

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого

Н.А. Рябов, В.М. Рыжов

Самарский государственный медицинский университет,
Российская Федерация, 443099, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Рябов Николай Анатольевич – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ) Тел.: +7 (987) 973-80-37. E-mail: ryabov.nikolay.2014@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-1332-953X*

Рыжов Виталий Михайлович – доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (964) 986-87-59. E-mail: lavr_rvm@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-8399-9328*

РЕЗЮМЕ

Введение. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) представитель семейства буковые (*Fagaceae*) является лекарственным растением. В качестве сырья применяется кора молодых деревьев, обладающая вяжущими и противовоспалительными свойствами за счет наличия в сырье дубильных веществ. Представляют интерес и другие органы растения, в частности, листья дуба. Проведенное предварительное фитохимическое исследование показало наличие в них помимо дубильных веществ соединений флавоноидной природы.

Цель исследования: разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого.

Материал и методы. Объект исследования – листья дуба черешчатого, заготовленные в июне – августе 2019 г. в Покхвистневском районе Самарской области. Для разработки методики применяли прямую и дифференциальную спектрофотометрию.

Результаты. Определены оптимальные условия для количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого: экстрагент – 80% этиловый спирт; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50; время экстракции – 30 мин, степень измельчения сырья – 2 мм. Валидационные исследования показали валидность разработанной методики.

Заключение. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 412 нм в пересчете на стандартный образец (СО) – рутин. Содержание суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого колеблется от 0,30% до 1,63%.

Ключевые слова: дуб черешчатый, *Quercus robur* L., листья, стандартизация, флавоноиды, рутин, спектрофотометрия.

Для цитирования: Рябов Н.А., Рыжов В.М. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого. Фармация, 2021; 70 (2): 24–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-02-04>

PROCEDURE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF FLAVONOIDS IN PEDUNCULATE OAK (*QUERCUS ROBUR*) LEAVES

N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov

Samara State Medical University, 89, Chapayevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ryabov Nikolay Anatol'evich – Post graduate student of the Department of Pharmacognosy with Botany and the basics of Phytotherapy of the Samara State Medical University (SamSMU) Tel.: +7 (987) 973-80-37. E-mail: ryabov.nikolay.2014@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-1332-953X*

Ryzhov Vitaliy Mirhaylovich – Associate Professor of the Department of Pharmacognosy with Botany and the basics of Phytotherapy of the SamSMU, PhD. Tel.: +7 (964) 986-87-59. E-mail: lavr_rvm@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-8399-9328*

SUMMARY

Introduction. Pedunculate oak (*Quercus robur* L.), a member of the beech (*Fagaceae*) family, is a medicinal plant. Young tree bark that has astringent and anti-inflammatory properties due to tannins present in the raw material is used as raw material. Other plant organs, oak leaves in particular, are also of interest. The preliminary phytochemical study has shown that they contain flavonoid compounds in addition to tannins.

Objective: to develop a procedure for quantitative determination of the amount of flavonoids in the pedunculate oak leaves.

Material and methods. The investigation object was pedunculate oak leaves harvested in the Pokhvistnevsky District (Samara Region) in June-August 2019. Direct and differential spectrophotometry was used to develop the procedure.

Results. The investigators determined optimal conditions for the quantitative determination of the amount of flavonoids in the pedunculate oak leaves: the extractant was 80% ethyl alcohol; the raw material-extractant ratio was 1:50; the extraction time was 30 minutes, the degree of raw material grinding was 2 mm. Validation studies revealed the validity of the developed procedure.

Conclusion. The procedure has been developed for the quantitative determination of the amount of flavonoids in the pedunculate oak leaves calculated with reference to rutin, by using the differential spectrophotometric method at an analytical wavelength of 412 nm. The total flavonoid content in the pedunculate oak leaves ranges from 0.30 to 1.63%.

Key words: pedunculate oak, *Quercus robur* L., leaves, standardization, flavonoids, rutin, spectrophotometry.

For reference: Ryabov N.A., Ryzhov V.M. Procedure for quantitative determination of the amount of flavonoids in pedunculate oak (*Quercus robur*) leaves. *Farmatsiya*, 2021; 70 (2): 24–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-02-04>

Введение

Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) – широко распространенное на территории Российской Федерации растение семейства буковых (*Fagaceae*) [1–4]. В современной медицинской практике применяется кора молодых деревьев, обладающая вяжущими и противовоспалительными свойствами за счет наличия в сырье дубильных веществ. Помимо дубильных веществ в коре дуба обнаружены вещества флавоноидной природы, такие как кверцитрин, лейкоантоцианидин и др. [1, 4–6].

Представляют интерес листья растения. Проведенное предварительное фитохимическое исследование показало наличие в них помимо дубильных веществ соединений флавоноидной природы. Такое сочетание биологически активных веществ представляет интерес с точки зрения получения новых лекарственных растительных препаратов [1, 4–6]. На сегодняшний день листья дуба черешчатого не являются фармакопейным сырьем и об их химическом составе информации мало.

Для дальнейшего изучения этого перспективного вида лекарственного растительного сырья необходимо проведение комплекса фармакогностических исследований, в частности, проведение фитохимического анализа в отношении веществ флавоноидной природы.

Цель исследования: разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого.

Материал и методы

Объектом исследования служили листья дуба черешчатого, заготовленные в июне – августе 2019 г. в селе Первомайск Похвистневского района Самарской области. Для разработки методики количественного определения суммы флавоноидов применяли прямую и дифференциальную спектрофотометрию с использованием спектрофотометра – «СФ-2000» (Россия) в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Результаты и обсуждение

Эксперимент проводили с водно-спиртовыми извлечениями из листьев дуба черешчатого. Спектрофотометрическое исследование позволило выявить, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого наблюдался батохромный сдвиг коротковолновой и длинноволновой полосы, характерный для веществ группы флавоноидов (рис. 1, 2) [6]. Это позволяет утверждать, что в исследуемом объекте присутствуют флавоноиды. Установлено, что раствор рутина в присутствии алюминия хлорида имеет схожий с исследуемым объектом максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 3). Поэтому рутин был выбран в качестве стандартного образца [1, 6, 7].

На следующем этапе были подобраны условия для количественного определения флавоноидов в листьях дуба черешчатого: концентрация спирта этилового, соотношение «сырье-экстра-

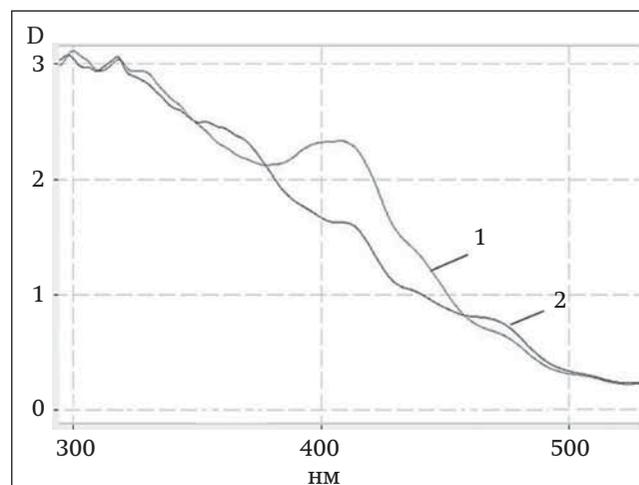


Рис. 1. Спектральные кривые поглощения растворов водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого

Примечание. 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида.

Fig. 1. Spectral absorption curves for solutions of water-alcohol extraction from pedunculate oak leaves

Note: 1 – extraction solution; 2 – extraction solution with the addition of aluminum chloride.

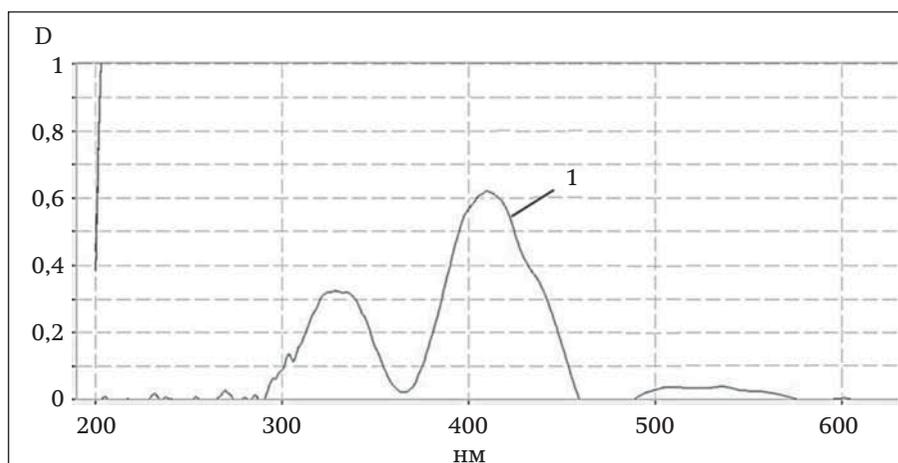


Рис. 2. Спектральная кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого (1 – дифференциальный спектр)
Fig. 2. Spectral absorption curves for a solution of water-alcohol extraction from pedunculate oak leaves (1 – differential spectrum)

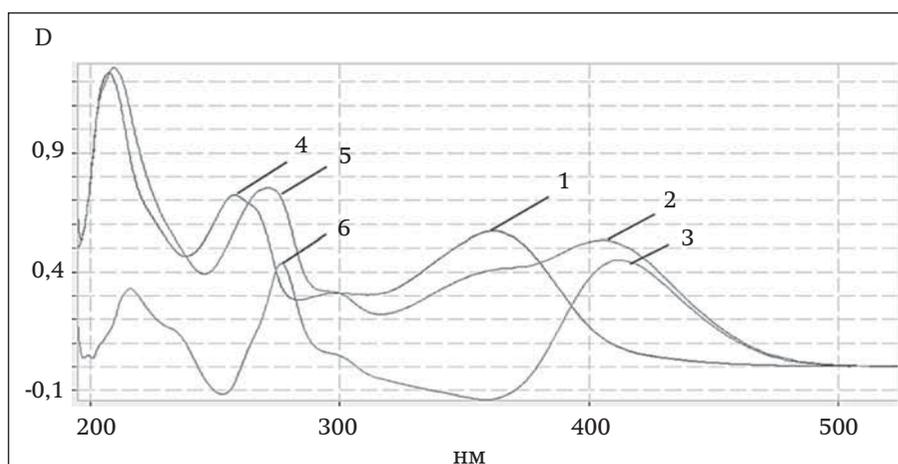


Рис. 3. Спектральные кривые поглощения водно-спиртовых растворов рутина
Примечание. 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида; 3 – дифференциальная кривая; 1, 2, 3 и 4, 5, 6 – характерный для рутина bathochromic сдвиг коротковолновой и длинноволновой полосы флавоноидов соответственно.

Fig. 3. Spectral absorption curves for water-alcohol solutions of rutin
Note. 1 – stock solution; 2 – solution with the addition of aluminum chloride; 3 – differential curve; 1, 2, 3 and 4, 5, 6 – a rutin-characteristic bathochromic shift in the short- and long-wavelength bands of flavonoids, respectively.

гент», степень измельчения сырья, время экстрагирования (табл. 1). Установлено, что оптимальными условиями являются: экстрагент – 80% этиловый спирт, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50, степень измельчения сырья – 2 мм, время экстракции – 30 мин.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверсти-

ями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 80% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор А).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 мин после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 2 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность раствора СО рутина; m – масса сырья, г; m₀ – масса СО рутина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия СО рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 240.

$$x = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 240 \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 240 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) СО рутина при 412 нм; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Приготовление раствора стандартного образца рутин. Около 0,0207 г (точная навеска) СО рутин помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А рутин). 1 мл раствора А рутин помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б рутин). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 412 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А рутин помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (раствор сравнения Б рутин).

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого с до-

верительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,0\%$ (табл. 2).

Валидационная оценка разработанной методики была проведена по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев дуба черешчатого и рутин с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутин (с концентрациями в диапазоне от 0,00880 до 0,03520 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,98953. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора рутин с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к

Таблица 1

Оптимальные показатели экстрагирования суммы флавоноидов из листьев дуба черешчатого

Table 1

Optimal indicators for extracting the amount of flavonoids from pedunculate oak leaves

№	Концентрация экстрагента – этилового спирта, %	Соотношение сырья : экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельчения сырья, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
1	40	1:50	60	2	0,96±0,11
2	50				1,01±0,11
3	60				1,10±0,12
4	70				1,16±0,13
5	80				1,20±0,13
6	90				1,17±0,13
7	96				1,16±0,13
8	80	1:50	15	2	1,20±0,13
9			30		1,30±0,14
10			45		1,18±0,13
11			60		0,95±0,10
12			90		0,96±0,11
13			120		0,96±0,11
14			1:20		30
15	1:30	0,88±0,10			
16	1:50	1,08±0,12			
17	80	1:50	30	1	1,44±0,16
18				2	1,63 ±0,18
19				3	1,44±0,16

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого

Metrological characteristics of procedure for quantitative determination of the amount of flavonoids in the pedunculate oak leaves

f	\bar{X}	S ²	S	P, %	t (P, f)	±X	E, %
19	1,1106	0,075329578	0,2745	95	2,110	±0,1232	±5,0

испытуемому раствору. Средний процент восстановления составил 98%.

С использованием разработанной методики было определено содержание суммы флавоноидов в образцах листьев дуба черешчатого, которое колебалось от 0,30 до 1,63% (среднее значение – 1,11%).

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность дальнейшего изучения листьев дуба черешчатого как нового вида лекарственного растительного сырья.

Заключение

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием СО рутин при аналитической длине волны 412 нм. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет ±5,0%.

Данные о содержании суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого позволяют говорить о них, как о перспективном лекарственном растительном сырье с относительно высоким содержанием флавоноидов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Том IV. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

Таблица 2

2. Кароматов И.Д., Махмудова Г.Ф. Кизи. Дуб обыкновенный – применение в лечебной практике. Биология и интегративная медицина. 2016; 3: 41–7.

3. Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. М.: Издательство профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009; 183–4.

4. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: «Офорт», СамГМУ, 2019; 966–9.

5. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 1. Семейства *Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae*. С-Пб., М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009; 158.

6. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара: СамГМУ, «Офорт», 2012; 290.

7. Куприянова Е.А., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации листьев тополя черного. Аспирантский вестник Поволжья. 2018; 5 (6): 17–21. DOI: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.17-21

References

1. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV-ed. [Electronic resource]. Access mode: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (in Russian).

2. Karomatov I.D., Makhmudova G.F. Kesey. *Quercus robur* – use in medical practice. *Biologiya i intergal'naya meditsina*. 2016; 3: 41–7 (in Russian).

3. Kiseleva T.L., Smirnova Yu.A. Medicinal plants in world medical practice: state regulation of the nomenclature and quality. Moscow: Izdatel'stvo professional'noy assotsiatsii naturoterapevtov, 2009; 183–4 (in Russian).

4. Kurkin V.A. Pharmacognosy. Samara: «Ofort», 2019; 966–9 (in Russian).

5. Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component, composition and biological activity. Vol. 2. Families of *Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae*. Saint-Petersburg, Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2009; 513 (in Russian).

6. Kurkina AV. Flavonoids of pharmacopeia plants. Samara: SamGMU, «Ofort», 2012; 290 (in Russian).

7. Kupriyanova E.A., Kurkin V.A. Development of approaches to the standardization of black poplar leaves. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2018; 5 (6): 17–21. DOI: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.17-21 (in Russian).

Поступила 29 ноября 2020г.

Received 29 November 2020

Принята к публикации 20 февраля 2021 г.

Accepted 20 February 2021