



Биол. журн. Армении, 2 (74), 2022

DOI:10.54503/0366-5119-2022.74.2-53

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ АБРИКОСА (ARMENIACA VULGARIS L) (ROSACEA)

Т.Д. КАРАПЕТЯН¹, В.С. МИРЗОЯН², Р.М. АНИСЯН¹

¹ Ереванский государственный медицинский университет (ЕГМУ)

² Научный центр оценки и анализа рисков в сфере безопасности пищевых продуктов, РА
varsik_mir@yahoo.com

Проведено качественное и количественное определение флавоноидов в спирто-водных экстрактах листьев и плодов абрикоса сорта Еревани спектрофотометрическими методами. Результаты анализов показали, что в листьях абрикоса флавоноиды содержатся в достаточных количествах в процессе вегетации от 1-1,59%. Наибольшее количество флавоноидов отмечается за две недели до технической зрелости плодов. В кураге флавоноидов обнаружено больше, чем в сухих листьях.

Результаты качественных реакций экстрактов, полученных из листьев абрикоса, позволяя сделать предположение, что флавоноиды изучаемого экстракта состоят в основном из флавонолов, в частности кверцетина.

Листья абрикоса – спиртовой экстракт – биологически активные вещества – флавоноиды – кверцетин – спектрофотометрический метод

Որոշվել է ծիրանենու տերևների և պտուղների սպիրտաջրային հանուկներում ֆլավոնոիդների որակական և քանակական պարունակությունը սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդներով: Արդյունքները ցույց են տվել, որ ծիրանի տերևները բավարար քանակությամբ ֆլավոնոիդներ են պարունակում, որոնց քանակությունը զգալիորեն տատանվում է վեգետացիայի ընթացքում (1-1,59 %): Ֆլավոնոիդների ամենամեծ քանակությունը նկատվում է պտղի տեխնիկական հասունացումից երկու շաբաթ առաջ: Վերլուծությունների արդյունքները հաստատում են ծիրանի՝ երևանի սորտի (շալախ) տերևների էթանոլային հանուկում ֆլավոնոիդների, մասնավորապես կվերցետինի բավարար քանակությունը: Ծիրանի չոր մեջ ավելի շատ ֆլավոնոիդներ են հայտնաբերվել, քան չոր տերևներում:

Ծիրանի տերևներ – սպիրտային հանուկ – կենսաբանորեն ակտիվ միացություններ – ֆլավոնոիդներ – կվերցետին – սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդ

Qualitative and quantitative determination of flavonoids in alcohol-water extracts of leaves and fruits of apricot of variety Erevani by spectrophotometric methods was carried out. The results of the analyzes showed that flavonoids are contained in apricot leaves in sufficient quantities, the content of which varies during the growing season (1-1,59%). The largest amount of flavonoids is noted two weeks before the technical maturity of the fruit. The results of qualitative reactions of extracts obtained from apricot leaves suggest that the flavonoids of the studied extract consist mainly of flavonols, in particular quercetin. There are more flavonoids in dried apricots than in the dried leaves.

Apricot leaves – ethanolic extract – biologically active ingredients – flavonoids – quercetin – spectrophotometric method

Флавоноиды – широко распространенные полифенольные вторичные метаболиты с разнообразной биологической активностью. Они обнаружены в различных органах растений: в листьях, цветках, коре, древесине, плодах, и т.д.

В равной мере они интересны, как объекты изучения в ботанике, фармакогнозии, фитохимии и особенно в фармации и медицине.

Флавоноиды участвуют в реакциях растений на суровые условия окружающей среды и эффективно регулируют дифференцировку и рост клеток. Эти соединения выполняют функцию растительных пигментов. Антистрессовая (защитная) функция этих соединений против различных повреждающих факторов внешней среды (механическое повреждение, инфекции, насекомые, ультрафиолетовое излучение, температурный стресс) состоит в их участии в окислительно-восстановительных процессах, антибиотической активности, способности связываться с протеинами, служить материалом для построения клеточной стенки, и т.д. [2, 8, 15, 16].

С другой стороны, флавоноиды считаются незаменимым компонентом в различных нутрицевтических, фармацевтических, лекарственных и косметических средствах. На сегодня определен спектр действия этих соединений в организме человека: капилляроукрепляющее, спазмолитическое, антистрессовое, противовоспалительное, антигрибковое, антибактериальное, противовирусное, противоязвенное, антиоксидантное, антиаллергическое, антиатеросклеротическое, антиаритмическое, антигипертензивное, иммуномодулирующее, антиканцерогенное, нефропротекторное, эстрогеноподобное, гепатопротекторное, учитывая тот факт, что они обладают меньшей токсичностью и проявляют меньше побочных эффектов, чем аналогичные лекарственные средства, полученные из других источников [2, 7, 11, 13, 15].

Одним из традиционных источников БАВ для человека служат плодовые растения. Одним из таких растений является абрикос, который широко культивируется в республике Армения.

Что касается листьев абрикоса, то об их применении имеются упоминания только в народной медицине. В частности, листья абрикоса применялись при ожогах, для лечения ссадин, трещин и ран кожных покровов, при стоматите, в качестве болеутоляющего при зубной боли, а также при экземе, диарее, хронической интоксикации, дифтерии и т.д. [1,12].

Учитывая вышеизложенное, а также распространённость в ареале Армении абрикоса обыкновенного, послужили основанием для изучения флавоноидов листьев абрикоса, с целью возможности создания фитопрепаратов на их основе.

Материал и методика. Материалом исследования служил экстракт листьев абрикоса сорта Еревани (Шалах). Листья были собраны в Котайкском марзе Армении (с. Зовуни, на высоте около 1100 м над уровнем моря) с 50 деревьев в период вегетации до созревания плодов 4 раза в июне с интервалом в 7 дней. Исследования проводились в 2010-2015 гг.

Листья были фиксированы на паровой бане в течение 10 минут и высушены при комнатной температуре, после чего измельчены и просеяны сквозь сито с диаметром 1,0 мм.

Суммарное количество флавоноидов в листьях абрикоса было определено методами Криста-Мюллера, Чанга и Ермакова.

Экстракты были получены из 2-х граммов сухих листьев, измельченных до мелкого порошка. В качестве экстрагента использовали 25 мл 40 % этанола, с содержанием 1% HCl (*Криста-Мюллера и Чанга*), или 80 % этанол (метод Ермакова). Экстрагирование проводилось при нагревании 50°C с обратным холодильником в течение одного часа. Полученные экстракты с осадком порошка центрифугировали, а надосадочные жидкости были декантированы. Осадки были промыты экстрагентом и заново центрифугированы. Цикл был повторен 3-4 раза до отрицательной реакции на флавоноиды (с помощью реакции с FeCl₃).

1. Метод Криста-Мюллера.

Экстракты были сконцентрированы с помощью вакуумного испарителя и количественно переведены в круглодонную колбу. Туда же было добавлено 20 мл ацетона, 2 мл 25 % HCl и 1 мл 0,5% уротропина. Полученная смесь была прокипячена 30 минут при 50°C с обратным холодильником, после чего отфильтрована в 100 мл колбу. Остаток на фильтровальной бумаге был экстрагирован 2 раза с помощью 20 мл ацетона (10 минут при 50°C, с обратным холодильником). Фильтровальная бумага была промыта ацетоном до метки 100 мл, после чего полученный водно-ацетонный экстракт был заново отфильтрован.

К 20 мл фильтрата добавлено 20 мл воды и смесь экстрагирована этилацетатом до отрицательной реакции на флавоноиды в водной фазе. Каждая порция этилацетатного экстракта была отфильтрована через безводный сульфат натрия, фильтр промыт этилацетатом до получения раствора объемом 125 мл. К 10 мл этилацетатного раствора добавлен 0,5 мл 0,5 % цитрат натрия и 2 мл 2 % $AlCl_3$ (2 г $AlCl_3$ в 100 мл метаноле, который содержит 5 % CH_3COOH). Полученный желтый раствор был доведен до метки 25 мл метанолом, который содержит 5% CH_3COOH , оставлен на 45 минут и отфильтрован.

В качестве слепого раствора использовался тот же раствор, без добавления хлорида алюминия.

В качестве стандартного раствора использован 0,0116 мг/мл раствор кверцетина дигидрата в этилацетате. Оптическая плотность полученного раствора измерена в диапазоне волн 600-400 нм.

2. **Метод Чанга.** Экстракты были сконцентрированы с помощью вакуумного испарителя и оставлены на высыхание в вакуумном сушильном шкафу. Сухой остаток растворен в 25 мл 80 % этаноле, потом разведен 1:10 тем же растворителем.

К 1 мл полученного раствора было добавлено 0,2 мл 10 % $AlCl_3$ (2 г $AlCl_3$ в 100мл метанола, который содержит 5 % CH_3COOH , 0,2 мл 1М CH_3COOK). Полученный желтый раствор был доведен до 10 мл водой, оставлен на 30 минут, отфильтрован.

В качестве слепого раствора был использован тот же раствор, без добавления хлорида алюминия.

В качестве стандартного раствора был использован 0,072 мг/мл раствор кверцетина дигидрата в 80 % этаноле. Оптическая плотность полученного раствора была измерена в диапазоне волн 600-400 нм.

3. **Метод Ермакова:** основан на цветной реакции флавонолов с солями алюминия. Экстракт был получен с помощью 80 % этанола и сконцентрирован с помощью вакуумного испарителя. Очистка была проведена петролейным эфиром. Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром ($\lambda=440$ нм), кювета 10 мм [3]. Калибровочную кривую строили по рутину.

Опыты выполнялись в 4-х повторностях. Статистическую обработку результатов выполняли по Стьюденту (one-tail Student's t- test) при $p=0,05$.

Результаты и обсуждение. Несмотря на близость строения, отдельные группы флавоноидов значительно отличаются друг от друга по биологической активности, что связано с замещением водорода в различных положениях ядер А и В группами $-OH$, $-OCH_3$, $-CH_3$ и наличием асимметрических атомов углерода. В зависимости от этого, а также от степени окисленности (или восстановленности) гетероцикла, флавоноиды классифицируют на 8 классов: флавоны, флаванолы, изофлавоны, флаваноны, катехины, антоцианидины, лейкоантоцианидины (или флавандиолы-3,4) и халконы [8].

Присутствие флавоноидов в листьях абрикоса нами было установлено с помощью качественных реакций. Применяли цианидиновую реакцию, а также реакции с HCl, с реактивом Вильсона, 10 % раствором аммиака, 5 % раствором $AlCl_3$, 1 % $FeCl_3$, $Pb(CH_3COO)_2$.

На основании проведенных качественных реакций сделали предположение о наличии в листьях абрикоса флавонов, флавонолов, 5-оксифлавонолов (к которым относится кверцетин), 5-оксифлавонов, халконов, аурионов [4].

Для количественного определения содержания суммы флавоноидов нами была использована спектрофотометрическая методика на основе реакции образования комплексов с алюминия хлоридом.

В рамках сотрудничества с Аналитической лабораторией Научного Центра Экспертизы Лекарств и Медицинских Технологии РА (НЦЭЛ и МТ РА) было определено суммарное количество флавоноидов в листьях абрикоса методами Криста-Мюллера и Чанга, и получены сравнимые данные. Листья абрикоса для анализа были собраны за 2 недели до созревания плодов. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на саморегистрирующем спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Japan) в кювете с толщиной слоя жидкости 1 мм при длине волны 600-400 нм.

На рис. 1 приведены длины волн УФ спектра этанолового экстракта абрикоса. Максимальная оптическая плотность (0,465 нм) наблюдается при длине волны 437-438, что является подтверждением присутствия флавонолов, в частности - кверцетина в листьях абрикоса (см. рис.1).

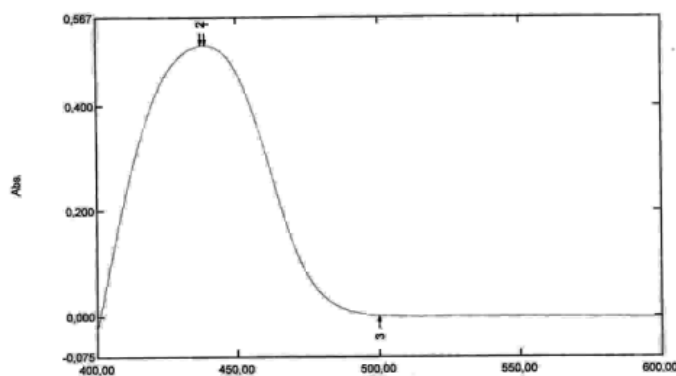


Рис. 1. УФ спектр этанолового экстракта листьев абрикоса обыкновенного (по горизонтали – длина волны (нм); по вертикали – оптическая плотность)

По методу Чанга количество общих флавонолов по кверцетину составило 0,53 %, по методу Криста-Мюллера – 0,51 % (таб. 1). В качестве стандартного раствора был использован 0,0116 мг/мл раствор кверцетина дигидрата (Sigma Aldrich) в этилацетате (метод Чанга) или 0,072 мг/мл раствор кверцетина дигидрата в 80 % этаноле (метод Криста Мюллера).

Таблица 1. Содержание флавоноидов методами Криста-Мюллера и Чанга в экстрактах из сухих листьев абрикоса сорта Еревани

Метод определения флавоноидов	Содержание флавоноидов, %
Метод Криста-Мюллера	0,51
Метод Чанга	0,53

Рациональное использование флавоноидов невозможно без детального изучения закономерностей накопления, специфичности и изменчивости состава и содержания этих веществ в растительном сырье.

В связи с этим на следующем этапе нами было проведено исследование по изучению динамики накопления флавоноидов в листьях абрикоса в течение вегетации деревьев за июнь месяц. При выборе сроков сбора листьев мы исходили из физиологических особенностей развития абрикосового дерева, а также учитывали многочисленные литературные данные о том, что максимальное количество ФС в различных видах растений (в том числе и плодовых) приходится на фазы бутонизации, начала цветения, а также в период плодоношения [5-7, 9,10]. Данные по накоплению флавоноидов в листьях даны на табл. 2 и рис. 2.

Таблица 1. Количественные изменения флавонолов в листьях и плодах абрикоса (n=4, p=0,05)

Листья (в % на сухой вес)			
Дни после обработки за июнь месяц			
1	7	14	21
1,25±0,13	1,00±0,04	1,59±0,08	1,00±0,08

Наши исследования показали, что процесс синтеза флавоноидов в листьях абрикоса довольно динамичен: за июнь месяц можно отметить пики, сменяющиеся значительным спадом (рис. 1). С первых дней анализа отмечалось довольно высокое содержание флавоноидов в листьях (1,25±0,13 %). Пик накопления отмечается к концу третьей недели июня (1,59±0,08 %). За две недели до технической зрелости плодов, их количество уменьшается почти 1,6 раза. Можно предположить, что в этот период флавоноиды из листьев абрикосового дерева активно транспортируются в плоды.

Обобщая данные, можно констатировать, что в листьях абрикоса флавоноиды содержатся в достаточных количествах, содержание которых варьируется в процессе вегетации. Наибольшее количество флавоноидов отмечается за две недели до технической зрелости плодов. В кураге содержание флавоноидов больше, чем в сухих листьях.

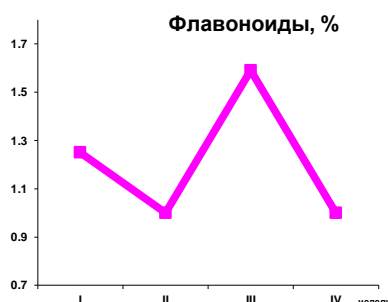


Рис. 2. Динамика накопления флавоноидов в листьях абрикоса за июнь месяц (по горизонтали – средние данные по содержанию флавоноидов по рутину в % на сухой вес, по вертикали – сроки анализа по неделям)

Таким образом, данные, полученные в результате фитохимических исследований, могут служить экспериментальным обоснованием для дальнейших исследований флавоноидов листьев абрикоса обыкновенного сорта Еревани (Шалах) с целью возможности создания фитопрепаратов на их основе.

Результаты количественного анализа флавоноидов свидетельствуют об их достаточном количестве в исследуемых экстрактах. Пик накопления флавоноидов в листьях абрикоса отмечается за две недели до технической зрелости плодов.

Результаты качественных реакций экстрактов, полученных из листьев абрикоса, позволяют сделать предположение, что флавоноиды изучаемого экстракта состоят в основном из флавонолов, в частности кверцетина.

Полученные данные позволяют рассматривать листья абрикоса в качестве источника БАВ, в частности флавонолов, в том числе для получения экстрактов, которые представляют интерес для использования в лечебно-профилактических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Варданян С.А.* Амирдовлат Амасиаци, М. Наука, 160 с., 1987.
2. *Еркин Ботиров, Абдурашид М. Каримов* Флавоноиды растений рода *Scutellaria* L.: Строение, свойства и биологическая активность. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума М., 625 с., 2018.
3. *Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П.* Методы биохимического исследования растений. Агропромиздат. 430 с., 1987.
4. *Карапетян Т.Д., Анисян Р.М.* Некоторые аспекты фитохимического исследования листьев абрикоса *ARMENIACA VULGARIS* L. (ROSACEA). Вестник фармации, 64, 2, с. 14-19, 2014.
5. *Карпова Е.А., Храмова Е.П., Высочина Г.И.* Содержание флавоноидов в некоторых видах рода *EUPHORBIA* L. Химия растительного сырья, №3, с. 75-81, 2008.
6. *Коцуний В.* Изменчивость состава и содержания флавоноидов *Astragalus membranaceus* (Fischer) Bunge из Восточной Сибири Сибирский ботанический вестник: электронный журнал, 1, выпуск 2, с.69-78, 2007.
7. *Куркин В.А., Поройков В.В., Куркина А.В., Авдеева Е.В., Правдивцева О.Е.* Флавоноиды лекарственных растений: прогноз антиоксидантной активности. Современные проблемы науки и образования, № 2, 2, 2015.
8. *Макаренко О.А., Левицкий А.П.* Физиологические функции флавоноидов в растениях. Физиология и биохимия культурных растений. 45, 2, с.100-112, 2013.
9. *Платонова Н.Б., Белоус О.Г.* Изменение содержания флавоноидов в растениях чая в течение вегетации, Конференция: Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. Ялта, с. 94-96, 2020.
10. *Шалдаева Т.М., Высочина Г.И., Шохина Н.К.* Флавоноиды в онтогенезе *Artemisia dracunculys* L., произрастающей в Сибири. Сиб. экол. журн. Новосибирск. № 1, с. 63-70, 2003.
11. *Akanksha Srivastava, Richa Raghuwanshi,* Landscape of natural product diversity in land-plants as source for anticancer molecules in Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules, p. 233-254, 2021.
12. *Duke J.A., Ayensu E.S.* Medicinal plants of china, Reference publication. Inc, ISBN, 0-917256, 20, 4, 1985.
13. *Panche N., Diwan A.D., Chandra S.R.* Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease. (Second Edition), p. 295-320, 2018.
14. *Robert A. Ronzio.* Flavonoids Textbook of Natural Medicine (Fifth Edition), p. 731-751, 2020.
15. *Ulrike Mathesius.* Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. Plants (Basel), 2, 7, p. 30, 2018.

Поступила 25.02.2022