

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109>

ФЛАВОНОИДЫ ЛИСТЬЕВ ВЕРБЕНЫ ЛИМОННОЙ

Научная статья

Гюльбякова Х.Н.^{1,*}¹ ORCID : 0000-0001-6334-7632;¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (xristnik[at]yandex.ru)

Аннотация

Вербена лимонная (*Aloysia citriodora Palau*) – многолетний кустарник, в диком виде произрастает в Южной Америке (Аргентине, Бразилии, Чили, Парагвае). Сырье вербены лимонной богато эфирным маслом, фенольными соединениями (фенилпропаноиды, флавоноиды, дубильные вещества), сапонинами, полисахаридами, витаминами. Целью данной работы явилось качественное и количественное изучение флавоноидных соединений листьев вербены лимонной. Объектом для настоящей работы послужили листья вербены лимонной, собранные на территории Марокко в июле 2019 года. Растительный материал был высушен воздушно-теневым способом. Лекарственное сырье представляло собой цельные или измельченные листья с характерным ароматным запахом. Для идентификации флавоноидных соединений применяли метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ). Количественный анализ флавоноидов проводили с использованием дифференциального фотометрического анализа, основанного на способности комплексных соединений флавоноидов с ионами алюминия поглощать электромагнитное излучение в ультрафиолетовой области спектра. В результате исследования установили качественный состав флавоноидов, оптимальные условия извлечения флавоноидов из сырья и их количественное содержание в листьях вербены лимонной в процентах в пересчете на лутеолин, проведена валидационная оценка методики количественного определения флавоноидов в исследуемом сырье.

Ключевые слова: род *Aloysia*, вербена лимонная, флавоноиды, лутеолин, дифференциальная спектрофотометрия, валидационная оценка методики.

FLAVONOIDS OF LEMON VERBENA LEAVES

Research article

Gulbyakova K.N.^{1,*}¹ ORCID : 0000-0001-6334-7632;¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

* Corresponding author (xristnik[at]yandex.ru)

Abstract

Lemon verbena (*Aloysia citriodora Palau*) is a perennial shrub that grows in the wild in South America (Argentina, Brazil, Chile, Paraguay). The raw materials of lemon verbena are rich in essential oil, phenolic compounds (phenylpropanoids, flavonoids, tannins), saponins, polysaccharides, vitamins. The purpose of this work was a qualitative and quantitative study of flavonoid compounds of lemon verbena leaves. The object of this work was lemon verbena leaves gathered on the territory of Morocco in July 2019. The plant material was dried by air-shade method. The crude drugs were made of whole or crushed leaves with a particular fragrance. The method of chromatography in a thin layer of sorbent (TLS) was used to identify flavonoid compounds. Quantitative study of flavonoids was carried out using differential photometric analysis based on the ability of complex compounds of flavonoids with aluminum ions to absorb electromagnetic radiation in the ultraviolet region of the spectrum. As a result of the study, the qualitative composition of flavonoids, optimal conditions for the extraction of flavonoids from raw materials and their quantitative content in lemon verbena leaves as a percentage in terms of luteolin were established, a validation assessment of the methodology for the quantitative determination of flavonoids in the studied raw materials was carried out.

Keywords: genus *Aloysia*, lemon verbena, flavonoids, luteolin, differential spectrophotometry, validation assessment of the methodology.

Введение

Листья вербены лимонной издревле широко применяются в народной медицине для лечения различных заболеваний [1], [4], [5], [6]. Вербена лимонная богата фенольными соединениями такими, как фенилпропаноиды, фенолокислоты, флавоноиды, дубильные вещества [7]. В настоящее время проводится интенсивное изучение биологических свойств полифенольных соединений, в частности, флавоноидов. Фармакологическое действие флавоноидов обусловлено их антиоксидантными, антирадикальными свойствами и способностью устранять гипоксию [8]. Целью настоящей работы явилось изучение качественного и количественного содержания флавоноидов листьев вербены лимонной и проведение валидационной оценки предлагаемой методики количественного определения флавоноидов в сырье.

Методы и принципы исследования

Объектом исследования служили листья вербены лимонной, заготовленные на территории Марокко в фазу массового цветения в июле 2019 года. Растительный материал был высушен воздушно-теневым способом. Лекарственное сырье представляло собой цельные или измельченные листья с характерным цитрусовым запахом.

Исследование качественного состава флавоноидов проводили методом восходящей хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) в извлечениях, полученных спиртом этиловым 70%. Хроматографические исследования осуществляли на пластинках «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-УФ, Россия в системе *n*-бутанол – кислота уксусная концентрированная – вода (4:1:2). В качестве стандартных образцов использовали 0,05% растворы рутина, лютеолина, кверцетина, кверцетрина, апигенина. Детекцию зон адсорбции флавоноидов осуществляли по их флуоресценции в УФ-свете при длине волны 365 нм до и после обработки хроматограмм парами аммиака и сравнивали их окраску и положение (величину R_f) с соответствующими зонами адсорбции стандартных образцов [2].

Количественное содержание суммы флавоноидов определяли дифференциальным фотометрическим методом по реакции комплексообразования с раствором алюминия хлорида [2], [9], [10], [11]. Данный метод предусматривает использование в качестве контроля испытуемого раствора без реактивов, что позволяет исключить влияние окрашенных и сопутствующих веществ, а также веществ, не образующих комплекс с реактивами.

Методика определения. Точную навеску измельченного сырья массой около 1,0 г помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, приливали 30 мл 70% этилового спирта, нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин с момента закипания спирта этилового в колбе. Экстракцию повторяли трижды в описанных выше условиях. После охлаждения полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл (раствор А). 5 мл раствора А вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл разведенной уксусной кислоты, доводили до метки спиртом этиловым 96% и перемешивали (раствор В). Через 40 минут измеряли оптическую плотность раствора В относительно раствора сравнения (готовили аналогично раствору В, но без добавления раствора алюминия хлорида) на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 400 нм (A_x) [2, 9-11].

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в листьях вербены лимонной (X,%) вычисляли по формуле, используя значение удельного показателя поглощения лютеолина:

$$X = \frac{A * 100 * 50 * 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} * a * 5 * (100 - W)}$$

где: A - оптическая плотность исследуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 549,41;

a - масса навеска сырья, г;

W - влажность сырья, %.

Основные результаты

Методом ТСХ в системе растворителей *n*-бутанол – кислота уксусная концентрированная – вода (4:1:2) в листьях вербены лимонной обнаружено наличие зон адсорбции 6 веществ флавоноидной структуры, из которых были идентифицированы рутин (0,82), апигенин (0,78) и лютеолин (0,57) (табл. 1).

Таблица 1 - Результаты хроматографического анализа флавоноидов в листьях вербены лимонной

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109.1>

R_f	Окраска зон адсорбции			Результаты идентификации/ предполагаемое вещество
	в видимом свете	в УФ-свете	в УФ при 365 нм свете после обработки NH_3	
0,44±0,03	Коричневая	Коричневая	Коричневая	не идентифиц.
0,57±0,02	Коричневая	Темно-коричневая	Желто-коричневая	лютеолин
0,63±0,03	Коричневая	Коричневая	Коричневая	не идентифиц.
0,79±0,02	Светло-коричневая	Светло-бурая	Желтая	апигенин
0,82±0,02	Светло-коричневая	Светло-коричневая	Лимонно-желтая	рутин
0,91±0,02	Светло-коричневая	Светло-бурая	Оранжевая	не идентифиц.

Наибольшей интенсивностью свечения характеризовалась зона адсорбции лютеолина, что позволило сделать вывод о преобладании в сырье данного вещества.

Спектры спиртовых извлечений из листьев вербены лимонной имели максимумы поглощения при длинах волн 286±2 нм и 333±2 нм, что свидетельствовало о присутствии в сырье помимо флавоноидов сопутствующих веществ (фенилпропаноида вербаскозида) [1], [2]. Мешающее влияние сопутствующих веществ нивелировали реакцией комплексообразования флавоноидов с раствором хлорида алюминия, дающей батохромный сдвиг спектра поглощения [2]. Дифференциальный спектр комплекса флавоноидов листьев вербены лимонной с алюминия хлоридом имел максимум поглощения при длине волны 400 нм, что соответствовало максимуму поглощению комплекса лютеолина с алюминия хлоридом, поэтому целесообразно было вести расчет количественного содержания суммы флавоноидов в сырье в пересчете на лютеолин.

Таблица 2 - Факторы, оказывающие влияние на выход суммы флавоноидов

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109.2>

Концентрация этанола, % об.	Соотношение сырья и экстрагента	Кратность экстракции	Время экстракции, мин	Содержание флавоноидов, %
40	1:20	1	45	0,795
50	1:20	1	45	0,823
70	1:20	1	45	0,905
70	1:30	1	45	1,140
70	1:40	1	45	1,002
70	1:50	1	45	0,967
70	1:30	2	45, 45	1,274
70	1:30	3	45, 45, 45	1,406

Изучение факторов, влияющих на выход суммы флавоноидов из листьев вербены лимонной показало, что оптимальным является режим 3-кратной экстракции 70%-ным этиловым спиртом этиловым в течение 45 мин при соотношении сырья и экстрагента 1:30 (табл. 2).

На основании полученных результатов была предложена методика количественного анализа флавоноидов в исследуемом сырье и проведена ее валидационная оценка по параметрам линейность, прецизионность и правильность.

Для оценки линейности методики строили градуировочный график на 8 уровнях концентраций. Растворы готовили путем изменения объема аликвоты извлечения из листьев вербены лимонной. Концентрация флавоноидов в пересчете на лютеолин в анализируемых растворах составляла 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,035% и 0,04% (табл. 3).

Таблица 3 - Результаты измерения оптической плотности

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109.3>

C, %	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	0,035	0,04
A	0,125	0,260	0,328	0,510	0,650	0,780	0,885	1,019

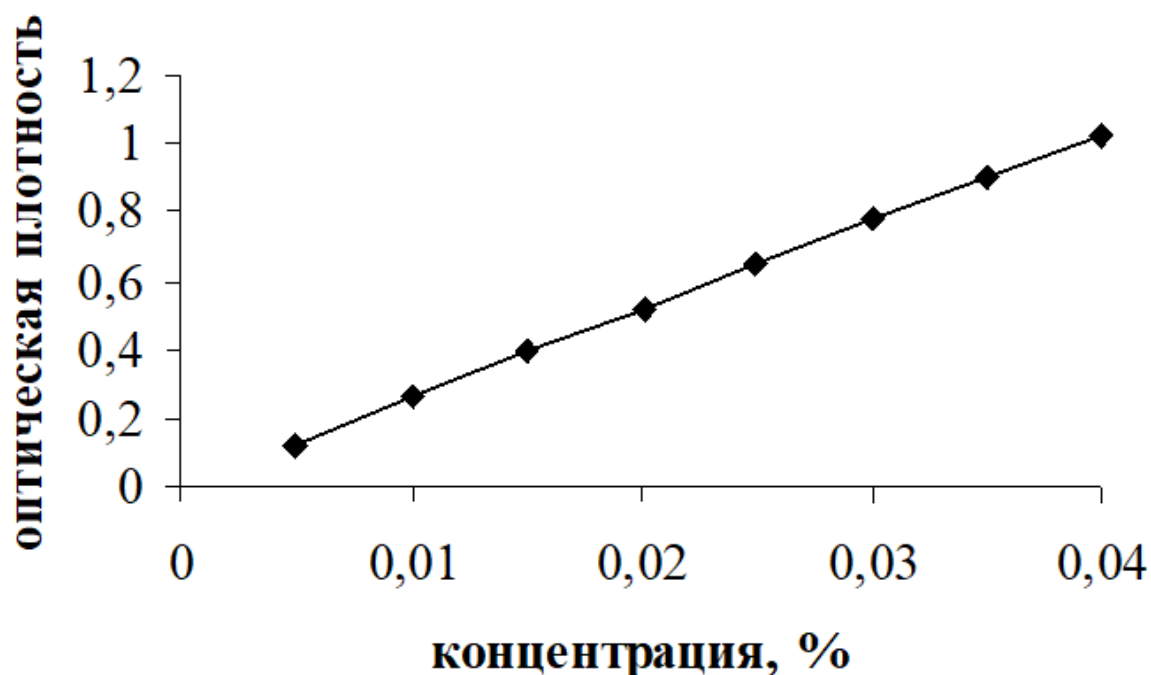


Рисунок 1 - Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109.4>

В результате определения установлено, что график зависимости оптической плотности растворов от концентрации флавоноидов (рис.1) имеет линейный характер и описывается уравнением: $y=25,87x-0,012$. Коэффициент корреляции близок к единице и составляет 0,996, что свидетельствует об удовлетворительной линейности методики.

Установление прецизионности проводили по результатам анализа одного образца извлечения листьев вербены лимонной в 6 повторностях. Затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 4).

Таблица 4 - Результаты определения прецизионности

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109.5>

Навеска, г	Оптическая плотность	Найдено флавоноидов в пересчете на лютеолин (X, %)	Метрологические характеристики
0,984	0,700	1,381	X _{ср} =1,406% SD = 0,0143 RSD = 1,02%
1,004	0,731	1,414	
0,988	0,724	1,423	
1,010	0,728	1,400	
1,000	0,725	1,408	
0,994	0,720	1,407	

Из данных табл. 4 следует, что величина относительного стандартного отклонения составила 1,02%, что является удовлетворительным для данного метода.

Главным фактором, определяющим правильность методики, является значение систематической погрешности. Для определения правильности был выбран вариант, предлагаемый для биологических образцов, когда невозможно приготовить модельные смеси [10], [11], [12]. Правильность методики определяли методом добавок стандартного образца лютеолина к точной навеске сырья вербены лимонной (табл. 5). Для оценки полученных результатов использовали коэффициент открываемости (R), средняя величина которого должна находиться в пределах 100±5%. В разработанной методике критерий открываемости находился в пределах от 98,74% до 103,62%. Среднее его значение составило 100,95% (RSD=1,904%), что свидетельствует об удовлетворительной правильности методики количественного определения флавоноидов в листьях вербены лимонной.

Таблица 5 - Результаты определения правильности

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.109.6>

№ п/п	Флавоноиды, %	Добавлено лютеолина к 1 г сырья	Содержание флавоноидов, %		R, %	Метрологические характеристики
			Найдено	Расчет-ное		
1	1,406	0,005	1,975	1,906	103,62	R=100,95
2	1,406	0,0075	2,129	2,156	98,74	
3	1,406	0,01	2,432	2,406	101,08	
4	1,406	0,015	2,887	2,906	99,34	
5	1,406	0,02	3,411	3,406	100,15	
6	1,406	0,025	4,012	3,906	102,74	

Заключение

В результате проведенного исследования нами установлено присутствие в листьях вербены лимонной флоры Марокко лютеолина, апигенина, рутина; предложены оптимальные условия извлечения суммы флавоноидов из сырья (3-кратная экстракция 70%-ным этиловым спиртом этиловым в течение 45 мин при соотношении сырья и экстрагента 1:30); разработана методика количественного определения флавоноидов в листьях *Aloysia citriodora*; проведена валидационная оценка разработанной методики, которая показала, что разработанная валидна по показателям линейность, воспроизводимость и правильность и пригодна для оценки качества листьев вербены лимонной.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Гюльбякова, Х.Н. Исследование биологически активных веществ листьев вербены лимонной / Х.Н. Гюльбякова, В.В. Федотова, Ш. Дайа и др. // Беликовские чтения: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции, Пятигорск, 2020 год. – Пятигорск : Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2020. – С. 33-43
2. Гюльбякова Х.Н. Изучение флавоноидных соединений листьев вербены лимонной / Х.Н. Гюльбякова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сборник научных трудов. – Пятигорск : Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2021. – С. 156-160.
3. Гюльбякова Х.Н. Изучение травы белокудренника черного с целью создания новых лекарственных средств / Х.Н. Гюльбякова, С.Г. Тираспольская, Г.В. Алфимова и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – №5 (3). – С. 727- 730.
4. Смирнова М.М. Определение суммы флавоноидов в траве пиона / М.М. Смирнова, О.В. Яборова, Н.И. Накарякова и др. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12-1. – С. 164-168.
5. Гюльбякова Х.Н. Идентификация и количественное определение флавоноидов в траве яснотки пурпурной / Х.Н. Гюльбякова, О.И. Попова, В.М. Саджая // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Волгоград : Волгоградский государственный медицинский университет, 2013. – С. 43-44.
6. Гюльбяков Н.Р. Изучение корней софоры желтеющей как перспективного источника биологически активных веществ / Н.Р. Гюльбяков // Старт в науке. – 2020. – № 6.
7. Parodi T. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction / T. Parodi, A. Vargas, C. Krewer et al. // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2013. – Vol. 56. – № 2. – P. 283-292.
8. Ghedira K. Verveine odorante *Aloysia citriodora* Paláu (*Lippia citriodora*) / K. Ghedira, P. Goetz // Phytothérapie. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – DOI: 10.1007/s10298-017-1098-z.
9. Hashemi S.M.B. Extraction of essential oil of *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties / S.M.B. Hashemi, A. Mousavi Khaneghah, M. Koubaa et al. // Process Biochemistry. – 2017. – DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.020.
10. Shafiee F. Evaluation of the antibacterial effects of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Aloysia Citriodora* (Lemon verbena) on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* / F. Shafiee, A. Moghadamnia, Z. Shahandeh et al. // Electronic physician. – 2016. – Vol. 8. – № 12. – DOI: 8. 3363-3368. 10.19082/3363.
11. Kaisheva N.S. Research of surface-active properties of post-alcohol grain distillery dreg / N.S. Kaisheva, A.S. Kaishev, H.N. Gjulbyakova et al. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Voronezh. – Voronezh, 2021. – P. 052013. – DOI 10.1088/1755-1315/640/5/052013.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Gjul'bjakova H.N. Issledovanie biologicheskii aktivnykh veshchestv list'ev verbeny limonnoj [Investigation of biologically active substances of lemon verbena leaves] / H.N. Gjul'bjakova, V.V. Fedotova, Sh. Daja et al. // Belikovskie chteniya [Belikov readings]: materials of the VIII All-Russian Scientific and Practical Conference, Pyatigorsk, 2020. – Pjatigorsk : Advertising and information Agency on Kavminvody, 2020. – P. 33-43. [in Russian]
2. Gjul'bjakova H. N. Izuchenie flavonoidnykh soedinenij list'ev verbeny limonnoj [Study of flavonoid compounds of lemon verbena leaves] / H.N. Gjul'bjakova // Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoi produkcii [Development, research and marketing of new pharmaceutical products] : Collection of scientific papers. – Pjatigorsk : Advertising and information Agency on Kavminvody, 2021. – P. 156-160. [in Russian]
3. Gjul'bjakova H.N. Izuchenie travy belokudrennika chernogo s cel'ju sozdaniya novykh lekarstvennykh sredstv [The study of the herb of the black whitefish in order to create new medicines] / H.N. Gjul'bjakova, S.G. Tiraspol'skaja, G.V. Alfimova et al. // Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. – 2012. – Vol. 14. – №5 (3). – P. 727- 730. [in Russian]
4. Smirnova M.M. Opredelenie summy flavonoidov v trave pionia [Determination of the amount of flavonoids in peony grass] / M.M. Smirnova, O.V. Jaborova, N.I. Nakarjakova et al. // Fundamental'nye issledovaniya [Fundamental research]. – 2014. – № 12-1. – P. 164-168. [in Russian]
5. Gjul'bjakova H.N. Identifikacija i kolichestvennoe opredelenie flavonoidov v trave jasnotki purpurnoj [Identification and quantification of flavonoids in the grass of the purple jasnotka] / H.N. Gjul'bjakova, O.I. Popova, V.M. Sadjhaja // Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoi produkcii [Development, research and marketing of new pharmaceutical products]: collection of scientific papers. – Volgograd : Volgograd State Medical University, 2013. – P. 43-44. [in Russian]

6. Gjul'bjakov N.R. Izuchenie kornej sofory zheltejushhej kak perspektivnogo istochnika biologicheski aktivnyh veshhestv [The study of the roots of Sophora yellowing as a promising source of biologically active substances] / N.R. Gjul'bjakov // Start v nauke [Start in Science]. – 2020. – № 6. [in Russian]
7. Parodi T. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction / T. Parodi, A. Vargas, C. Krewer et al. // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2013. – Vol. 56. – № 2. – P. 283-292.
8. Ghedira K. Verveine odorante *Aloysia citriodora* Paláu (*Lippia citriodora*) / K. Ghedira, P. Goetz // Phytothérapie. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – DOI: 10.1007/s10298-017-1098-z.
9. Hashemi S.M.B. Extraction of essential oil of *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties / S.M.B. Hashemi, A. Mousavi Khaneghah, M. Koubaa et al. // Process Biochemistry. – 2017. – DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.020.
10. Shafiee F. Evaluation of the antibacterial effects of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Aloysia Citriodora* (Lemon verbena) on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* / F. Shafiee, A. Moghadamnia, Z. Shahandeh et al. // Electronic physician. – 2016. – Vol. 8. – № 12. – DOI: 8. 3363-3368. 10.19082/3363.
11. Kaisheva N.S. Research of surface-active properties of post-alcohol grain distillery dreg / N.S. Kaisheva, A.S. Kaishev, H.N. Gyulbyakova et al. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Voronezh. – Voronezh, 2021. – P. 052013. – DOI 10.1088/1755-1315/640/5/052013.