



УДК 615.19.072

Исследование профиля флавоноидов плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии

© 2019 Тринеева О.В., Рудая М.А., Сливкин А.И.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2020.20/2382

Перспективным источником биофлавоноидов являются плоды облепихи крушиновидной (ОК) (*Hipporhae rhamnoides* L.). Согласно литературным данным, в плодах выявлено наличие таких флавоноидов, как кверцетин, кемпферол, гесперидин, рутин, гиперозид, изорамнетин, мирицетин, цитрин, катехин и другие. В настоящее время стандартизация данного растительного сырья проводится по содержанию каротиноидов, в то время как классу полифенольных соединений уделено недостаточное внимание. В связи с вышесказанным целью настоящей работы являлось исследование состава различных групп флавоноидов плодов ОК различных сортов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Экспериментально подобраны и теоретически обоснованы оптимальные условия для хроматографического разделения зон флавоноидов плодов ОК. Впервые получен и частично идентифицирован ТСХ-профиль флавоноидов плодов 10 различных изученных сортов вида ОК. Наибольшее количество зон флавоноидов наблюдается у сорта «Рябиновая» (13 зон), наименьшее - у сортов «Столичная» и «Трофимовская» (по 10 зон), из которых идентифицированы рутин и кверцетин. Выявлены зоны, присутствующие на хроматограммах всех изучаемых сортов, а, следовательно, они могут характеризоваться, как зоны-маркеры вида. Установлено наличие или отсутствие уникальных зон-маркеров исследованных сортов ОК («Рябиновая», «Ботаническая ароматная», «Столичная», «Трофимовская», «Нивелена» и «Ботаническая»). ТСХ-профиль флавоноидов плодов ОК позволяет предположительно провести идентификацию сорта методом «отпечатков пальцев».

Ключевые слова: плоды облепихи крушиновидной различных сортов, тонкослойная хроматография, флавоноиды.

Введение

Современных исследователей в последние годы все больше привлекает растительное сырье в виду относительной безопасности, эффективности, доступности и постоянном возобновлении. Одним из важнейших компонентов комплекса биологически активных веществ (БАВ) являются флавоноиды. Данные БАВ принимают участие в окислительно-восстановительных процессах, включая защиту клеток от воздействия ультрафиолетовых лучей. На организм человека флавоноиды могут оказывать антиоксидантное, противовоспалительное, противовирусное, противоопухолевое действие, влиять на обмен веществ. В организме животных и человека данная группа соединений не синтезируется, их поступление в клетки полностью обусловлено потреблением растительной пищи.

Перспективным источником данных соединений являются плоды облепихи крушиновидной (ОК) (*Hipporhae rhamnoides* L.). Данное растение содержит обширный комплекс БАВ и ценится как в официальной, так и в народной медицине. Плоды ОК издавна использовались для лечения ишемических заболеваний, а также нару-

шений кровообращения [1]. Согласно литературным данным, в плодах выявлено наличие таких флавоноидов, как кверцетин, кемпферол, гесперидин, рутин, гиперозид, изорамнетин, мирицетин, цитрин, катехин и другие [2-4]. Экстракты плодов ОК действуют как иммуномодулирующее, антистрессовое, противораковое, ранозаживляющее средство [5]. Установлено, что флавоноиды плодов ОК могут способствовать снижению массы тела, уровня холестерина и глюкозы в организме человека, поэтому они активно используются для лечения заболеваний сердца [6-10].

В настоящее время стандартизация данного растительного сырья проводится по содержанию каротиноидов [11], в то время как классу полифенольных соединений уделено недостаточное внимание. К заготовке допускаются плоды всех сортов вида ОК, однако, содержание в них различных групп БАВ, как свидетельствуют многочисленные исследования, достаточно вариабельно. В нормативную документацию (НД) на объекты фармацевтического назначения, в частности лекарственное растительное сырье (ЛРС), все чаще включают экспресс-методы оценки подлинности и доброкачественности такие, как тонкослойная хроматография (ТСХ). Изучаемое ЛРС стандартизируется до настоящего момента по устаревшей НД 80-х гг прошлого столетия: временной фармакопейной статье (ВФС 42-1741-87) и ТУ 64-472-88 [3], в которой ТСХ не использована для оценки качества плодов. Плоды являются источником жирного масла, на основе которого получают лекарственные препараты, а значит, обновление фармакопейных статей (ФС) должно проводиться каждые 5 лет и включаться в новые выпуски Государственной фармакопеи (ГФ). Тем не менее, ФС на плоды ОК в ГФ с X (1968 г) по XIV (2018 г) издания не представлены. Не обнаружена информация на данный вид сырья и в ведущих зарубежных фармакопеях. Таким образом, исследования по разработке подходов к экспресс-определению подлинности и сортовой принадлежности плодов ОК методом «отпечатков пальцев» по ТСХ-профилю следует считать актуальными.

Цель настоящей работы – исследование состава различных групп флавоноидов плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Эксперимент

Объектом исследования являлись высушенные плоды ОК различных сортов («Столичная», «Галерит», «Рябиновая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая», «Трофимовская», «Студенческая», «Ботаническая ароматная», «Краснокарминовая», «Нивелена»), заготовленные на территории Ботанического сада биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет» им. М.В. Ломоносова в сентябре 2018 года согласно правилам заготовки ЛРС данной морфологической группы. Сушку плодов производили при температуре 60°C до остаточной влажности не более 14%.

Извлечение из плодов было получено по методике [11] путем нагревания точной навески высушенного измельченного сырья с 70% спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент 1:10. Для хроматографирования использовались пластины Silica gel 60 F₂₅₄ на алюминиевой подложке (Германия) размером 10×10 см. В качестве элюента была использована ранее подобранная система [11-13] этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (7.5:1.5:1.5). Для идентификации полученных зон в видимом и УФ-свете был использован 10% спиртовой раствор NaOH [11-13]. В описанных выше условиях, осуществляли хроматографирование также 3 мкл 1% стандартных спиртовых растворов рутина, кверцетина и гиперозида (степень чистоты не менее 99%; ЗАО «Вектон», СПб, Россия). Пробы на пластинки наносили с помощью

микрошприца объемом 10 мкл (МШ – 10, Россия). Для приготовления элюента использовали растворители марки х.ч. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

Обсуждение результатов

На рис. 1 представлены хроматограммы извлечения из высушенных плодов ОК (на примере сорта «Галерит»). При просмотре в УФ-свете при 365 нм наблюдается 9 хроматографических флюоресцирующих зон на темном фоне. После проявления пластины при просмотре в УФ-свете наблюдается 11 зон (табл. 1). Оптимальный объем пробы составил 7 мкл извлечения. Полученный вид хроматограммы извлечения из десяти различных сортов плодов ОК до и после проявления 10% спиртовым раствором NaOH представлен на рис. 2. Результаты изучения ТСХ-профиля флавоноидов плодов ОК различных сортов, полученное в УФ-свете после проявления 10% спиртовым раствором NaOH, представлены в табл. 2.

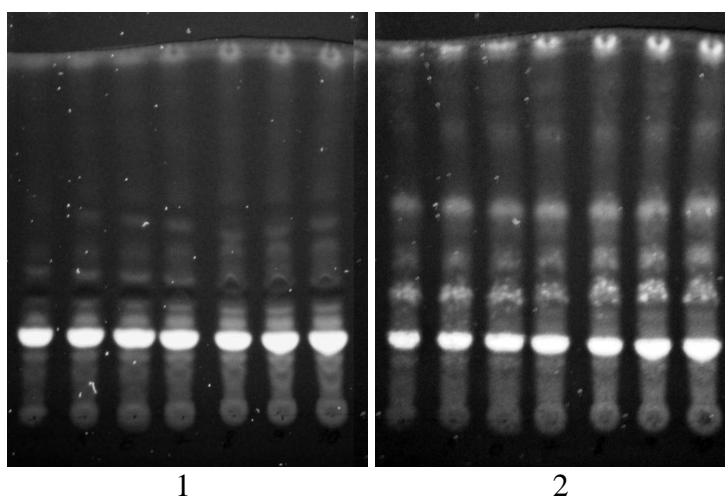


Рис. 1. Вид хроматограммы извлечения из высушенных плодов ОК (на примере сорта «Галерит») при просмотре в УФ-свете (1-без проявления, 2 – после проявления 10% спиртовым раствором NaOH)

Таблица 1. Результаты изучения ТСХ-профиля флавоноидов плодов ОК (на примере сорта «Галерит»)

Полученные зоны	Величина $R_f \pm 0.02$	Величина R_s	K	$L=K_1/K_2$
1	0.15	0.27	5.67	1.42
2	0.20	0.36	4.00	1.26
3	0.24	0.43	3.17	1.17
4	0.27	0.48	2.70	1.27
5	0.32	0.57	2.13	1.54
6	0.42	0.75	1.38	1.75
7 (рутин)	0.56	1.00	0.79	2.63
8 (кверцетин)	0.77	1.38	0.30	2.00
9	0.87	1.55	0.15	3.75
10	0.96	1.71	0.04	2.00
11	0.98	1.75	0.02	

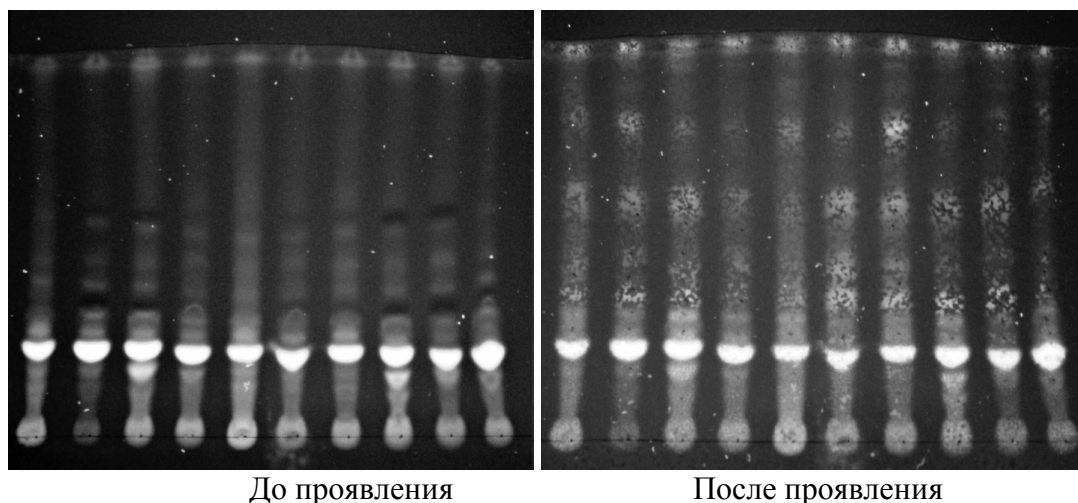


Рис. 2. Вид хроматограммы извлечения из высушенных плодов ОК различных сортов в УФ-свете до и после проявления 10% спиртовым раствором NaOH (слева направо: «Столичная», «Галерит», «Рябиновая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая», «Трофимовская», «Студенческая», «Ботаническая ароматная», «Краснокарминовая», «Нивелена»)

Таблица 2. Результаты изучения ТСХ-профиля флавоноидов плодов ОК различных сортов

№ п/п	Наименование сорта	Зоны на хроматограммах ($R_f \pm 0.02$)															
		3															
1	2	3															
1	Столичная	-	-	0.21	0.25	-	0.31	0.35	0.42	0.52	-	-	0.78	0.88	-	0.96	0.98
2	Галерит	-	0.17	0.21	0.26	-	0.30	0.34	0.44	-	0.57	-	0.77	0.86	0.93	0.95	0.97
3	Рябиновая	0.10	0.16	0.21	0.25	-	0.30	0.33	0.43	-	0.57	-	0.76	0.87	0.91	0.95	0.98
4	Ботаническая любительская	-	0.15	0.20	0.25	-	0.30	0.34	0.42	-	0.57	-	0.75	0.85	0.91	0.96	0.98
5	Ботаническая	-	-	0.20	0.25	0.27	0.31	-	0.42	-	0.55	0.73	-	0.85	0.92	0.95	0.98
6	Трофимовская	-	-	0.18	0.24	0.27	0.32	-	0.42	-	0.56	-	0.75	0.86	-	0.95	0.99

1	2	3															
7	Студенческая	-	-	0.20	0.24	0.29	-	0.33	0.42	-	0.55	-	0.75	0.86	0.94	0.96	0.98
8	Ботаническая ароматная	0.11	0.15	0.20	0.24	-	-	0.33	0.41	-	0.57	-	0.77	0.87	-	0.96	0.98
9	Краснокарминовая	-	0.15	0.19	0.24	0.29	-	0.34	0.44	-	0.56	-	0.78	0.88	-	0.96	0.98
10	Нивелена	-	0.15	0.20	0.25	-	-	0.35	0.43	0.54	-	-	0.78	0.87	-	0.96	0.98

Для идентификации полученных зон были использованы литературные данные, а также достоверные стандартные образцы флавоноидов, которые свидетельствуют, что в плодах изученных сортов присутствует рутин (0.54 ± 0.02) и кверцетин (0.78 ± 0.02). Оставшиеся неидентифицированные зоны имеют характерное свечение в УФ-свете, поэтому также предположительно относятся к флавоноидам.

Полученные данные использованы для расчета основных параметров эффективности хроматографического процесса в тонком слое сорбента, таких как величины (R_f и R_s); коэффициент распределения (K); значение селективности сорбции (L) (табл. 1). Расчет проводили по известным формулам [14-16].

На экспериментально определяемые значения R_f заметно влияют условия хроматографирования. Для надежной идентификации флавоноидов необходимо проводить сравнение величин R_f со стандартными образцами, что не всегда возможно ввиду высокой стоимости последних и лабильности веществ группы флавоноидов под действием факторов внешней среды. Более точной оценкой хроматографической подвижности, мало чувствительной к влиянию случайных отклонений в условиях проведения эксперимента, является величина R_s , представляющая собой отношение величины R_f одного вещества к величине R_f другого вещества, принятого за стандарт [17]. В табл. 1 представлены значения величин R_s для флавоноидов, выявленных на хроматограммах изучаемых плодов. В качестве стандарта был принят рутин.

В использованной элюирующей системе наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон флавоноидов, так как значение селективности сорбции больше единицы (табл. 1).

Наибольшее количество разделенных зон наблюдается у сорта «Рябиновая» (13 зон), минимальное – у сортов «Столичная» и «Трофимовская» (по 10 зон). Следует отметить, что зоны со значениями $R_f = 0.20 \pm 0.02$; 0.25 ± 0.01 ; 0.42 ± 0.02 ; 0.86 ± 0.02 ; 0.95 ± 0.01 и 0.98 ± 0.01 присутствовали на хроматограммах всех изучаемых сортов, а, следовательно, они могут характеризоваться, как зоны-маркеры вида (их наличие на пластинах можно включать в НД в качестве критерия подлинности данного ЛРС). Зоны-маркеры исследованных сортов ОК также установлены («Рябиновая» и «Ботаническая ароматная» – 0.10 ± 0.01 ; «Столичная» и «Нивелена» – 0.53 ± 0.01 ; «Ботаническая» – 0.73 ± 0.01). Также уникальностью хроматографического профиля сорта может являться отсутствие какой-либо зоны («Ботаническая» и «Трофимовская» от-

существует зона 0.34 ± 0.02 ; «Столичная» и «Нивелена» – 0.56 ± 0.01 ; «Ботаническая» – 0.76 ± 0.02).

Заключение

Таким образом, экспериментально подобраны и теоретически обоснованы оптимальные условия для хроматографического разделения зон флавоноидов плодов ОК. Впервые получен и частично идентифицирован ТСХ-профиль флавоноидов плодов 10 различных изученных сортов вида ОК. Наибольшее количество зон флавоноидов наблюдается у сорта «Рябиновая» (13 зон), наименьшее – у сортов «Столичная» и «Трофимовская» (по 10 зон), из которых идентифицированы рутин и кверцетин. Выявлены зоны, присутствующие на хроматограммах всех изучаемых сортов, а, следовательно, они могут характеризоваться, как зоны-маркеры вида (их наличие на пластинах можно включать в НД в качестве критерия подлинности данного ЛРС). Установлено наличие или отсутствие уникальных зон-маркеров исследованных сортов ОК («Рябиновая», «Ботаническая ароматная», «Столичная», «Трофимовская», «Нивелена» и «Ботаническая»). ТСХ-профиль флавоноидов плодов ОК позволяет предположительно провести идентификацию сорта методом «отпечатков пальцев». Однако требует использования других высокоточных подтверждающих методов (например, ВЭЖХ-МС) для однозначного установления сортовой принадлежности.

Список литературы

1. Тараховский Ю.С. и др. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronbook, 2013, 310 с.
2. Тринеева О.В., Перова И.Б., Сливкин А.И., Эллер К.И. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017. Т. 17. № 1. С. 87-93.
3. Тринеева О.В. Автореферат дис. доктора фармацевтических наук. М. 2017. 48 с.
4. Mendelova A. et al. // *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2016. Vol. 10. No 1. pp. 59-64.
5. Suryakumar G., Gupta A. // *Journal of ethnopharmacology*. 2011. Vol. 138(2). pp. 268-278.
6. Wang J. et al. // *Journal of the science of food and agriculture*. 2011. Vol. 91(8). pp. 1446-1451.
7. Singh B., Peter K. // *New Age Herbals*. 2018. pp. 29-54.
8. Скалий Л.П. Облепиха: Пособие для садоводов-любителей. М. Ниола-Пресс. ЮНИОН-паблик. 2007. 240 с.
9. Yang, B., Kallio H. // *Trends in Food Science Technology*. 2002. Vol. 13. No 5. pp. 160-167.
10. Rafalska A., Abramowicz K., Krauze M. // *World scientific news*. 2017. Vol. 72. pp. 123-140.
11. Тринеева О.В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной: монография. Воронеж: Издательский дом ВГУ. 2016. 224 с.
12. Тринеева О.В., Сафонова И.И., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. // *Химико-фармацевтический журнал*. 2014. Т. 48. № 2. С. 48-52.
13. Тринеева О.В., Сафонова И.И., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2012. Т. 12. № 5. С. 806-813.
14. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж. «Водолей». 2004. 528 с.
15. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М. «Мир». 1981. С. 402-407.
16. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М. «Мир». 1999. 405 с.
17. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения 15.08.2019).

Study of the flavonoid profile of sea buckthorn fruits of various varieties by thin layer chromatography

Trineeva Olga V., Rudaya Margarita A., Slivkin Alexey I.

Voronezh State University, Voronezh

Flavonoids are essential components of biologically active substances (BAS). One of the richest sources of flavonoids is the fruit of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Previous studies determined that sea buckthorn fruit contains such flavonoids as quercetin, kaempferol, hesperidin, rutin, hyperoside, isorhamnetin, myricetin, citrin, catechin, etc. The standardisation of this plant material is currently based on the content of carotenoids, while little attention has been paid to the polyphenolic compounds in it. All sea buckthorn varieties are considered acceptable during the procurement process. However, numerous studies have demonstrated that the content of biologically active substances in these varieties is not the same. It is therefore important to develop algorithms for express identification of sea buckthorn fruit varieties using thin-layer chromatography (TLC) fingerprint profiles. The aim of this paper was to study the composition of various groups of flavonoids in varieties of sea buckthorn by means of thin-layer chromatography (TLC). In our study we used the dried fruit of several varieties of sea buckthorn (Stolichnaya, Galerit, Ryabinovaya, Botanicheskaya lyubitelskaya, Botanicheskaya, Trofimovskaya, Studencheskaya, Botanicheskaya aromatnaya, Krasnokarminovaya, and Nivelena) harvested at the Botanical garden of the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University in September 2018, in accordance with the standards for the procurement of medicinal plant materials of this morphological group. The extraction of flavonoids was performed by heating accurately weighed quantities of dried and grounded raw material with 70% ethanol at the ratio of 1:10. 10×10 cm Silica gel 60 F₂₅₄ aluminum-backed TLC plates (Germany) were used in the experiment. The eluent was ethyl acetate - glacial acetic acid - water system (7.5:1.5:1.5). A 10% NaOH alcoholic solution was used to identify the obtained zones in visible and ultraviolet light. The TLC of the extract of dried sea buckthorn fruit of the Galerit variety showed 9 fluorescent chromatographic zones against a dark background when observed under UV light at 365 nm. After the plate was developed it showed 11 zones when observed under UV light. The optimal volume of the sample was 7 µl of the extract. The fruit of the studied varieties contained rutin (0.54±0.02) and quercetin (0.78±0.02). The unidentified zones were also fluorescent under UV light, so they may also be flavonoids. The obtained data was used to calculate the parameters of the efficiency of the chromatographic process in a thin layer of sorbent. These parameters include values R_f and R_s, the distribution coefficient (K), and the selectivity coefficient (L). The applied eluent system yielded satisfactory separation of chromatographic zones of flavonoids, as the selectivity coefficient is above 1. The largest number of separated zones was observed in the Ryabinovaya variety (13 zones) and the smallest in the Stolichnaya and Trofimovskaya varieties (10 zones). Interestingly, zones with values of R_f=0.20±0.02, 0.25±0.01, 0.42±0.02, 0.86±0.02, 0.95±0.01, and 0.98±0.01 were present in all the studied varieties, and thus can be characterised as marker zones for the whole species. The optimal conditions for chromatographic separation of flavonoid zones in the fruit of sea buckthorn were experimentally determined and theoretically substantiated. For the first time, the TLC profiles of flavonoids of 10 studied varieties of sea buckthorn were obtained and partly identified. The presence or absence of unique marker zones was determined for the studied varieties: Ryabinovaya, Botanicheskaya aromatnaya, Stolichnaya, Trofimovskaya, Nivelena, and Botanicheskaya. The TLC profile of flavonoids of sea buckthorn fruit allows for approximate identification of the variety by means of the fingerprint method. However, highly accurate methods, such as HPLC-MS, should be used for precise identification of the variety.

Keywords: fruit of several varieties of sea-buckthorn, thin-layer chromatography, flavonoids

References

1. Tarakhovskii Yu.S. et al., Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina, Pushchino, Sunchrobook, 2013, 310 p.
2. Trineeva O.V., Perova I.B., Slivkin A.I., El-ler K.I., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2017, Vol. 17, No 1, pp. 87-93.
3. Trineeva O.V., Avtoreferat dis. doktora farmatsevticheskikh nauk, M., 2017, 48 p.
4. Mendelova A. et al., *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2016, Vol. 10, No 1, pp. 59-64.
5. Suryakumar G., Gupta A., *Journal of ethnopharmacology*, 2011, Vol. 138(2), pp. 268-278.
6. Wang J. et al., *Journal of the science of food and agriculture*, 2011, Vol. 91(8), pp. 1446-1451.

7. Singh B., Peter K., *New Age Herbals*, 2018, pp. 29-54.
8. Skalii L.P., *Oblepikha: Posobie dlya sadovodov-lyubitelei*, M., Niola-Press, YuNION-publik, 2007, 240 p.
9. Yang, B., Kallio H., *Trends in Food Science Technology*, 2002, Vol. 13, No 5, pp. 160-167
10. Rafalska A., Abramowicz K., Krauze M., *World scientific news*, 2017, Vol. 72, pp. 123-140.
11. Trineeva O.V., *Kompleksnoe issledovanie sodержaniya i spetsificheskogo profilya biologicheskii aktivnykh veshchestv plodov oblepikhi krushinovidnoi: monografiya*, Voronezh, Izdatel'skii dom VGU, 2016, 224 p.
12. Trineeva O.V., Safonova I.I., Safonova E.F., Slivkin A.I., *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2014, Vol. 48, No 2, pp. 48-52.
13. Trineeva O.V., Safonova I.I., Safonova E.F., Slivkin A.I., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2012, Vol. 12, No 5, pp. 806-813.
14. Rudakov O.B., Vostrov I.A., Fedorov S.V. et al., *Sputnik khromatografista. Metody zhidkostnoi khromatografii*, Voronezh, «Vodolei», 2004, 528 p.
15. Kirchner Yu., *Tonkosloinaya khromatografiya*, M., «Mir», 1981, pp. 402-407.
16. Geiss F., *Osnovy tonkosloinoi khromatografii*, M., «Mir», 1999, 405 p.
17. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XIV izd. Rezhim dostupa: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (data obrashcheniya 15.08.2019).

Тринева Ольга Валерьевна – д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Рудая Маргарита Александровна – аспирант 3-ого года обучения фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

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

Trineeva Olga V. – doctor of pharmaceutical sciences, associate professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty of VGU, Voronezh, e-mail: trineevaov@mail.ru

Rudaya Margarita A. – a graduate student of the 3rd year students of pharmaceutical faculty of Voronezh State University, Voronezh

Slivkin Alexey I. – doctor of pharmaceutical sciences, professor, manager. chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, dean of pharmaceutical faculty of VGU, Voronezh, e-mail: slivkin@pharmvsu.ru