

Flavonoidų kiekio tyrimas vienapiestės gudobelės vaistinėje augalinėje žaliavoje

Valdas Jakštas, Valdimaras Janulis, Juozas Labokas¹, Saulius Kazlauskas²,
Raimondas Benetis, Genė Puodžiūnienė

Kauno medicinos universiteto Farmacinės chemijos ir farmakognozijos katedra,

¹Botanikos instituto Ekonominės botanikos laboratorija,

²Kauno medicinos universiteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra

Raktažodžiai: gudobelė, lapai, žiedai, vaisiai, flavonoidai.

Santrauka. Vienapiestės gudobelės žiedai, lapai ir vaisiai naudojami kardiotoninams, vainikinę kraujotaką gerinantiems ir hipotensiniams vaistams gaminti. Flavonoidų kiekis gudobelės žaliavoje yra vienas žaliavos kokybės požymių.

Tikslas. Nustatyti galimus flavonoidų kiekio skirtumus įvairiuose Lietuvos regionuose skirtingu metų laikų surinktuose vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos pavyzdžiuose.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Keliuose Lietuvos regionuose surinkti vaistinės augalinės žaliavos bandiniai buvo ekstrahuojami 96 proc. etanoliiu, flavonoidai nustatomi spektroskopškai bei didelio slėgio skysčių chromatografija.

Rezultatai. Lapuose ir žieduose flavonoidų rasta nuo 0,77 iki 2,80 proc.; hiperozido – nuo 0,16 iki 0,87 proc.; viteksino-o-ramnozido 0,14–0,40 proc.; rutino 0,10–0,19 proc. Didžiausias flavonoidų kiekis nustatytas vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos ėminiuose, rinktuose žydėjimo metu; nustatytas suminio flavonoidų kiekio mažėjimas žieduose ir lapuose nuo gegužės iki rugpjūčio (koreliacijos koeficiento realizacija $r=-0,90$). Hiperozido kiekis didžiausias vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos ėminiuose, rinktuose žydėjimo metu; nustatytas hiperozido kiekio mažėjimas žieduose ir lapuose nuo gegužės iki rugpjūčio ($r=-0,94$). Rutino ir viteksino-o-ramnozido kiekiai žieduose mažesni negu lapuose; lapuose nustatytas šių flavonoidų kiekio mažėjimas nuo gegužės iki rugpjūčio. Vaisiuose flavonoidų nustatyta nuo 0,09 iki 0,24 proc.

Išvada. Įvairiuose Lietuvos regionuose gegužės – liepos mėnesiais gali būti ruošiama kokybiška vienapiestės gudobelės vaistinė augalinė žaliava; žydėjimo laikotarpiu rinktoje žaliavoje nustatyti didžiausi biologiškai aktyvių junginių kiekiai.

Įvadas

Vienapiestės gudobelės rūšis *Crataegus monogyna* Jacq. priklauso gudobelės genčiai *Crataegus* L., kuri priklauso erškėtinių šeimai *Rosaceae* Juss. (1). Vienapiestės gudobelės *Crataegus monogyna* Jacq. žiedai *Flore*, lapai *Folium* ir vaisiai *Fructus* yra vaistinė augalinė žaliava, aprašoma daugelyje farmakopėjų (2–4). Pagrindinės biologiškai aktyvios medžiagos, nustatytos vienapiestės gudobelės vaistinėje augalinėje žaliavoje – tai flavonoidai ir jų glikozidai: hiperozidas (kvercetin-3-galaktozidas), kvercetas, viteksinas, viteksin-o-ramnozidas, izoviteksin-o-ramnozidas, acetilviteksin-o-ramnozidas, rutinas, kvercitrinas (kvercetin-3-ramnozidas), orientinas, kempferolis, spireozidas, saponaretinas, pinatifidinas, šaftozidas, oligomeriniai

procianidinai, cianogeninis glikozidas leukocianidin-biozidas, katechinai, fenolinės rūgštys: chlorogeno rūgštis, kavos rūgštis, triterpeniniai saponinai, cholinai, trimetilaminai, kumarinai, terpenoidai, riebalų rūgštys, β-sitosterinas, raugai (2–8). Gudobelės žiedų, lapų ir vaisių preparatai pasižymi širdį tonizuojančiu poveikiu, iš šių žaliavų ruošiamos arbatos, gaminami sausi ir skysti ekstraktai, užpilai, tinktūros, sultys. Gauti preparatai vartojami esant I ir II laipsnio (pagal NYHA – Niujorko širdies asociacijos patvirtintą skalę) širdies veiklos funkciniais sutrikimams bei po sunkių širdies veiklą sutrikdžiusių ligų padidėjus kraujospūdžiui (5–7, 9, 10). Vienas pagrindinių parametrų, kuriuo remiantis vertinama gudobelės vaistinė augalinės žaliavos kokybė yra flavonoidų ir jų glikozidų kiekis džiovin-

toje žaliavoje (3, 4). Ištyrus Lietuvoje augančių viena-piestės gudobelės fenotipų lapuose ir žieduose bei vaisiuose sukauptą flavonoidų kiekį, galima būtų įvertinti skirtinguose Lietuvos regionuose renkamos gudobelės vaistinės augalinės žaliavos fitocheminės sudėties kiekybinius ir kokybinius skirtumus, žaliavos rinkimo sąlygas bei gauti informacijos apie biologiškai aktyvių junginių kaupimąsi vaistinių augalų generatyviniuose ir vegetatyviniuose organuose bei šių junginių kiekybinius ir kokybinius kitimus vegetacijos laikotarpiu.

Tyrimo tikslas. Nustatyti galimus flavonoidų kiekio skirtumus įvairiuose Lietuvos regionuose skirtingu vegetacijos laikotarpiu (gegužės – rugsėjo mėnesiais) paimituose vienapiestės gudobelės *Crataegus monogyna* Jacq. žiedų, lapų ir vaisių ėminiuose bei įvertinti galimybę skirtinguose Lietuvos Respublikos regionuose ruošti kokybiškas vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos paruošas.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Vienapiestės gudobelės *Crataegus monogyna* Jacq. žydinčios šakelių viršūnės (skėtiniai žiedynai su lapais), lapai ir vaisiai (2, 3) surinkti 2001 metų gegužės – rugsėjo bei 2002 metų gegužės mėnesiais įvairiuose Lietuvos Respublikos regionuose: Šušvės ir Minijos upių, Dusios ežero bei Vilniaus miesto apylinkėse. Fitocheminiams tyrimams naudota džiovinta žaliava, neturinti išorinių pažeidimo požymių.

Iki 0,10–0,30 cm dalelių susmulkinta žaliava ekstrahuojama 96 proc. etanolio „Soksleto“ tipo aparate. Gautas ekstraktas koncentruojamas vakuuminio garinimo aparatu, matavimo kolboje skiedžiamas 40 proc. (V/V) etanolio iki 50 ml. Gautas tirpalas naudojamas suminiam flavonoidų kiekiui nustatyti. Bendras flavonoidų kiekis (atitinkantis rutino kiekį) nustatomas ekstraktą veikiant aliuminio chlorido R tirpalu rūgščioje terpėje. Gautas flavonoidų ir aliuminio tirpalas analizuojamas spektrofotometriškai (bangos ilgis 407 ± 2 nm); duomenys įvertinti pagal absorbcijos koeficiento dydį, jie lyginami su rutino standartinio tirpalo absorbcijos koeficientu (3, 8, 11). Pagrindinių žaliavoje sukauptų flavonoidų kiekiai nustatyti didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu (2, 8, 11).

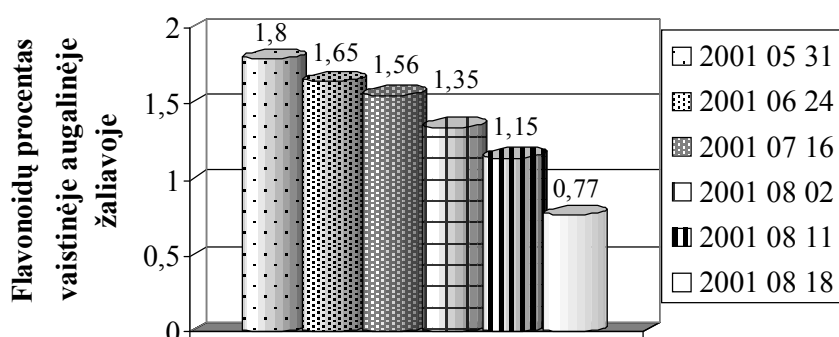
Nuodžiūvis (bendras drėgmės ir lakių junginių kiekis) džiovintoje žaliavoje įvertintas palikus žaliavą džiovinimo spintoje iki visiško vandens ir lakių junginių išgaravimo (temperatūra – 100–105°C, masės skirtumas tarp svėrimų iki 0,01 g) (3).

Rodmenys statistiškai įvertinti apskaičiuojant matematinį vidurkį bei gautų vidurkių koreliacijos koeficiento taškinį įvertį (12).

Rezultatai ir jų aptarimas

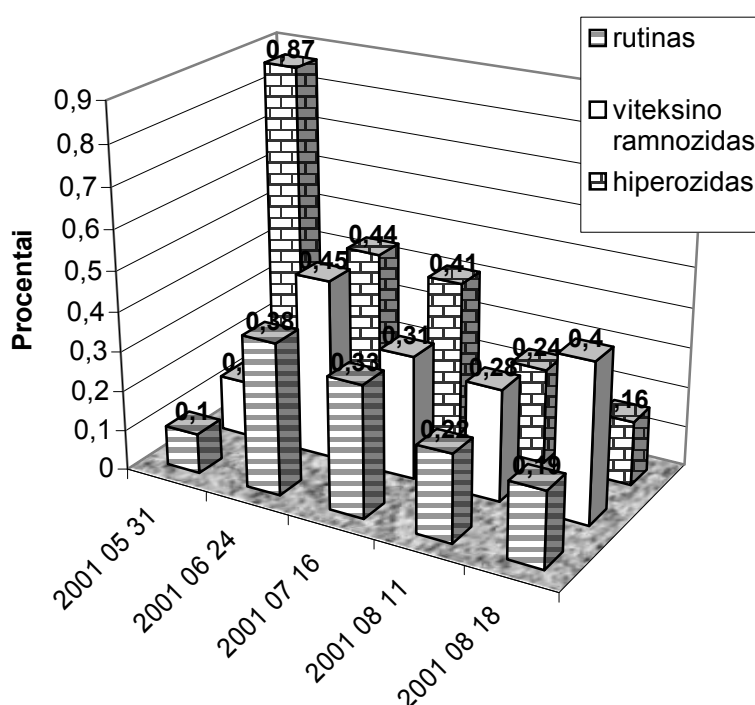
2001 metais vienapiestės gudobelės vaistinė augalinė žaliava rinkta Ventos, Šušvės, Dusios ežero apylinkėse; atliktų tyrimų rezultatai jau skelbti spaudoje (8). Nustatytas flavonoidų suminis kiekis (perskaičiuotas rutinu visiškai sausai žaliavai) Ventos regiono populiacijos fenotipų žaliavos bandiniuose sudarė nuo 1,30 iki 1,73 proc., Šušvės regiono – 1,47–2,77 proc., Dusios – 1,03–1,45 proc. 2002 metais vaistinė augalinė žaliava rinkta nuo perspektyvios Šušvės populiacijos šešių fenotipų. Šiuose žaliavos ėminiuose nustatytas suminis flavonoidų kiekis (perskaičiuotas rutinu visiškai sausai žaliavai) sudarė: 1,34, 1,56, 1,78, 2,10, 2,13 ir 2,80 proc. visiškai sausai žaliavai. Pagal 2001 metų Europos farmakopėją flavonoidų kiekis gudobelės žiedų ir lapų vaistinėje žaliavoje turi būti ne mažesnis kaip 1,50 proc. (2). Tik vieno iš tirtų žaliavos ėminių kokybė neatitinka šio Europos farmakopėjos reikalavimo (vieno pavyzdžio iš trijų 2001 metais rinktų šiame regione taip pat šio reikalavimo neatitiko), todėl galima teigti, jog nuo didžiosios dalies Šušvės upės populiacijos fenotipų galima rinkti vaistinę augalinę žaliavą, tenkinančią Europos farmakopėjos reikalavimą apie suminį flavonoidų kiekį visiškai sausoje žaliavoje.

Siekiant nustatyti vaistinės augalinės žaliavos sukaupto suminio flavonoidų kiekio bei pagrindinių žaliavoje esančių flavonoidų ir jų glikozidų kiekių kitimus vegetacijos laikotarpiu nuo augalo žydėjimo iki vaisių subrandinimo, 2001 metais nuo dviejų Minijos upės regione augančių fenotipų apatinio ardo šakų skirtingu vegetacijos laikotarpiu (gegužės – rugpjūčio mėnesį) rinkti žaliavos ėminiai. Vieno iš šių fenotipų žiedų ir lapų bandinių spektrofotometrinės analizės rodmenys, rodantys suminio flavonoidų kiekio kitimą nuo augalo žydėjimo iki vaisių subrandinimo, pateikiami pirmame paveiksle. Flavonoidų kiekio kitimas žaliavoje įvertintas statistiškai apskaičiuavus koreliacijos koeficiento taškinį įvertį (12). Gauta koreliacijos koeficiento taškinio įverčio realizacija (r) – 0,90 rodo labai stiprią neigiamą tiesinę koreliaciją (nuo gegužės iki rugpjūčio suminis flavonoidų kiekis žaliavoje mažėja). Šio fenotipo žaliavos ėminių didelio slėgio skysčių chromatografijos analizės metodu gauti rezultatai, rodantys trijų didžiausių kiekį vienapiestės gudobelės žaliavoje sudarančių flavonoidų kiekio kitimą nuo augalo žydėjimo iki vaisių subrandinimo, pateikiami antroje paveiksle. Apskaičiuotos koeficiento taškinio įverčio realizacijos: hiperozido $r = -0,94$ (labai stipri neigiamą tiesinę koreliaciją), viteksino-o-ramnozido $r = 0,44$, rutino $r = 0,08$. Viteksino-o-ramnozido ir rutino koreliacijos įvertį iškreipia tai, kad žieduose šių flavo-



1 pav. Flavonoidų suminio kiekio (perskaičiavus rutinu visiškai sausai žaliavai) kitimas vienapiestės gudobelės žieduose ir lapuose vegetacijos laikotarpiu nuo augalo žydėjimo iki vaisių brandos

Pastaba: 2001 05 31 rinkti žiedai su lapais, kitu metu rinkti tik lapai.



2 pav. Hiperozido, vitexino-o-ramnozido ir rutino kiekių (perskaičiavus visiškai sausai žaliavai) kitimas vienapiestės gudobelės žieduose ir lapuose vegetacijos laikotarpiu nuo augalo žydėjimo iki vaisių brandos

Pastaba: 2001 05 31 rinkti žiedai su lapais, kitu metu rinkti tik lapai.

noidų procentas labai mažas, todėl įvertčiai perskaičiuoti tik lapams (pradedant nuo birželio 24 dienos ėminio): vitexino-o-ramnozido $r = -0,46$ (silpna neigiamą tiesinę koreliaciją), rutino $r = -0,99$ (labai stipri neigiamą tiesinę koreliaciją). Minijos regiono populiacijos antrojo fenotipo ėminių suminio flavonoidų kiekio, perskaičiuoto rutinu visiškai sausai žaliavai, rodmenys: birželio 24 dienos ėminys – 1,95 proc., liepos 16 – 1,60 proc., rugpjūčio 02 – 1,55 proc., rugpjūčio 11 – 1,63 proc., rugpjūčio 18 – 0,98 proc. Apskaičiuota koreliacijos koeficiento taškinio įvertinio realizacija $r = -0,81$ (stipri neigiamą tiesinę koreliaciją). Reikia pažymėti,

kad abiejų fenotipų žaliavoje sukaupto suminio flavonoidų kiekio procentas gegužės – liepos mėnesiais atitinka Europos farmakopėjos reikalavimą (ne mažiau 1,5 proc.), o rugpjūčio mėnesio ėminiuose flavonoidų kiekis mažesnis už šią ribą. Siekiant įvertinti galimybę rinkti Lietuvoje kokybišką žaliavą skirtingu vegetacijos laikotarpiu bei statistškai įvertinti koreliacijos koeficiento taškinio įvertinio pasikliautinusius intervalus, dar bus tirama ir kituose Lietuvos regionuose rinkta žaliava.

Lietuvoje augančių vienapiestės gudobelės vaisių analizė atlikta su žaliava, rinkta 2001 metais Šušvės upės, Dusios ežero bei Vilniaus miesto apylinkėse.

Lentelė. Flavonoidų suminio kiekio (perskaičiavus rutinu visiškai sausiai žaliai) kiekis trijuose Lietuvos regionuose rinktuose vienapiestės gudobelės vaisiuose

Bandinys	Flavonoidų suma (proc.)	Nuodžiūvis (proc.)
Šušvė 1	0,24	5,6
Šušvė 2	0,20	5,4
Šušvė 3	0,11	5,0
Dusia 1	0,22	4,9
Dusia 2	0,21	5,3
Vilnius 1	0,16	5,0
Vilnius 2	0,09	4,7

Suminio flavonoidų kiekio procentas (perskaičiuotas rutinu) visiškai sausoje žaliajoje pateikiamas lentelėje. Tirtuose ėminiuose suminis flavonoidų kiekis – 0,09–0,24 proc., Vilniaus regiono ėminiuose šis procentas mažesnis, tačiau apie skirtumus tarp populiacijų bus galima spręsti tik padidinus tiriamos žaliavos tūrį. Šušvės antrojo fenotipo vaisių ėminys tirtas didelio slėgio skystinės chromatografijos metodika. Ėminyje nustatyta: hiperozido – 0,10 proc., rutino – 0,04 proc., liuteolino – 0,02 proc. visiškai sausoje žaliajoje.

Išvados

1. Įvairiuose Lietuvos regionuose surinktuose vienapiestės gudobelės žieduose ir lapuose nustatyta nuo 0,77 iki 2,80 procentų flavonoidų.

2. Lietuvoje augančios vienapiestės gudobelės populiacijos gali būti naudojamos ruošti kokybiškoms vaistinės augalinės žaliavos paruošoms, tačiau kai kurių Lietuvos regionuose surinktų vienapiestės gudobelės žiedų ir lapų ėminių kokybiniai parametrai neatitinka Europos farmakopėjoje aprašytų gudobelės vaistinės augalinės žaliavos reikalavimų, todėl būtina kontroliuoti biologiškai aktyvių junginių kiekius žaliajoje.

3. Didžiausias suminis flavonoidų kiekis nustatytas vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos ėminiuose, rinktuose žydėjimo metu; nustatytas suminio flavonoidų kiekio mažėjimas žieduose ir lapuose vegetacijos laikotarpiu nuo žydėjimo iki vaisių brandos pabaigos.

4. Hiperozido kiekis didžiausias vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos ėminiuose, rinktuose žydėjimo laikotarpiu; nustatytas hiperozido kiekio mažėjimas žieduose ir lapuose vegetacijos pabaigoje.

5. Rutino ir viteksino-o-ramnozido kiekiai žieduose mažesni negu lapuose; lapuose nustatytas šių flavonoidų kiekio mažėjimas vegetacijos pabaigoje.

6. Ištirtas flavonoidų kiekis Lietuvos regionuose rinktuose vienapiestės gudobelės vaistinės augalinės žaliavos ėminiuose; vaisių bandiniuose nustatyta nuo 0,09 iki 0,24 procentų flavonoidų.

Research of the amounts of flavonoids accumulated in the crude drug of single-styled hawthorn

Valdas Jakštas, Valdimaras Janulis, Juozas Labokas¹, Saulius Kazlauskas², Raimondas Benetis, Genė Puodžiūnienė

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Kaunas University of Medicine,

¹Institute of Botany, Laboratory of Economical Botany,

²Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: hawthorn, leaves, flowers, fruits, flavonoids.

Summary. Leaves, flowers and fruits of single-styled hawthorn are used for production of pharmaceuticals with cardiotonic, coronary vasodilatoric and hypotensive action. Amount of flavonoids accumulated in crude drug of hawthorn is a parameter of quality.

Objective. To establish the difference in amounts of flavonoids accumulated in the crude drug of single-styled hawthorn.

Materials and methods. Different examples of crude material from some Lithuanian regions were extracted with ethanol; flavonoids were measured by spectroscopic method and by HPLC (high performance liquid chromatography).

Results. From 0.77% to 2.80% of flavonoids are determined in the leaves and flowers; amounts of hyperosid were 0.16–0.87%; vitexin-o-rhamnosid 0.14–0.40%; rutin 0.10–0.19%. Flavonoids maximum percent was determinate in crude material examples collected at the single-styled hawthorn flowering time; the decline of

amounts of flavonoids accumulated in the crude material of hawthorn was determined from May to August (realization of correlation coefficient $r=-0.90$). Hyperosid maximum percent was determined in crude material examples collected at flowering time; the decline of amounts of hyperosid accumulated in the crude material was determined from May to August ($r=-0.94$). Amounts of rutin and vitexin-o-rhamnosid in leaves were less than flowers; there was the decline of amounts of rutin and vitexin-o-rhamnosid in leaves from May to August. The percent of flavonoids 0.09 to 0.24 is determined in fruits.

Conclusion. Lithuanian single-styled hawthorn populations can supply quality crude material from May to August; the bigger amounts of flavonoids were determined in crude drug examples collected at flowering time.

Correspondence to V. Jakštas, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 3000 Kaunas, Lithuania. E-mail: farmakog@kmu.lt, valdas.jakstas@one.lt

Literatūra

1. Christensen KI. Revision of *Crataegus* Sect. *Crataegus* and *Nothosect*. *Crataegineae* (Rosaceae-Maloideae) in the Old World. Systematic botany monographs. The American Society of Plant Taxonomists; 1992. p. 1-4, 18-20, 100-13.
2. European Pharmacopeia. Strasburg: Council of Europe; 2000. p. 930-1.
3. Gosudartsvenaja farmakopeja SSSR XI. (USSR State pharmacopoeia. vol. 11.) Moskva: Medicina; 1990. vol. 11. p. 241-4.
4. Rastitel'nyje resursy SSSR. (Vegetable resources of USSR.) Leningrad: Nauka; 1987. p. 3, 38-9.
5. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal medicines. London, Chicago: Pharmaceutical Press; 2002. p. 284-7.
6. Bruneton J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris: Lavoisier Publishing; 1995. p. 330-1.
7. Kranzberger B, Maiz S. Pflanzen monographien. München: Klaus Foitzlich Verlag; 2000. p. 152-3.
8. Jakštas V, Janulis V, Labokas J. Lietuvoje augančių *Crataegus monogyna* Jacq. žiedų ir lapų fitocheminė analizė. (Fitochemical analysis of leaves and flowers of *Crataegus monogyna* growing in Lithuania.) Biomedicina 2002;2(2): 146-8.
9. Crataegi folium cum flore. European Scientific Cooperative on Phytotherapy. Centre for Complementary Health Studies, University of Exter, UK; 1999.
10. Blesken R. Crataegus in cardiology. Fortschrittung Medizin 1992;110:290-2.
11. Bohm BA. Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1998. p. 194-204.
12. Čekanavičius V, Murauskas G. Statistika ir jos taikymai. (Statistics and its applications.) Vilnius: TEV; 2001. p. 33-9, 120, 124-6.

Straipsnis gautas 2003 06 09, priimtas 2003 06 25
Received 9 June 2003, accepted 25 June 2003