

УДК 615.07:633.31:54.062

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РОБІНІНУ В ЛИСТІ АКАЦІЇ БІЛОЇ

О.В.Демешко, С.В.Ковалев, С.М.Комісаренко

Національний фармацевтичний університет,
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: elitecomp@universal.kharkov.com

Ключові слова: акація біла; лист; робінін; кількісне визначення; ідентифікація

За допомогою колонкової хроматографії на поліамідному сорбенті із спиртової витяжки листя акації виділено флавоноїдний глікозид. На підставі вивчення УФ-, ІЧ- та ЯМР-спектрів, а також продуктів кислотного гідролізу його ідентифіковано як робінін. Хроматоспектрофотометричним методом у листі акації білої визначено вміст робініну, який склав 0,29%.

IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ROBININ IN THE LEAVES OF WHITE ACACIA
O.V.Demeshko, S.V.Kovalyov, S.N.Komissarenko

The flavonoid glycoside has been isolated from the ethanolic extract of white acacia leaves by the column chromatography on the polyamide sorbent. As a result of the study of UV-, IR- and NMR-spectra, as well as the acid hydrolysis products the substance has been identified as robinin. In white acacia leaves the robinin content has been determined by the chromatospectrophotometric method. The percentage of robinin is 0,29%.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ І КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОБІНІНА В ЛИСТЬЯХ АКАЦІИ БЕЛОЙ
О.В.Демешко, С.В.Ковалев, С.Н.Комиссаренко

Колоночной хроматографией на полиамидном сорбенте из спиртовой вытяжки листьев акации выделен флавоноидный гликозид. На основании изучения его УФ-, ИК- и ЯМР-спектров, а также продуктов кислотного гидролиза вещество идентифицировано как робинин. Хроматоспектрометрическим методом в листьях акации белой определено содержание робинина, которое составляет 0,29%.

Продовжуючи дослідження з вивчення біологічно активних речовин у листі акації білої [1-4], у даній роботі наводимо результати ідентифікації та кількісного визначення робініну.

Методом хроматографії на папері в системах н-бутанол — оцтова кислота — вода (4:1:2) та 15% розчин оцтової кислоти у спиртовій витяжці листя акації було знайдено біля 12 речовин флавоноїдної природи (речовини А-1 — А-12). За допомогою хроматографії на колонці поліамідного сорбенту (елюент — 15% етанол) із спиртової витяжки було виділено речовину А-1 у вигляді тонких ніжних голок із Т.пл. 192-194°C (з води).

Флавоноїдна природа речовини А-1 підтверджується ІЧ-спектрами, в яких відмічаються смуги поглинання в області 3400-3050 cm^{-1} (фенольні гідроксигрупи), 1660 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$, γ -пірону), 1590, 1520, 1490 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$, ароматичного кільця).

У процесі кількісного кислотного гідролізу (2% розчин сульфатної кислоти) одержали аглікон з Т.пл. 273-275°C, який був ідентифікований з кемпферолом, а в гідролізаті за допомогою хроматографії на папері зі зразками ідентифікували L-рамнозу та D-галактозу. Положення вуглеводних залишків та гідроксильних груп встановлювали вивченням УФ-спектрів речовини А-1 з іонізуючими та

комплексоутворюючими додатками [8-10]. В результаті було встановлено, що вуглеводні залишки знаходяться в положенні С-3, С-7, отже речовина А-1 є диглікозидом, так як в УФ-спектрі вихідної речовини, на відміну від спектра аглікону, не спостерігається батохромний зсув у присутності плавленого ацетату натрію. При гідролізі речовини А-1 0,5% розчином їдкого калію отримали кемпферол-3-робінобіозид і L-рамнозу.

У ПМР-спектрі глікозиду А-1 було знайдено сигнали протонів H-2' та H-6' (δ 8,13 м.ч., $J=8$ Гц), H-3' та H-5' (δ 6,92 м.ч., $J=8$ Гц), H-8 (δ 6,82 м.ч., $J=2,5$ Гц), H-6 (δ 6,47 м.ч., $J=2,5$ Гц) та дублети трьох аномірних протонів з величиною хімічного зсуву 5,58 м.ч. $J=1$ Гц; 5,37 м.ч. $J=6$ Гц і 4,46 м.ч. $J=1$ Гц, а також складний сигнал в області 4,0-2,7 м.ч., інтегральний підрахунок якого свідчить про наявність протонів трьох моносахарів. За величиною хімічного зсуву та константами спин-спінової взаємодії цукри ототожнили з двома молекулами рамнози і однією молекулою галактози. Наявність двох молекул рамнози підтверджується сигналом двох метильних груп при 1,17 м.ч.

Зміщення сигналу галактози у бік слабкого поля дозволяє зробити висновки, що вона зв'язана безпосередньо з агліконом. Аналогічно одна з

Таблиця 1

Результати визначення питомого показника поглинання робініну

Об'єм початкового розчину, мл	Концентрація робініну в розчині, мг	Оптична густина розчину, А	Питомий показник поглинання, $A_{1cm}^{1\%}$	Метрологічні характеристики
2,5	0,0005	0,122	244	
3,0	0,0006	0,143	238	
3,5	0,0007	0,167	239	
4,0	0,0008	0,195	244	$x = 241$ $\sigma = 3,1$ $\sigma_x = 1,26$ $J_{0,95} = 3,5$ $A = \pm 1,45\%$ $a = 241 \pm 3,5$
4,5	0,0009	0,216	240	
5,0	0,001	0,245	245	

молекул L-рамнози (σ 5,58 м.ч.) зв'язана з агліконом, а друга (σ 4,46 м.ч.) займає термінальне положення. Одержані результати, а також порівняння фізико-хімічних властивостей речовини A-1 дозволили ідентифікувати її з робініном.

Відомо, що робінін міститься у квітках акації і використовується в медичній практиці як гіпоазотемічний засіб [5]. Це й викликало інтерес до визначення його кількісного вмісту у листі акації.

Кількісне визначення проводили за допомогою хроматоспектрофотометричного методу. Вимірювання проводили при довжині хвилі, яка відповідала положенню довгохвильового максимуму поглинання робініну при 360 нм. Розрахунок здійснювали за допомогою питомого показника поглинання робініну, результати визначення якого наведені в табл. 1.

Як видно з даних, наведених у табл. 2, кількість робініну в листі акації становить $0,293 \pm 0,004\%$, що значно менше, ніж у квітках акації та в листі астрагалу серпоплодного [6].

Експериментальна частина

УФ-спектри знімали на пристрії СД-46 у кюветах з товщиною шару 10 мм, ПМР-спектри — на спектрометрі фірми з робочою частотою 100 мГц, температуру плавлення визначали на блоці "Boetius".

Виділення робініну. 1,3 кг повітряно-сухого листя акації екстрагували 13 л 70% спирту і спирто-водний розчин випарювали у вакуумі на роторному випарювачі до 1,3 л. Водний залишок обробляли рівним об'ємом хлороформу до знебарвлення, а очищений водний розчин очищали до концентрації сиропу і наносили на колонку поліамідного сорбенту (70х6 см). Флавоноїди елюювали водою і водним розчином спирту. Фракції відбирали по 100 мл. Контроль складу флавоноїдів здійснювали за допомогою хроматографії на папері в системі n-бутанол — оцтова кислота — вода (БОВ, 4:1:2). Хроматограму висушували на повітрі. Плями робініну на рівні зразка відмічали, розглядаючи в УФ-світлі, вирізали їх, додержуючись одного розміру в усіх дослідах. Кожну пляму вміщували в пеніцилінові склянки, заливали 3 мл 70% спирту, збовтували на вібраторі протягом 30 хв і вимірювали оптичну густину при 360 нм. Розчином для порівняння був елюат з чистої смуги хроматограми, яку вирізали на рівні робініну. Процентний вміст розраховували за формулою:

Таблиця 2

Результати кількісного визначення робініну в листі акації

Об'єм витяжки, нанесеної на хроматограму, мл	Оптична густина, А	Масова частка, %	Метрологічні характеристики
0,10	0,217	0,293	
0,10	0,216	0,292	
0,10	0,213	0,287	
0,10	0,219	0,295	
0,10	0,220	0,297	
0,10	0,219	0,295	

105°C у вакуум-пістолеті над P₂O₅ флавоноїд мав Т.пл. 192-194°C.

Визначення питомого показника поглинання робініну. Близько 20 мг (точна наважка) робініну розчиняли в мірній колбі на 100 мл в 70% спирті, доводили об'єм до мітки і відбирали 6 фракцій, починаючи з 2,5 мл з інтервалом 0,5 мл (див. табл. 1). Кожну фракцію вміщували в мірній колбі на 10 мл, доводили 70% спиртом до мітки і визначали величину оптичної густини розчину. Значення питомого показника поглинання розраховували за формулою [7]:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{C},$$

де: А — величина оптичної густини;
С — концентрація у г/100 мл розчину.

Результати визначення наведені в табл. 1.

Кількісне визначення робініну в листі акації. 5,0 г (середня проба) подрібненого повітряно-сухого листя поміщали в колбу, заливали 50 мл 70% спирту, зважували, з'єднували зі зворотним ходильником і нагрівали на киплячому водяному огорівнику протягом двох годин. Після охолодження колбу зважували, доводили до початкової маси 70% спиртом і залишали на годину. Розчин фільтрували і наносили на аркуші паперу для хроматографії (Filtrak FN №4) точки на відстані 3 см одна від одної та від краю листа мікропіпеткою по 0,1 мл і хроматографували в системі n-бутанол — оцтова кислота — вода (БОВ, 4:1:2). Хроматограму висушували на повітрі. Плями робініну на рівні зразка відмічали, розглядаючи в УФ-світлі, вирізали їх, додержуючись одного розміру в усіх дослідах. Кожну пляму вміщували в пеніцилінові склянки, заливали 3 мл 70% спирту, збовтували на вібраторі протягом 30 хв і вимірювали оптичну густину при 360 нм. Розчином для порівняння був елюат з чистої смуги хроматограми, яку вирізали на рівні робініну. Процентний вміст розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot V_2 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot m \cdot V_1 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

де: А — оптична густина досліджуваного розчину;
V — об'єм початкового екстракту, мл;
V₁ — об'єм екстракту, який наносили на хроматограму, мл;
V₂ — об'єм елюату, який одержали з плями хроматограми, мл;
A^{1%}_{1cm} — питомий показник поглинання робініну;
т — наважка, г;
W — втрата у масі при висушуванні сировини, %.

Результати визначення наведені у табл. 2.

Висновки

1. За допомогою колонкової хроматографії на поліамідному сорбенті із спиртової витяжки листя акації виділено флавоноїдний глікозид. На підставі вивчення УФ-, ІЧ- та ЯМР-спектрів, а також продуктів кислотного гідролізу його ідентифіковано як робінін.
2. Хроматоспектрофотометричним методом у листі акації білої визначено вміст робініну, який склав 0,29%.

Література

1. Демешко О.В., Журавель І.О., Комісаренко А.М. // Вісник фармації. — 2004. — №2. — С. 23-26.
2. Демешко О.В., Комісаренко А.М. // Фармаком. — 2004. — №4. — С. 54.
3. Демешко О.В., Комісаренко А.М. // Матер. всеукр. науково-практич. семінару "Перспективи створення в Україні лікарських препаратів різної спрямованості дії". — Х.: Вид. ІРАУ, 2004. — С. 245.
4. Демешко О.В., Комісаренко А.М., Ковальова А.М. Створення, виробництво, стандартизація, фармацеекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок. — Тернопіль, 2004. — С. 95-97.
5. А.с. 624633 (СССР) A 61 K 35/78 Способ получения триозидов, обладающих гипоазотическим действием. Фларонин / Н.П. Максютина.
6. Алания М.Д., Кемертиlidзе П., Комісаренко Н.Ф. Флавоноиды некоторых видов *Astragalus L.* флоры Грузии. — Тбілісси: Мецниереба, 2002. — 151 с.
7. Государственная фармакопея СССР. — 11-е изд. — Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
8. Harborne J., Mabry T., Mabry J. The flavonoids. — London, 1982. — 744 p.
9. Marby T.J., Markham K.R., Thomas M.B. The systematic identification of flavonoids — Springer-Verlag Berlin — Heidelberg — New-York, 1990. — 355 p.
10. The chemistry of flavonoid compounds / Ed. by T.A. Geissman. — Oxford — London — New-York — Paris: Pergamon press, 1992. — 666 p.

Надійшла до редакції 21.03.2005 р.