УДК 615.322:582.746.21[543.422.3`544.943.2]

О КАЧЕСТВЕННОМ СОСТАВЕ ФЛАВАНОНОВ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОМ СОДЕРЖАНИИ В КОЖУРЕ CITRUS MAXIMA

Евсеева О.С., Андреева О.А., Оганесян Э.Т., Ароян М.В.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, e-mail: evseeva_olga1988@mail.ru

Из кожуры C. maxima выделен индивидуальный флаванон. При количественном кислотном гидролизе флаванона в гидролизате после нейтрализации хроматографически идентифицированы D-глюкоза и L-рамноза. На основании данных бумажной хроматографии в системах 15% уксусная кислота и бутанол: уксусная кислота:вода (4:1:5), УФ-, ИК- и ЯМР ^{1}H-спектроскопии, температуры плавления агликон идентифицирован как 5,7,4'-тригидроксифлаванон (нарингенин), представляющий собой желтые игольчатые кристаллы, хорошо растворимые в спирте, температура плавления 250°C, в условиях цианидиновой реакции его спиртовой раствор приобретает темно-красно-фиолетовую окраску. Разработана методика количественного определения содержания флавоноидов в кожуре C. maxima спектрофотометрическим методом в пересчете на гесперидин по градировочному графику. Количественное содержание флавоноидов составляет 6,59 ± 0,1217%.

Ключевые слова: Citrus maxima, нарингин, нарингенин, УФ-, ИК-, ЯМР ^{1}H-спектроскопия, количественное определение, гесперидин

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ASSAY OF FLAVANONES IN THE PEEL CITRUS MAXIMA

Evseeva O.S., Andreeva O.A., Oganesyan E.T., Aroyan M.V.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, e-mail: evseeva_olga1988@mail.ru

The individual flavanone was extracted from the peel of C. maxima. Using quantitative acidic flavanone hydrolysis in the hydrolyzate after neutralization D-glucose and L-rhamnose were detected by chromatographic method. On the basis of results of paper chromatography (composition of mobile phase: 15% acetic acid & butanol:acetic acid:water (4:1:5), UV-, IR-, NMR ^{1}H- spectroscopy, melting point the aglycone was identified as 5,7,4'-trihydroxyflavanone (naringenin), which is a yellow needle crystals free soluble in ethanol (melting point 250°C). In the Zinc-hydrochloric acid reduction test alcoholic solution of the aglycone becomes magenta color. The assay spectrophotometric method of flavanoids in C. maxima peel by was developed (as to hesperidin, using calibration curve). Flavanoids content in the peel of C. maxima was 6,59 ± 0,1217%.

Keywords: Citrus maxima, naringin, naringenin, UV-, IR- and proton NMR spectroscopy, assay, hesperidin

Широкий спектр биологической активности флавоноидных соединений обусловлен прежде всего их высокой антирадикальной активностью, благодаря чему в различных органах и тканях производит нормализация патохимических процессов. Растущая потребность в препаратах этой группы свидетельствует о необходимости поиска доступных и экономически выгодных сырьевых источников. С этой точки зрения целесообразно использование пищевых растений, в частности цитрусовых. В нашей стране кожура плодов цитрусовых практически не применяется, хотя она богата пектинами, витаминами и флавоноидами. Ранее нами из кожуры апельсинов была получена субстанция, характеризующаяся противоязвенной активностью[1, 2]. Максимальное содержание флавоноидов наблюдается в кожуре, причем большинство из них представлено гликозидами флаванонов. Помело (*Citrus maxima, Citrus grandis*) – растение рода Цитрус, богатое витаминами, эфирным маслом, толстая кожура и мякоть которого богаты микроэлементами, витаминами и эфирными маслами. Флавоноиды, содержащиеся в кожуре помело, эффективны при заболеваниях кишечника, поджелудочной железы, а также предотвращают распространение клеток рака молочной железы за счет снижения избытка эстрогена [3, 4, 5].

Целью нашего исследования является изучение состава флаванонов, а также разработка методики количественного определения флавоноидов в кожуре Citrus maxima.

Материалы и методы исследования

Сырьем является высушенная и измельченная кожура C. maxima. Качественный анализ проводили с помощью бумажной хроматографии в системах 15% уксусная кислота и бутанол : уксусная кислота : вода (БУВ) (4:1:5); УФ-, ИК- и ЯМР ^{1}H-спектроскопии. В основу количественного определения положен спектрофотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности флаванонов. В качестве стандартного образца использовали гесперидин.

Результаты исследования и их обсуждение

Первым этапом нашего исследования стал анализ качественного состава флаванонов методом бумажной хроматографии. Установлено, что спиртовой экстракт из

кожуры помело содержит в своем составе преимущественно один флаванон со значением Rf 0,59 в системе БУВ 4:1:5 и Rf 0,89 в 15% уксусной кислоте. Низкое значение Rf в системе БУВ 4:1:5 указывает, что вещество является либо дигликозидом, либо биозидом.

При последовательной обработке хроматографического пятна вещества последовательно 2% раствором натрия боргидрида и парами концентрированной хлороводородной кислоты появляется характерное для флаванонов малиновое окрашивание, а в условиях цианидиновой реакции разбавленный этанолом экстракт окрашивается в фиолетовый цвет.

Далее проводили выделение индивидуального флаванона по разработанной ранее методике [1].

При количественном кислотном гидролизе выход агликона составляет 46,9%, что характерно для дигликозидов. В гидролизате после нейтрализации хроматографически идентифицированы D-глюкоза и L-рамноза. Агликон – представляет желтые игольчатые кристаллы, хорошо растворимые в спирте, т.пл. 250°С, Rf 0,90 (БУВ 4:1:5); в условиях цианидиновой реакции раствор его приобретает темно-красно-фиолетовую окраску. На БХ в УФ-свете пятно агликона имеет темную окраску, которая в парах аммиака приобретает светло-голубую флуоресценцию, а с боргидридом натрия и концентрированной соляной кислотой – розовую окраску. УФ-спектр характеризуется двумя полосами поглощения – высокоинтенсивная коротковолновая полоса с максимумом при 290 и слабоинтенсивная широкая размытая полоса в длинноволновой зоне с максимумом при 325 нм.

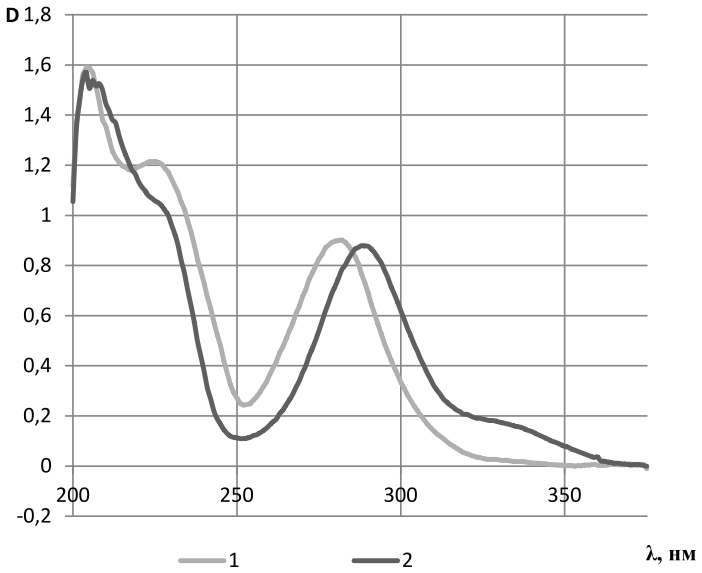

Рис. 1. УФ-спектр нарингина – 1 и его агликона – 2

В ИК-спектре агликона имеются полосы поглощения при 1600, 1560 см$^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям –С = С ароматической системы, полосы 1350, 1260 – валентным колебаниям С-О, 1175, 3370 см$^{-1}$ – валентным колебаниям фенольной–ОН, 1035, 910, 835 см$^{-1}$ полосы деформационных колебаний –С–Н– замещенного бензольного кольца и 1640 см$^{-1}$ – валентным колебаниям С = О g-пирона, 3400–3300 см$^{-1}$ – валентным колебаниям гидроксигрупп (рис. 2).

В ЯМР-спектре агликона (ДМСО, d, м.д.) характерно отсутствие сигналов протонов ОН углеводных остатков, наблюдали сигналы: 5,44 (dd H-2); 2,83 (dd H-3$_{ax}$); 3,21 (dd H-3$_{eq}$); 5,45 (s H-8); 5,87 (s H-6); 7,29 (d H-2′); 6,77 (d H-3′); 6,79 (d H-5′); 7,32 (d H-6′), 12,13 (s 5-OH); 10,77 (s 7-OH); 9,58 (s 4′-OH).

Таким образом на основании данных количественного кислотного гидролиза, УФ-, ИК- и ЯМР ^{1}H^{-}спектроскопии, температуры плавления агликон идентифицирован как 5,7,4^{1}-тригидроксифлаванон (нарингенин).

В основу количественного исследования положен спектрофотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности флаванонов. В качестве стандартного образца использовали гесперидин, поскольку данный флаванон-биозид содержится практически во всех представителях рода Citrus.

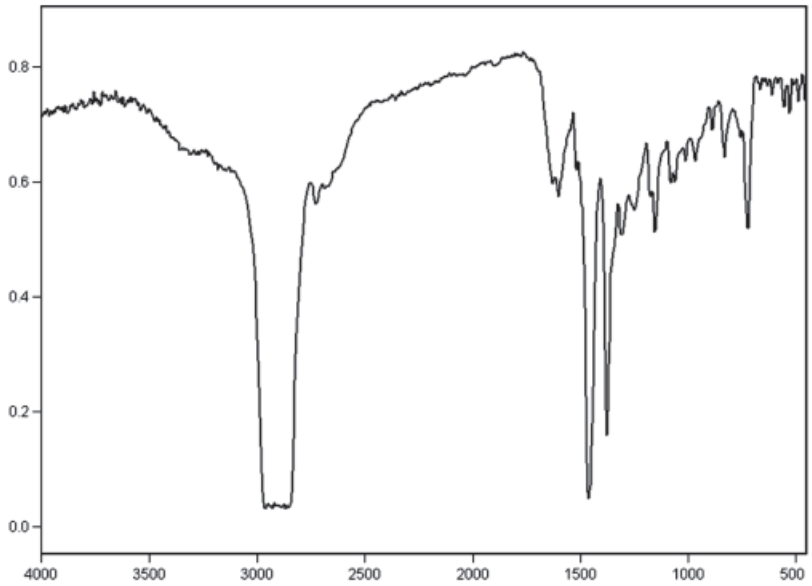

Рис. 2. ИК-спектр агликона

Методика количественного определения. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1,0 (очная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл этанола, к колбе подсоединяют обратный холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Далее смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл. Извлечение вышеуказанным способом повторяют 3 раза и доводят объем фильтрата до метки этанолом. 1 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят объем до метки. Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 286 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для построения калибровочного графика зависимости оптической плотности от количества гесперидина в растворе точную навеску 0,01 г этого вещества количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют этанол до растворения вещества, затем объем раствора доводят до метки.

Для приготовления разведений в мерные колбы на 25 мл переносят аликвоты раствора стандарта и доводят до метки этанолом. Используют аликвоты раствора стандарта, мл: 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6; 3,0; 3,4; 3,8. При этом количество гесперидина в 25 мл спектрофотометрируемого раствора равно соответственно г·10^{-5}: 0,48; 0,80; 1,12; 1,296; 1,76; 2,08; 2,40; 2,72; 3,04.

Оптическую плотность измеряют при длине волны 286 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см; в рабочую кювету помещают анализируемые растворы, в кювету сравнения – этанол. Калибровочный график зависимости оптической плотности (D) от количества гесперидина в спектрофотометрируемом растворе (с) имеет вид прямой линии.

Массовую долю суммы флавоноидов в исследуемых экстрактах в пересчете на гесперидин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{c \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - \omega)} \cdot 100\ \%,$$

где c – количество гесперидина в анализируемой аликвоте экстракта, соответствующее измеренной оптической плотности по калибровочному графику, $c \cdot 10^{-5}$ г/мл; a – масса сырья, г; ω – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Выводы

1. Из кожуры C. maxima выделен флаванон нарингин, установлена его структура с использованием современных физико-химических методов.

2. Разработана методика количественного определения содержания флавоноидов в кожуре C. maxima.

3. Количественное содержание флавоноидов в экстрактах из кожуры C. maxima (помело) в пересчете на гесперидин составляет 6,59 ± 0,1217 %.

Количественное содержание суммы флавоноидов в кожуре C. maxima

	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин, %	Метрологические характеристики
1	6,5012	$X_{ср} = 6,59$
2	6,6332	$S = 0,1160$
3	6,7745	$S_{хср} = 0,0473$
4	6,5167	$DX = 0,1217$
5	6,6385	$X \pm DX = 6,59 \pm 0,1217$
6	6,4645	e = 1,85 %

Список литературы

1. Патент РФ № 2001103422/15, 27.10.2005. Оганесян Э.Т., Хочава М.Р., Доркина Е.Г., Репс В.Ф., Андреева О.А. Средство из отходов цитрусовых, обладающее противоязвенной активностью // Патент России № 2262944. Бюл. № 30.

2. Хочава М.Р., Доркина Е.Г., Репс В.Ф. Влияние полисахаридного комплекса из кожуры цитрусовых на специфическую резистентность слизистой оболочки желудка // Санкт-Петербург – Гастро-2000 – Материалы 2 Объединенной Всерос. и Всеармейской науч. конф.; 20–22 сент. 2000 г.; Санкт-Петербург. Гастробюллетень. – 2000. – № 1–2. – С. 97.

3. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature / Julia J. Petersona, Johanna T. Dwyer etal. //Journal of Food Composition and Analysis. – 2006. – № 19. – P. 66–73.

4. Middleton E. Biological propertis of plant flavonoids: an overview //International Journal of Pharmacognosy. – 1996. – Vol. 34, № 34. – P. 344–348.

5. User and properties of Citrus flavonoids / Benavente-Garcia O., Castillo Julian, Marin F.R. et.al // J. Agr. And Food Chem. – 1997. – Vol. 45, № 12. – P. 4506–4514.

References

1. Patent RU № 2001103422/15, 27.10.2005. Oganesyan E.T., Hochava M.R., Dorkina E.G., Reps V.F., Andreev O.A. Agent of citrus waste having antiulcer activity. Patent no. 2262944. Russia. Bull. no. 30.

2. Hochava M.R., Dorkina E.G., Reps V.F. Effect of polysaccharide complex of citrus peel on the specific resistance of the gastric mucosa. St. Petersburg – Gastro -2000: *Materialy Obedinennoj Vserossijskoj i Vsearmejskoj nauchnoj konferencii* (Proceedings of the Russia and Army Joint Scientific Conference 2), Sept. 20-22. 2000; Sankt-Peterburg, SPb. Gastrobyulleten.2000. no. 1–2. pp. 97.

3. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature/ Julia J. Petersona, Johanna T. Dwyer et al. //Journal of Food Composition and Analysis. 2006. no. 19. pp. 66–73.

4. Middleton E. Biological propertis of plant flavonoids: an overview // International Journal of Pharmacognosy. 1996. Vol.34, no. 34. pp. 344–348.

5. User and properties of Citrus flavonoids / Benavente-Garcia O., Castillo Julian, Marin F.R. et.al // J. Agr. and Food Chem. 1997. Vol. 45, no. 12. pp. 4506–4514.

Рецензенты:

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Волгоград;

Попова О.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 04.04.2014.