматографических зон и фона, что может позволить проводить дальнейший количественный анализ с применением сканирующих устройств [11].

Таблица 1. Характеристика детектирующих реагентов для определения рутина в тонком слое сорбента

№ п/п	Детектирующий реагент	Окрашивание хроматографических зон	
		в видимом свете	в УФ-свете
1	Без проявителя	Светло-желтое	Желто-коричневое
2	Пары аммиака	-	Красно-коричневое
3	5 % водный раствор NaOH	Желто-оранжевое	Желто-оранжевое
4	5 % спиртовый раствор AlCl_3	Светло-желтое	Красно-коричневое
5	10 % спиртовый раствор NaOH	Желто-оранжевое	Желто-коричневое
6	5 % спиртовый раствор ФМК	Сине-зеленое	-

В качестве реагентов для обнаружения пятен рутина были использованы: пары аммиака; 5 % спиртовый раствор AlCl_3 ; 5 % водный раствор NaOH; 5 % спиртовый раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК); 5 % спиртовый раствор NaOH. Впервые, в качестве проявителя, был выбран 10 % спиртовый раствор NaOH, который с рутином образует окрашенное в желто-оранжевый цвет соединение – халкон. Кроме того, обработанные этим реагентом хроматограммы не изменяют интенсивности окраски с течением времени. Этот детектирующий агент – высокочувствительный, специфичный и доступный. При исследовании сложных биологически активных веществ, к которым относятся и флавоноиды, оптимальные условия разделения подбираются экспериментально с учетом влияния различных

факторов: концентрации раствора, соотношения растворителей в элюенте, типа пластин для ТСХ и т.д.

Наибольшее влияние на разделения веществ в тонком слое сорбента оказывает растворитель [12]. Состав элюента играет важнейшую роль при проведении анализа методом ТСХ, так как различные растворители по-разному влияют на хроматографическую подвижность рутина. Было изучено двенадцать типов элюирующих систем с различными значениями полярности (табл. 2). В эксперименте исследовали системы, предложенные в литературе [1-6]. В работе использовались растворители и реактивы марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург).

На хроматограммах для каждой элюирующей системы были рассчитаны такие хроматографические параметры, как величина относительной скорости перемещения рутина (R_f); высота, эквивалентная теоретической тарелке (H); число теоретических тарелок (N) [12]. Данные табл. 2 показывают, что наибольшая эффективность хроматографического процесса, согласно значениям величин N и H, наблюдалась в системах № 2, 5, 7, 9 и 10, а наименьшая - в системах № 8 и 11. Параметры N и H взаимосвязаны между собой нелинейной обратно пропорциональной зависимостью. Оптимальные величины R_f достигнуты в системах № 7 и 8.

Таблица 2. Хроматографические параметры рутина в различных элюирующих системах при выделении из растительных объектов

№ п/п	Элюент	R_f	H, мм	N	P
1	Бензол-этанол-ледяная уксусная кислота (45:8:3)	0.13±0.01	2.50	29.6	3.49
2	н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:5)	0.70±0.01	0.46	153.2	6.68
3	Этилацетат-гексан-хлороформ-н-бутанол (40:30:20:10)	0.01±0.001	25.00	2.9	2.99
4	Этилацетат-этанол-вода (100:27:13)	0.20±0.01	13.10	5.6	4.91
5	Этилацетат-вода-ледяная уксусная кислота (10:10:40)	0.91±0.01	0.06	1304	6.35
6	Хлороформ-ацетон (50:40)	0.70±0.02	19.10	4.0	4.84
7	Этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (7,5:1,5:1,5)	0.46±0.01	0.71	100.8	5.24
8	Хлороформ-метанол-вода (26:14:3)	0.45±0.02	132.00	0.5	5.44
9	Ледяная уксусная кислота-вода (15:85)	0.99±0.01	0.05	1571	8.58
10	Ледяная уксусная кислота-вода (60:40)	0.90±0.01	0.12	631.2	7.32
11	Гексан-хлороформ (1:1)	0.01±0.001	64.00	1.0	2.20
12	Этилацетат-этанол-толуол (4:2:2)	0.11±0.01	4.00	19.0	4.08

Несмотря на то, что в системах № 5, 9 и 10 величины N имеют большее значение, чем в системах № 2 и 7, качество зон на хроматограммах значительно хуже, и, следовательно, затруднена их обработка. Хроматографирование можно проводить в системах № 2 и 7. Лучшее значение R_f и качество хроматографических зон было достигнуто в системе № 7. В данном элюенте зоны рутина имели округлую форму, что свидетельствует о линейной изотерме сорбции. Для количественной обработки хроматограмм методом компьютерного сканирования целесообразно применять

систему № 7. Нами также было установлено, что предел обнаружения с помощью выбранного детектирующего реагента в предлагаемой подвижной фазе составил $5 \cdot 10^{-7}$ г. Предел обнаружения рассчитывали как минимальное количество вещества, нанесенного на хроматографическую пластинку, определяемое визуально после элюирования и обработки детектирующим реагентом (1 мкл 0,05% раствора).

Рассчитав величину полярности подвижных фаз (P'), получали зависимость значения относительной подвижности рутина от полярности элюента (рис. 1). Полярность элюентов рассчитывали по известной формуле [12], используя значения полярностей отдельных растворителей, приведенные в литературе [13]. Вид кривой свидетельствует о том, что существуют интервалы полярности системы (от 0 до 3,0 и от 3,3 до 4,5), в которых величина R_f практически не меняется. В диапазоне от 0 до 3,0 при использовании нормально-фазового варианта ТСХ (силикагелевые пластинки) рутин прочно удерживается сорбентом, не перемещаясь с линии старта. При достижении полярности элюента 6,5 и более рутин перестает удерживаться сорбентом и перемещается с током подвижной фазы ($R_f \rightarrow 1$). Следовательно, наиболее оптимальные величины R_f (0,3-0,6) [12] можно получить при использовании систем с узким интервалом полярности от 5,0 до 6,0 единиц.

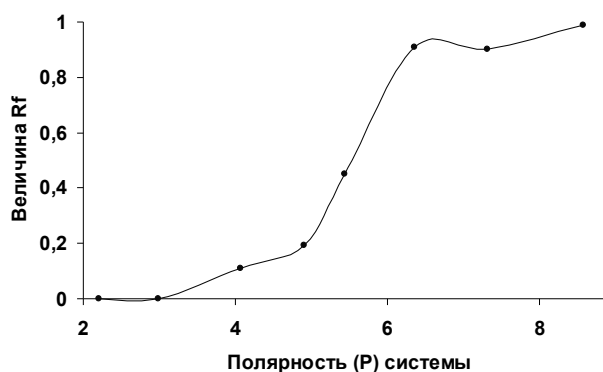


Рис. 1. Зависимость значения относительной подвижности рутина от полярности элюента

При более детальном изучении влияния полярности системы на величину R_f в диапазоне от 4,0 до 7,0 ед., был выбран интервал значений P' элюента, в котором данная зависимость становится линейной (от 4,9 до 6,4 ед. полярности системы) (рис. 2). Проведена статистическая оценка параметров линейной зависимости путем расчета величины коэффициента корреляции (R^2). Уравнение линейной зависимости приведено на рис. 2. С помощью предложенной зависимости можно подбирать различные системы для определения рутина в тонком слое сорбента, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения. Таким образом, интервал полярностей элюента может варьировать от 5,06 до 5,69 ед.

Таким образом, по совокупности полученных результатов были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования рутина в тонком слое сорбента: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» 5x10 см с полимерной подложкой ПТСХ-П-А-УФ; элюент – этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (7,5:1,5:1,5); проявитель – 10 % спиртовой раствор NaOH; оптимальный объем пробы – 3 мкл спиртового раствора с содержанием рутина 2 мг/мл; время насыщения камеры парами элюента – 20 мин; время элюирования – 35 мин; время выдерживания пластинки в термостате при $t \geq 80$ °C – 3-5 мин; чувствительность методики $5 \cdot 10^{-7}$ г.

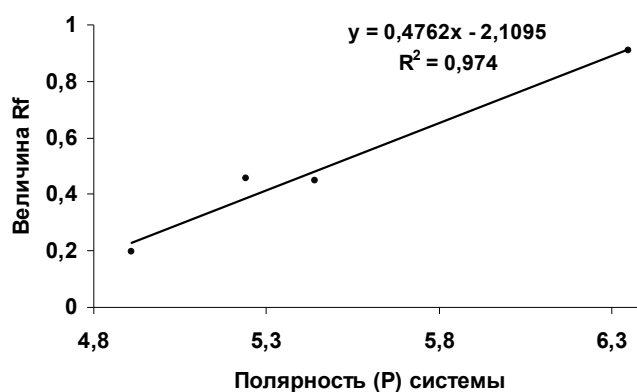


Рис. 2. Линейная зависимость величины R_f от значения полярности элюента

На втором этапе работы, разработанную методику апробировали на извлечении из плодов облепихи, которое наносили на стартовую линию хроматографической пластинки в количестве 30, 40, 70 и 100 мкл (рис. 3). Извлечение готовили путем нагревания сырья с экстрагентом (70% этанол) в соотношении 1:30 на водяной бане в течение 45 минут. Одновременно на пластинку наносили растворы стандартных образцов рутина, кверцетина и β -каротина (рис. 3). Вид хроматограммы извлечения из плодов облепихи после проявления 10 % спиртовым раствором NaOH представлен на рис. 3.

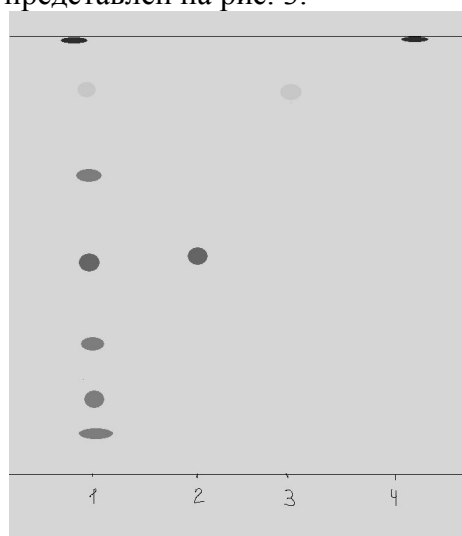


Рис. 3. (точка 1 – 100 мкл извлечения; точка 2 – 5 мкл 0,1 % стандартного раствора рутина; точка 3 – 3 мкл 0,1 % стандартного раствора кверцетина; точка 4 – 10 мкл 0,1 % стандартного раствора β -каротина)

Обсуждение результатов

Оптимальный объем пробы составил 100 мкл. На хроматограммах извлечения из свежих плодов облепихи (табл. 3) при нанесении 70 и 100 мкл пробы наблюдали 7 зон, (R_f составило 0,08; 0,19; 0,32; 0,53; 0,64; 0,8; 0,99).

Неидентифицированные зоны предположительно относятся к флавоноидам, так как имеют характерное свечение в УФ-свете, свойственное для флавоноидов [8-10]. При нанесении 30 и 40 мкл извлечения детектировалось пять

хроматографических зон. Следует отметить, что зоны на хроматограммах имели нечёткий вид, что затрудняет их дальнейшую обработку. При сравнении величин R_f полученных хроматографических зон со стандартными образцами, были идентифицированы на хроматограмме извлечения рутин ($R_f=0,53\pm0,02$), кверцетин ($R_f=0,8\pm0,02$) и β -каротин ($R_f=0,99\pm0,01$). Результаты идентификации хроматографических зон на хроматограмме извлечения из плодов облепихи представлены в таблице 3.

Таблица 3. Идентификация хроматографических зон на хроматограмме извлечения из плодов облепихи свежих

№ п/п	Объем наносимой пробы, мкл	Значение R_f зон на хроматограмме извлечения из плодов шиповника			
		неидентифицированные зоны	рутин	кверцетин	β -каротин
1	30	0.13±0.02; 0.24±0.02; 0.40±0.02; 0.63±0.02; 0.76±0.02	-	-	-
2	40				
3	70	0.08±0.02; 0.19±0.02; 0.32±0.02; 0.64±0.02	0.54±0.02	0.80±0.02	0.99±0.01
4	100				

Для каждой хроматографической зоны на хроматограмме были рассчитаны величины селективности сорбции (L) и коэффициент распределения (K) (табл. 4). Результаты свидетельствуют об удовлетворительном разделении хроматографических зон флавоноидов на хроматограмме и правомерности использования данной методики.

На хроматограмме извлечения из высушенных плодов облепихи не наблюдали разделения хроматографических зон флавоноидов, что можно объяснить процессами окисления при повышенных температурах и контакте сырья с кислородом воздуха во время сушки.

На хроматограмме извлечения из замороженных плодов облепихи через 3 и 6 месяцев хранения (табл. 5) при нанесении 100 мкл пробы наблюдали 6 зон.

Данные табл. 5 свидетельствуют о снижении содержания флавоноидов в плодах при хранении в условиях заморозки. Однако, возможно дальнейшее использование таких плодов для получения лекарственных препаратов на их основе, так как сохраняются такие важнейшие представители класса флавоноидов как рутин, кверцетин, 3 неидентифицированных флавоноида, а также β -каротин.

Таблица 4. Параметры хроматографического разделения зон на хроматограмме из плодов облепихи свежих (рис. 3)

№п/п	№ зоны	K	$L = K_1/K_2$
1	1 – неидентифицированная зона	11.50	2.67 2.02 2.40 1.58 2.25 25
2	2 – неидентифицированная зона	4.30	
3	3 – неидентифицированная зона	2.13	
4	4 – рутин	0.89	
5	5 – неидентифицированная зона	0.563	
6	6 – кверцетин	0.25	
7	7 – β -каротин	0.01	

Таблица 5. Идентификация хроматографических зон на хроматограмме извлечения из плодов облепихи замороженных

№ п/п	Время хранения, мес.	Значение R _f зон на хроматограмме извлечения из плодов облепихи замороженных			
		неидентифицированные зоны	рутин	кверцетин	β-каротин
1	3	0.16±0.02; 0.38±0.02; 0.67±0.02	0.53±0.02	0.76±0.02	0.98±0.01
2	6		0.53±0.02	0.80±0.02	0.99±0.01

Заключение

Таким образом, по данным хроматографического анализа, в плодах облепихи содержатся флавоноиды, два из которых являются рутином и кверцетином, что свидетельствует о перспективности использования плодов облепихи в практической медицине не только в качестве источника жирного масла, но и в качестве сырья – дополнительного источника флавоноидов, как в свежем виде, так и через 6 месяцев хранения в условиях морозильной камеры.

Список литературы

1. Саушкина А.С., Карпенко В.А., Савченко Л.Н., Муравьева Д.А. Использование ТСХ для идентификации биологически активных веществ в некоторых видах лекарственного сырья // Сорбционные и хроматографические процессы. 2001. Т.1. Вып. 5. С. 902-905.
2. Бубенчикова В.Н., Дроздова И.Л. Разработка показателей качества листьев земляники лесной // Фармация. 2002. № 6. С. 16-18.
3. Самылина И.А., Терешина Н.С. Сравнительное изучение настоек календулы // Фармация. 2005. № 6. С. 6-8.
4. Слуева Е.К., Жукович Е.Н., Шарикова Л.А. и др. Оценка содержания суммы флавоноидов в настойке календулы // Фармация. 2003. № 1. С. 13-15.
5. Шарова О.В., Куркин В.А. Флавоноиды цветков календулы лекарственной // Химия растит. сырья. 2007. № 1. С. 65-68.
6. Кочергина Н.В. Изучение флавоноидного состава аллопатических и гомеопатических препаратов ромашки аптечной методом тонкослойной хроматографии // VIII конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск. 2007. С. 228-229.
7. Богачева Н.Г., Кокушкина Н.П., Сокольская Т.А. Стандартизация лекарственного сырья облепихи крушиновидной // Фармация. 2001. №1. С. 27-29.
8. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Быков В.А. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал // Москва. 2006. 236 с.
9. Корулькин Д.Ю., Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстикова. Природные флавоноиды // Новосибирск: Академическое изд-во «Гео». 2007. 232 с.
10. Биологически активные вещества лекарственных растений / Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. // Новосиб.: Наука, 1990. 333 с.
11. Березкин В.Г., Бочков Н.С. Количественная тонкослойная хроматография // М.: Наука, 1980. 183 с.
12. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии // М.: Мир, 1999. 405 с.

13. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии // Воронеж: «Водолей», 2004. 528 с.

Тринеева Ольга Валерьевна – к.ф.н., ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сафонова Ирина Игоревна – студентка фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сафонова Елена Федоровна – к.х.н., доцент, заведующая кафедрой фармации последипломного образования ВГУ, Воронеж

Сливкин Алексей Иванович – д.ф.н., проф., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Trineeva Olga V. – the candidate pharm. sciences, the assistant to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh, e-mail: lelik83@list.ru

Safonova Irina I. – student of pharmaceutical faculty of VGU, Voronezh

Safonova Elena F. – the candidate chem. sciences, the senior lecturer, manager of chair of pharmacy of post-degree formation of VGU, Voronezh

Slivkin Alexey I. – the doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh