

## Количественное определение флавоноидов ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*)

Хоссам М. Элькаиб<sup>1</sup>    xycam83@mail.ru  
Виктор Н. Леонтьев<sup>1</sup>    leontiev@belstu.by  
Павел Н. Саввин<sup>2</sup>        pashkasavvin@yandex.ru

<sup>1</sup> Белорусский государственный технологический университет, ул. Свердлова, 13а, г. Минск, 220006, Белорусия

<sup>2</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

**Реферат.** Широкое применение биофлавоноидов, обусловленное их противомикробной активностью и антиоксидантными свойствами, вызывает необходимость их отдельного определения при совместном присутствии. При этом отмечается, что суммарное содержание флавоноидов, определенное разными спектрофотометрическими методами в одних и тех же образцах, различается и зависит от структуры индивидуальных флавоноидов, входящих в состав образцов. В работе представлены результаты исследований по определению содержания флавоноидов во фракции сухого экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*), обладающей антимикробной активностью по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, вызывающим порчу белоксодержащих пищевых продуктов. Выделение флавоноидов проводили последовательным экстрагированием водно-спиртовыми растворами, фильтрованием и растворением сухого остатка в изопропиловом спирте с последующим пропусканием через слои геля. Рассмотрены следующие методики определения флавоноидов: реакция с реактивом Фолина-Чикальтеу (с использованием в качестве стандарта кверцетина), реакция с хлоридом алюминия и с 2,4-динитрофенилгидразином. При окислении в щелочной среде реактивом Фолина-Чикальтеу, представляющим собой фосфо-молибдодвольфрамовые гетерополикомплексы флавонолы, флавин-3-олы и флавоны могут превращаться в хиноидные соединения, имеющие полосы поглощения в видимой области спектра. Взаимодействовать с  $AlCl_3$  могут только флавонолы и флавоны, имеющие гидроксильные группы в положениях 3 и 5. 2,4-динитрофенилгидразин взаимодействует только с флавонолами. Приведены полученные калибровочные кривые и структурные формулы флавоноидов, которые могут быть определены представленными методами. Установлено, что в нем содержится флавонолов – 0,21 мг/мг, флавонов – 0,17 мг/мг и флавин-3-олов – 0,06 мг/мг.

**Ключевые слова:** флавоноиды, ладанник шалфеелистный, бактерии рода *Pseudomonas*

## Quantitative determination of sage-leaved rockrose (*Cistus salviifolius*) flavonoids

Hossam M. Elkaib<sup>1</sup>    xycam83@mail.ru  
Viktor N. Leontiev<sup>1</sup>    leontiev@belstu.by  
Pavel N. Savvin<sup>2</sup>        pashkasavvin@yandex.ru

<sup>1</sup> Belarusian State Technological University, Sverdlova str., 13a, Minsk, 220006, Republic of Belarus

<sup>2</sup> Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

**Summary.** The widespread use of bioflavonoids, due to their antimicrobial activity and antioxidant properties, necessitates their separate determination in a joint presence. It is noted that the total content of flavonoids, determined by different spectrophotometric methods in the same samples, differs and depends on the structure of the individual flavonoids that make up the samples. The paper presents the results of studies to determine the content of flavonoids in the fraction of the dry extract of shalfeeloid canthus (*Cistus salviifolius*), which has antimicrobial activity against bacteria of the genus *Pseudomonas*, which causes damage to protein-containing food products. Curing flavonoids by sequential extraction with aqueous alcohol solutions, filtering and dissolving the dry residue in isopropyl alcohol followed by passing through the gel layers. The following methods for the determination of flavonoids are considered: reaction with Folin-Chikalteu reagent (using quercetin as standard), reaction with aluminum chloride and 2,4-dinitrophenylhydrazine. When oxidized in alkaline medium by the Folin-Chikalteu reagent, which is the phospho-molybdotungstate heteropolycomplexes of flavonols, flavin-3-ol and flavones can be converted into quinoid compounds having absorption bands in the visible region of the spectrum. Only flavones and flavones having hydroxyl groups at positions 3 and 5 can interact with  $AlCl_3$ . 2,4-dinitrophenylhydrazine only interacts with flavonols. The obtained calibration curves and structural formulas of flavonoids are given, which can be determined by the methods presented. It was found to contain flavonols 0.21 mg / mg, flavones 0.17 mg / mg and flavin-3-ol 0.06 mg/mg.

**Keywords:** flavonoids, sage faucet, bacteria of the genus *Pseudomonas*

### Введение

Флавоноиды – биологически активные органические вещества, обнаруживаемые в различных растениях, в том числе, и лекарственных [1].

Они находят широкое применение в производстве лекарственных средств в виде индивидуальных соединений [2, 3], экстрактов растительного сырья или измельченных частей растений [4]. В связи с этим достаточно хорошо

разработаны такие методы идентификации и количественного определения флавоноидов, как хроматографические методы – ТСХ [5], ГЖХ [6], ВЭЖХ [7], спектрофотометрические [8] и другие.

Для определения суммарных флавоноидов широкое применение нашли простые и широкодоступные спектрофотометрические методы. Однако суммарное содержание флавоноидов,

Для цитирования

Элькаиб Х. М., Леонтьев В. Н., Саввин П. Н. Количественное определение флавоноидов ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) // Вестник ВГУИТ. 2017. Т. 79. № 1. С. 271–275. doi:10.20914/2310-1202-2017-1-271-275

For citation

Elkaib H. M., Leontiev V. N., Savvin P. N. Quantitative determination of sage-leaved rockrose (*Cistus salviifolius*) flavonoids. Vestnik VGUIT [Proceedings of VSUET]. 2017. Vol. 79. no. 1. pp. 271–275. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2017-1-271-275

определенные разными спектрофотометрическими методами в одних и тех же образцах, различается и зависит от структуры индивидуальных флавоноидов, входящих в состав образцов.

Ранее нами было установлено, что спиртовой экстракт ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) обладает антимикробной активностью по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, вызывающим порчу белоксодержащих пищевых продуктов [9]. Однако наличие и количественное содержание флавоноидов в этом экстракте не было установлено.

В связи с этим целью настоящей работы явилось количественное определение флавоноидов в спиртовом экстракте ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) разными спектрофотометрическими методами.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлась фракция спиртового экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*), обладающая антимикробной активностью по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, вызывающим порчу белоксодержащих пищевых продуктов.

Навеску измельченного сырья массой 1 г заливали 20 мл 50% этилового спирта и проводили экстракцию при 20 °С и периодическом перемешивании в течение суток. Полученный экстракт отделяли фильтрованием на фильтре Шотта. Растворитель упаривали на ротаторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 50% изопропиловом спирте и пропускали через слой геля Sephadex LH-60 на фильтре Шотта. Прошедшую через гель фракцию желто-зеленого цвета упаривали досуха и полученный темно-коричневый порошкообразный сухой экстракт, обладающий антимикробной активностью, использовали в работе. Бордовая часть экстракта, адсорбированная на Sephadex LH-60, не обладала антимикробной активностью и нами не использовалась [9].

### Методики определения флавоноидов

1. Реакция с реактивом Фолина-Чикальтеу. В качестве стандарта использовали кверцетин (Sigma, США). Для построения калибровочной кривой готовили растворы кверцетина в дистиллированной воде с концентрациями 0,075; 0,15; 0,25 и 0,5 мг/мл.

Реактив Фолина-Чикальтеу (Sigma, США) разбавляли дистиллированной водой в 10 раз для получения раствора. Для создания щелочной среды использовали 20% раствор карбоната натрия. Сухой экстракт ладанника шалфеелистного растворяли в дистиллированной воде (0,5 мг/мл).

Для построения калибровочной кривой и определения флавоноидов в экстракте ладанника шалфеелистного к 2 мл раствора кверцетина или раствора сухого экстракта приливали 0,3 мл 0,2 н раствора Фолина-Чикальтеу, 3 мл 20% раствора карбоната натрия. Смесь инкубировали при комнатной температуре 15–20 минут, измеряли экстинкцию при 765 нм против контрольной пробы, в которой растворы кверцетина или сухого экстракта были заменены дистиллированной водой.

Полученная калибровочная кривая представлена на рисунке 1.

2. Реакция с хлоридом алюминия. Для проведения исследований готовили 10% раствор  $AlCl_3$  в этиловом спирте, 1 М раствор ацетата калия в дистиллированной воде. В качестве стандарта использовали кверцетин, который растворили в 50% этиловом спирте. Сухой экстракт ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) растворяли в этом же растворителе.

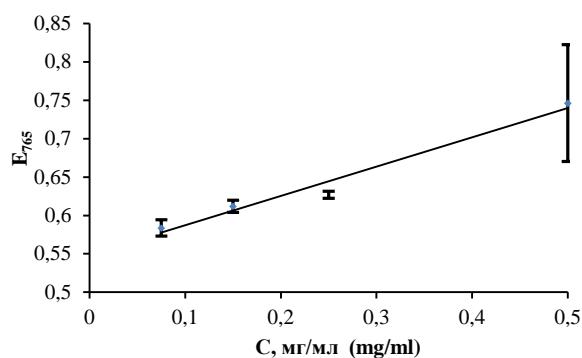


Рисунок 1. Калибровочная кривая для определения содержания флавоноидов

Figure 1. Calibration curve for determining flavonoids content

Для построения калибровочной кривой и количественного определения флавоноидов и флавонов, имеющих гидроксильные группы в положениях 3 и 5 в экстракте ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*), к 0,5 мл раствора кверцетина с концентрациями 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 мг/мл или раствора экстракта ладанника шалфеелистного с концентрацией 0,5 мг/мл приливали при интенсивном перемешивании 1,5 мл этилового спирта (96%), 1 мл раствора  $AlCl_3$ , 1 мл раствора ацетата калия и 2,8 мл дистиллированной воды. Инкубировали при температуре 20 °С в течение 30 минут и измеряли экстинкцию при 410 нм против контрольной пробы, в которой раствор  $AlCl_3$  был заменен дистиллированной водой.

Полученная калибровочная кривая представлена на рисунке 1.

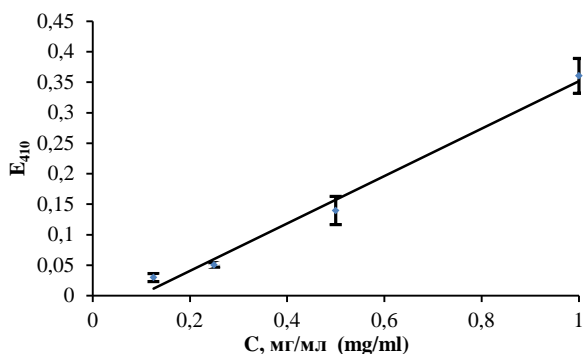


Рисунок 2. Калибровочная кривая для определения флавонолов и флавонов имеющих гидроксильные группы в положениях 3 и 5

Figure 2. Calibration curve for flavonols and flavones having hydroxyl groups at positions 3 and 5 determination

3. Реакция с 2,4-динитрофенилгидразином. Готовили 1% раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 80% этиловом спирте. В качестве стандарта использовали нарингин (Sigma, США), растворы которого с концентрациями 0,5; 1,0 и 2,0 мг/мл готовили в этиловом спирте. Сухой экстракт ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) растворяли в 50% этиловом спирте (концентрация 3 мг/мл).

Для построения калибровочной кривой и определения содержания флавоноидов к 1 мл раствора нарингина или раствора сухого экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) приливали 2 мл 1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина и 2 мл этилового спирта. Полученные смеси инкубировали 50 минут при 50 °С. Затем пробы охлаждали до комнатной температуры, приливали при интенсивном перемешивании по 5 мл 1% раствора КОН в 70% этиловом спирте. Через 2 минуты по 1 мл смеси из каждой пробы вносили в 5 мл этилового спирта, интенсивно перемешивали и измеряли экстинкцию при 495 нм против контроля, в котором раствор 2,4-динитрофенилгидразина был заменен 80% этиловым спиртом.

Полученная калибровочная кривая представлена на рисунке 1.

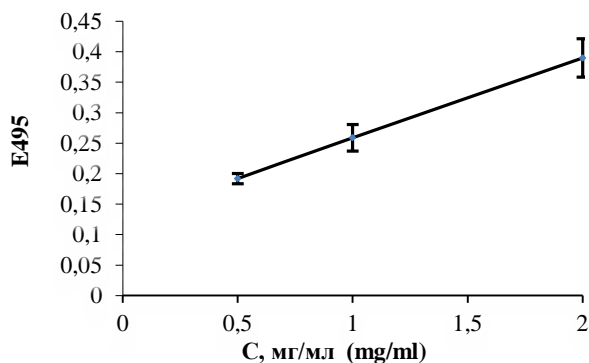
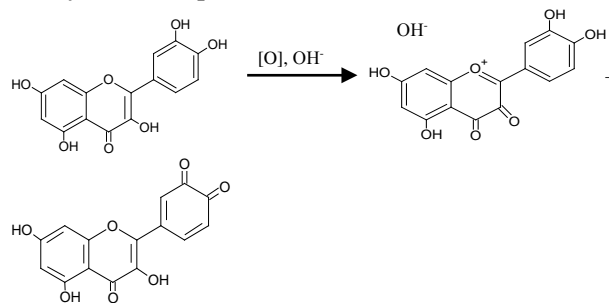


Рисунок 3. Калибровочная кривая для определения содержания флавонолов

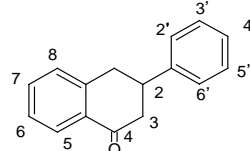
Figure 3. Calibration curve for determining flavonols content

### Обсуждение результатов

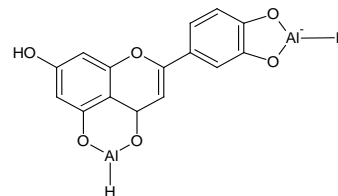
При окислении в щелочной среде реактивом Фолина-Чикальтеу, представляющим собой фосфомолибдовольфрамовые гетерополикомплексы флавонолы, флавин-3-олы и флавоны могут превращаться в хиноидные соединения, имеющие полосы поглощения в видимой области спектра. Например, кверцетин может окисляться следующим образом:



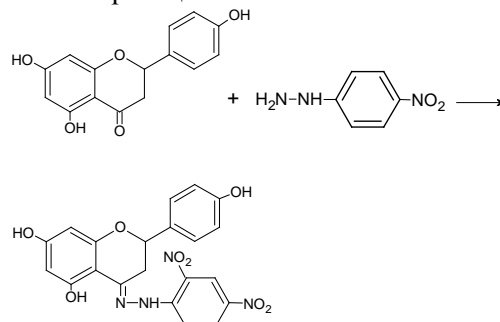
Взаимодействовать с  $AlCl_3$  могут только флавонолы и флавоны, имеющие гидроксильные группы в положениях 3 и 5.



В этом случае соли Al образуют комплексные соединения, имеющие характерные полосы поглощения в области 410–430 нм.



2,4-динитрофенилгидразин взаимодействует только с флавонолами по следующему уравнению реакции:



При этом образуются замещенные 2,4-динитрофенилгидразоны, имеющие максимумы поглощения при 495 нм.

Проведенные нами исследования показали, что общее содержание флавоноидов в экстракте ладанника шалфеелистного в пересчете на кверцетин (взаимодействие с реактивом Фолина-Чикальтеу) составило  $0,44 \pm 0,05$  мг/мг сухого экстракта. Содержание флавоноидов в пересчете

на ниренгин по реакции с 2,4-динитрофенил гидразином составило  $0,21 \pm 0,03$  мг/мг сухого экстракта, а содержание флавонолов и флавонов

(по реакции с хлоридом алюминия) оказалось равным  $0,38 \pm 0,04$  мг/мг сухого экстракта ладанника шалфеелистного (таблица 1).

Содержание флавоноидов в сухом экстракте ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*)

Таблица 1.

Table 1.

Cedar almond (*Cistus salvifolius*) dry extract flavonoids content

№	Флавоноиды Flavonoids	Содержание, мг/мг Content, mg/mg	Метод Method
1	Флавонолы, флавин-3-олы, флавоны Flavonols, flavin-3-ol, flavones	$0,44 \pm 0,05$	Реакция Фолина-Чикольтеу Folin-Chikolteu reaction
2	Флавонолы, флавоны Flavonols, flavones	$0,38 \pm 0,04$	Реакция с $AlCl_3$ Reaction with $AlCl_3$
3	Флавонолы Flavonols	$0,21 \pm 0,03$	Реакция с 2,4 – динитрофенил-гидразином Reaction with 2,4-dinitrofenilhydrazin

### Заклучение

Представленные в таблице 1 результаты позволяют сделать вывод, что в сухом экстракте

ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) содержится флавонолов –  $0,21$  мг/мг, флавонов –  $0,17$  мг/мг, флавин-3-олов –  $0,06$  мг/мг.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Kumar Sh., Pandey K. A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview // The Scientific World Journal. 2014. P. 201-216.
- 2 Reda S. Mohammed et al. Antioxidant, anti-micro-bial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves // Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2015. V. 5 (06). P. 138-147.
- 3 Sridevi Sangeetha K.S., Umamaheswari S., Uma Maheswara Reddy C., Narayana Kalkura S. Flavonoids: Therapeutic Potential Of Natural Pharmacological Agents // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2016. V. 7(10). P. 3924–3930.
- 4 Chungang C., Fengxia H., Yang L. Optimization of the extraction of flavonoids from clovers by response surface methodology (RSM) // Journal of Medicinal Plants Research. 2012. V. 6(37). P. 5103–5106.
- 5 Loretta P.O., Daniel G., Maria E.Ž., Małgorzata S. et al. TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum* // Acta Pharm. 2016. V. 66. P. 543–554.
- 6 Armatu A., Bodirlau R., Nechita C.B., Nicu-laua M. et al. Characterization Of Biological Active Compounds From *Verbascum Phlomoides* By Chromatography Techniques. I. Gas Chromatography // Romanian Biotechnological Letters. 2011. V. 16. № 4. P. 6297–6304.
- 7 Vinayagam A., Sudha P. N. Separation and Identification of Phenolic Acid and Flavonoids from *Nerium indicum* Flowers // Indian J. Pharm. Sci. 2015. №77(1). P. 91-95.
- 8 Gjoshe S., Marija K., Marina S., Vassya B. et al. HPLC and UV-spectrophotometry analysis of flavonoids in spray-dried and freeze-dried extracts of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae) // Maced. pharm. bull. 2012. V. 58 (1, 2). P. 39–44.
- 9 Элькаиб Х.М., Леонтьев В.Н. Ингибирование роста бактерий рода *Pseudomonas* растительными экстрактами // Труды БГУ. 2015. Т. 10(1). С. 104–106.

### REFERENCES

- 1 Kumar Sh., Pandey K. A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview [The Scientific World Journal] 2014. pp. 201-216.
- 2 Reda S. Mohammed et al. Antioxidant, anti-micro-bial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves [Journal of Applied Pharmaceutical Science] 2015. vol. 5 (06). pp. 138-147.
- 3 Sridevi Sangeetha K.S., Umamaheswari S., Uma Maheswara Reddy C., Narayana Kalkura S. Flavonoids: Therapeutic Potential Of Natural Pharmacological Agents [International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research] 2016. vol. 7(10). pp. 3924–3930.
- 4 Chungang C., Fengxia H., Yang L. Optimization of the extraction of flavonoids from clovers by response surface methodology (RSM) [Journal of Medicinal Plants Research] 2012. vol. 6(37). pp. 5103–5106.
- 5 Loretta P.O., Daniel G., Maria E.Ž., Małgorzata S. et al. TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum* [Acta Pharm] 2016. vol. 66. pp. 543–554.
- 6 Armatu A., Bodirlau R., Nechita C.B., Nicu-laua M. et al. Characterization Of Biological Active Compounds From *Verbascum Phlomoides* By Chromatography Techniques. I. Gas Chromatography [Romanian Biotechnological Letters] 2011. vol. 16. no 4. pp. 6297–6304.
- 7 Vinayagam A., Sudha P. N. Separation and Identification of Phenolic Acid and Flavonoids from *Nerium indicum* Flowers [Indian J. Pharm. Sci.] 2015. no. 77(1). pp. 91-95 .
- 8 Gjoshe S., Marija K., Marina S., Vassya B. et al. HPLC and UV-spectrophotometry analysis of flavonoids in spray-dried and freeze-dried extracts of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae) [Maced. pharm. bull.] 2012. vol. 58 (1, 2). pp. 39–44.
- 9 Elkaib H.M., Leontiev V.N. Growth Inhibition Of Bacteria From Genus *Pseudomonas* By Plant Extracts. *Trudy BGU* [Proceedings of the BSU] 2015. vol. 10(1). pp. 104–106. (in Russian)

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**

**Хоссам М. Элькаиб** аспирант, кафедра биотехнологии и биоэкологии, Белорусский государственный технологический университет, ул. Свердлова, 13а, г. Минск, 220006, Белоруссия, хусам83@mail.ru

**Виктор Н. Леонтьев** к. х. н., доцент, заведующий кафедрой, кафедра биотехнологии и биоэкологии, Белорусский государственный технологический университет, ул. Свердлова, 13а, г. Минск, 220006, Белоруссия, leontiev@belstu.by

**Павел Н. Саввин** к. т. н., доцент, кафедра химии и химической технологии органических соединений и переработки полимеров, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, pashkasavvin@yandex.ru

**КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА**

**Хоссам М. Элькаиб** обзор литературных источников по исследуемой проблеме, провёл эксперимент, выполнил расчёты

**Виктор Н. Леонтьев** написал рукопись, корректировал её до подачи в редакцию и несёт ответственность за плагиат

**Павел Н. Саввин** консультация в ходе исследования

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ПОСТУПИЛА 12.01.2017**

**ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 15.02.2017**

**INFORMATION ABOUT AUTHORS**

**Hossam M. Elkaib** graduate student, biotechnology and bioecology department, Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus, хусам83@mail.ru

**Viktor N. Leontiev** candidate of chemical sciences, associate professor, head of the department, biotechnology and bioecology department, Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus, leontiev@belstu.by

**Pavel N. Savvin** doctor of chemical sciences, professor, chemistry and chemical technology of organic compounds and polymer processing department, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, pashkasavvin@yandex.ru

**CONTRIBUTION**

**Hossam M. Elkaib** review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, performed computations

**Viktor N. Leontiev** wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

**Pavel N. Savvin** consultation during the study

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**RECEIVED 1.12.2017**

**ACCEPTED 2.15.2017**