

Flavonoidų kiekybinis nustatymas juodųjų serbentų lapuose (*Ribis nigri folium*)

Edita Elijošūtė¹, Audronis Lukošius¹, Ona Ragažinskienė², Audrius Maruška³

Lietuvos Sveikatos Mokslų Universitetas¹, Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas²,
Vytauto Didžiojo Universitetas³

Juodųjų serbentų lapuose kaupiasi fenoliniai junginiai, kurių pagrindiniai yra flavonoidai. Flavonoidų įvertinimui panaudojama jų savybė absorbuoti UV spindulius. Spektrofotometriiniu metodu nustatyta, kad juodųjų serbentų lapuose kaupiasi nuo 53,69 RE mg/g. iki 60,07 RE mg/g. Flavonoidų kiekis lapuose didėja vaisių brandos metu: augalui žydint nustatytas flavonoidų kiekis lapuose yra 12,9 RE mg/g. Uogoms pernokus – flavonoidų kiekis padidėja iki 27,9 RE mg/g.

Efektyvioji skysčių chromatografija – vienas pagrindinių ir dažniausiai naudojamų metodų tiek kokybiniam, tiek kiekybiniam flavonoidų nustatymui. Rutinas, katechinas, kvercetas, hiperozidas ir chlorogeno rūgštis – pagrindiniai junginiai randami juodųjų serbentų lapuose. Juodųjų serbentų lapuose dominuojantis junginys yra rutinas. Jo kiekis sudaro 35% identifikuotų junginių. Hiperozidas – antras po rutino junginys, kurio kiekis juodųjų serbentų lapuose yra didžiausias, nustatytas jo kiekis svyravo apie 2,98 RE mg/g. Augalui žydint lapuose dominuoja rutinas, jo kiekis 0,85 RE mg/g. Vaisių brandos metu nustatyti rutino ir hiperozido kiekiai analogiški. Vaistinė augalinė žaliava – juodųjų serbentų lapai (*Ribis nigri folium*) turi terapinį poveikį ir yra įtraukta į Europos bendrijos augalų monografiją.

Ribes nigrum L. lapai, flavonoidai, spektrofotometrija, ESC

Įvadas

Vaistinė augalinė žaliava – juodųjų serbentų lapai (*Ribis nigri folium*) kaip vaistinė augalinė žaliava pasižymi terapiniu poveikiu ir yra įtraukta į Europos Bendrijos augalų monografiją, kurią parengė Europos vaistų agentūros augalinių vaistinių preparatų komitetas (HMPC) [EMA/HMPC, 2014].

Juodųjų serbentų lapai skatina šlapimo išsiskyrimą, pasižymi diuretiniu poveikiu [ESCOP, 2014]. Europos tradicinėje medicinoje naudojami reumatinių ligų gydymui [Garbacki, 2004]. Juodųjų serbentų lapai yra arbatų imunitetui stiprinti receptūros sudedamoji dalis.

Juodųjų serbentų lapuose kaupiasi fenoliniai junginiai [Butnariu, 2014]. Literatūros duomenimis, juodųjų serbentų vaisiai (uogos) turtingos antocianais, o lapai – flavonoidais [Boranska-Kujawa, 2014]. Flavonoliai yra pagrindiniai flavonoidai juodųjų serbentų lapuose, sudarantys 68% suminio fenolinių junginių kiekio [Luzak, 2014]. Nustatyta, kad pagrindiniai flavonoliai – kvercetino glikozidai [Luzak, 2014].

Flavonoidai savo struktūroje turi bent vieną aromatinių žiedą, todėl pasižymi savybe sugerti šviesą UV spektro dalyje [Rijike, 2006]. Ši savybė naudojama spektrofotometrijoje ir leidžia įvertinti bendrą fenolinių junginių ir flavonoidų kiekį [Janulis, 2008].

Flavonoidų identifikavimui ir kiekybiniam įvertinimui plačiai naudojama efektyvioji skysčių chromatografija [Rijike, 2006]. Tai vienas populiariausių šiuolaikinių flavonoidų tyrimui naudojamų metodų, kuriam būdingas didelis atrankumas [Chernyak, 2007].

Užsienio mokslininkai teigia, kad lapai, surinkti birželio mėnesį turi didesnę fenolinių junginių kiekį nei pilnai prinokusios uogos liepos mėnesį [Gaižauskienė, 2009].

Tyrimų tikslas – identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti flavonoidus juodųjų serbentų lapuose (*Ribis nigri folium*), skirtingais augalo vegetacijos tarpsniais.

Tyrimų objektas – juodasis serbentas (*Ribes nigrum* L.) – agrastinių (*Grossulariaceae*) šeimos daugiametis krūmas-vaistinė augalinė žaliava juodųjų serbentų lapai

(*Ribis nigri folium*) ir biologiškai veikieji junginiai – polifenoliai.

Tyrimų metodika

1. Žaliava

Cheminiam tyrimui paruošti juodųjų serbentų lapai (*Ribis nigri folium*) skirtingais augalo vegetacijos tarpsniais: 1 – atžėlimo, 2 – butonizacijos, 3 – žydėjimo, 4 – vaisių brandos Vidurio Lietuvoje, Raseinių raj., Butkiškės km..

2. Reagentai

Tyrimui naudoti reagentai, tirpikliai ir standartai buvo chemiškai švarūs. Dibidistiliuotas vanduo (vandens gryninimo sistema Milipore, Bedford MA, JAV), ÷ metanolis (Sigma-Aldrich, Vokietija), ÷ trifluoracto rūgštis (Merck, Vokietija), ÷ Folin-Ciocalteu reagentas (Sigma-Aldrich, Vokietija), rutinas, hiperozidas, kvercetas, liuteolinas, chlorogeno r. (Sigma-Aldrich, Vokietija).

3. Aparatūra

Bandinio ekstrakcija buvo vykdyta orbitalinėje purtyklėje VWR Mini Shaker (J&M Scientific, JAV).

Bendras fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis nustatytas spektrofotometru MILTON ROY Spectronic 1201 (JAV).

Flavonoidai identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti ESC chromatografu LiChroCART 125 – 4; LiChropher 100.

4. Ekstraktų ruošimas

Ekstraktai buvo ruošiami atsveriant 0,5 g (0,001 g tikslumu) orasausės susmulkintos juodųjų serbentų augalinės žaliavos. Ekstrakcija buvo vykdoma su 20 ml 75 % metanolio orbitalinėje purtyklėje, leidžiant purtytis 200 k/min greičiu 24 val. Gauti ekstraktai buvo filtruojami per filtravimo popierių, kurio porų dydis – 0,2 µm.

5. Spektrofotometrija

5.1 Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriiniu metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis juodųjų serbentų lapuose nustatytas Folin – Ciocalteu metodu. Gauti matavimų duomenys įvertinti pagal rutino kalibracinio grafiko tiesinės regresijos lygtį $Y=1,0162x$; $R^2 = 0,9873$.

Rezultatai išreikšti rutino ekvivalentais (RE) gramui žaliavos. Absorbcija matuota esant 760 nm bangos ilgiui.

5.2 Bendras flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Flavonoidų kiekis nustatytas aliuminio chlorido $AlCl_3$ kolorimetriniu metodu. Gauti duomenys įvertinti pagal rutino kalibracinį grafiko tiesinės regresijos lygtį $y = 0,9571x$; $R^2 = 0,9904$. Rezultatai išreikšti rutino ekvivalentais (RE) gramui žaliavos. Absorbcija matuota esant 407 nm bangos ilgiui.

6. Flavonoidų kiekio nustatymas efektyvios skysčių chromatografijos metodu (ESC)

Analizės sąlygos:

Kolonėlė: RP -18 -e;

Kolonėlės tėkmės greitis: 0,75 ml/min.;

Analizės laikas: 58 min.;

Laikas tarp injekcijų: 61 min.;

Detektorius: UV;

Detekcija: $\lambda = 254$ nm.;

Porų dydis: 5 μ m;

Tirpikliai: A – vanduo, parūgštintas trifluoroacto rūgštimi (0,05%); B – bidistiliuotas vanduo : acetonitrilas : metanolis (50:25:25);

Gradientas:

T_{min}	A	B
0	99 %	1 %
40	1 %	99 %
45	1 %	99 %
48	99 %	1 %
58	99 %	1 %

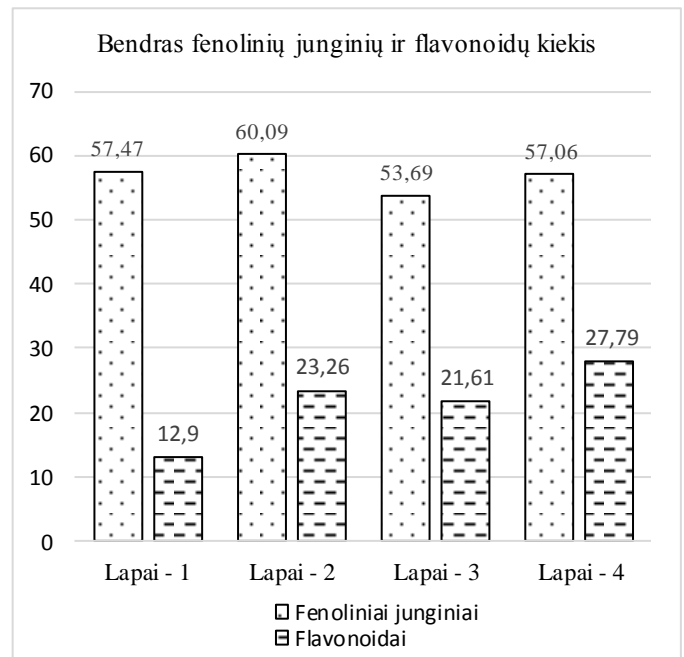
Palyginus tiriamųjų mėginių ir standartų sulaikymo laikus esant nurodytoms sąlygoms, identifikuoti fenoliniai junginiai. Gauti duomenys įvertinti pagal identifikuotų fenolinių junginių standartų kalibracinių grafikų tiesinės regresijos lygtis.

Rezultatai

1. Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu.

Bendras fenolinių junginių kiekis juodųjų serbentų lapuose varijuoja nuo 53,69 iki 60,09 mg RE/g. Vaisių nokimas didelės įtakos fenolinių junginių kiekiui lapuose neturi.

Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas lapuose vaisių nokimo periodo pradžioje, kuomet užmezgta uogos buvo žalios (60,09 mg RE/g). Vaisiams sunokus fenolinių junginių kiekis lapuose sumažėjo iki 53,69 mg RE/g. (1 pav.)



1 pav. Bendras fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis juodųjų serbentų lapuose

Fig. 1. Distribution of total amount of phenolic compounds and flavonoids in black currant leaves

2. Bendras flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Flavonoidų kiekis juodųjų serbentų lapuose didėja nokstant vaisiams. Augalui žydint nustatytas flavonoidų kiekis lapuose buvo 12,9 mg RE/g. Užmezgus uogas – flavonoidų lapuose padaugėja iki 23,26 mg RE/g. Vaisių brandos metu flavonoidų kiekis padidėja iki 23,70 mg RE/g. Daugiausia flavonoidų juodųjų serbentų lapuose nustatyta vaisių pernokimo metu, kuomet uogos netgi susiraukšlėja - 27,79 mg RE/g. (1 pav.)

1. Flavonoidų kiekio nustatymas efektyvios skysčių chromatografijos metodu (ESC)

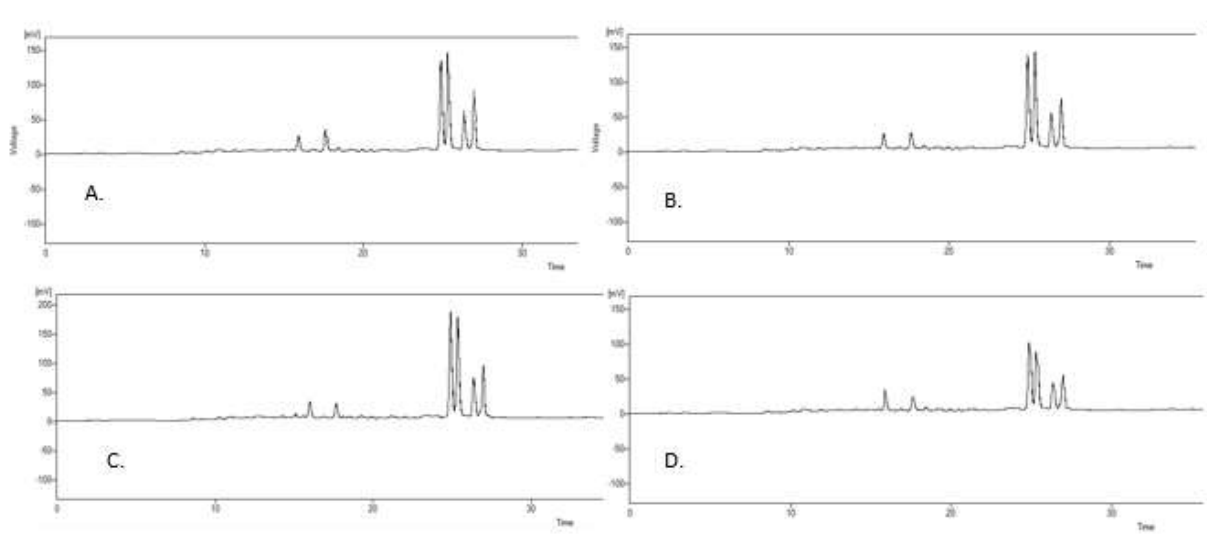
Juodųjų serbentų (*Ribes nigrum L.*) lapuose dominuoja 6 junginiai: viena fenolinė rūgštis – chlorogeno rūgštis, keturi flavonoidai – rutinas, katechinas, kvercetas ir hiperozidas ir vienas neatpažintas junginys.

Juodųjų serbentų lapuose dominuojantis junginys yra rutinas. Jo kiekis sudaro 35% identifikuotų junginių. Antras pagal kiekį – hiperozidas. Santykinis jo kiekis sudaro 31%. Kverceto kiekis lapuose sudaro 18% bendro fenolinių junginių kiekio. Katechino ir chlorogeno rūgšties santykiniai kiekiai juodųjų serbentų lapuose yra vienodi (8%) (1 lentelė)

1 lentelė. Pavienių flavonoidų kiekiai ir plotai po kreivėmis juodųjų serbentų lapuose surinktuose skirtingu augalo vegetacijos tarpsniu.

Table 1. Amount of individual flavonoids and area under curve in *Ribes nigrum* leaves.

	Rutinas		Katechinas		Kvercetas		Hiperozidas		Chlorogeno r.	
	plotas	RE mg/g	plotas	RE mg/g	plotas	RE mg/g	plotas	RE mg/g	plotas	RE mg/g
Lapai - 1	1986,784	0,850826	517,036	0,221417	879,224	0,376521	1618,212	0,692987	570,834	0,244455
Lapai - 2	1931,395	0,827106	442,693	0,18958	780,582	0,334278	1669,546	0,714971	422,85	0,181082
Lapai - 3	2157,712	0,924024	483,909	0,20723	924,71	0,396	2134,561	0,91411	408,511	0,174942
Lapai - 4	1640,214	0,70241	447,186	0,191504	1972,199	0,84458	3400,134	1,456082	570,501	0,244313



2 pav. Lapų chromatogramos: A – lapai-1; B – Lapai-2; C – Lapai-3; D – Lapai-4
Fig. 2. Chromatograms of the leaves: A – Leaves -1; B – Leaves-2; C – Leaves -3; D – Leaves-4

Vidutinis rutino kiekis serbento lapuose 3,40 mg/g. Augalui žydint rutino lapuose randama iki 2,5 mg/g. Vaisių brandos metu rutino padaugėja iki 3,3 mg/g. Vaisiams pernokus – rutino kiekis dar labiau padidėja – 5,25 mg/g. Lapai kaupia didžiausią rutino kiekį vaisių brandos pabaigoje, kai uogos net gi susiraukšlėja.

Hiperozido kiekis juodųjų serbentų lapuose yra didžiausias, vidutiniškai jo yra 2,98 mg/g. Vaisiams nokstant hiperozido kiekis palaipsniui mažėja. Žydėjimo metu – lapuose hiperozido kiekis siekia iki 3,07 mg/g. - vaisiams pernokus – hiperozido kiekis sumažėja iki 2,53 mg/g.

Vidutinis kvercetino kiekis juodųjų serbentų lapuose yra 1,76 mg/g. Nuo augalo žydėjimo pradžios iki vaisių sunokimo jo kiekis didėja: žydint kvercetino yra iki 1,35 mg/g, uogų sunokimo metu – 1,429 mg/g. Uogoms pernokus kvercetino kiekis išauga kone dvigubai – 3,04 mg/g. Nustatyta, kad juodųjų serbentų lapai vaisių pernokimo metu kaupia didžiausią kvercetino kiekį.

Juodųjų serbentų lapuose rastas nedidelis katechino kiekis, vidutiniškai 0,73 mg/g. Didžiausias katechino kiekis lapuose nustatytas augalo žydėjimo metu 0,799 mg/g. Vaisių brandos metu jo sumažėja iki 0,748 mg/g.

Juodųjų serbentų lapuose nustatyta ir viena fenolinė rūgštis – chlorogeno rūgštis. Vidutinis jos kiekis lapuose yra 0,76 mg/g. Augalo žydėjimo metu jos kiekis siekia 0,88 mg/g. Augalui užmezgus vaisius – jos kiekis sumažėja iki 0,65 mg/g. Vaisių brandos metu kiekis išliekia panašus - 0,63 mg/g. Uogoms pernokus – chlorogeno rūgšties kiekis padidėja iki 0,88 mg/g

Išvados

2015 m. atlikta juodųjų serbentų (*Ribes nigrum* L.) – agrastinių (*Grossulariaceae*) šeimos daugiamečio augalo vaistinės augalinės žaliavos – juodųjų serbentų lapai (*Ribes nigri folium*) ir biologiškai veikliųjų junginių cheminių savybių tyrinėjimai atskirais augalų vegetacijos tarpsniais 1-atžėlimo, 2-butonizacijos, 3-žydėjimo, 4-vaisių brandos Vidurio Lietuvoje ir nustatyta:

1. Juodųjų serbentų lapuose kaupiasi fenoliniai junginiai, kurių kiekis varijuoja nuo 53,69 iki 60,09 mg RE/g. Vaisių brandos tarpsnis fenolinių junginių kiekiui lapuose įtakos neturi.

2. Juodųjų serbentų lapuose dominuoja rutinas, katechinas, kvercetinas, hiperozidas ir chlorogeno rūgštis. Junginių kiekiui lapuose įtakos turi vaisių nokimo periodas.

3. Augalui žydint lapuose dominuoja rutinas. Vaisių brandos metu rutino ir hiperozido kiekiai panašūs.

Literatūra

- BORANSKA-KUJAWA D, CYBORAN S., ŻYLKA R., ET ALL. „Biological Activity of Blackcurrant Extracts (*Ribes nigrum* L.) in Relation to Erythrocyte Membranes“. Hindawi Publishing Corporation.Vol.2014. 783059.
- BUTNARIU M. „Detection of polyphenolic components in *Ribes nigrum* L.“ Annals Agricultural and Environmental Medicine. 2014, Vol.21, No. 1, 11-14.
- CHERNYAK EI, VYALKOV AI, TSARALUNGA YaS, MAROZOV SV. Application of Gas and High Performance Liquid Chromatography Techniques for the Identification of Natural Biologically Active Phenolic Compounds. Chemistry for Sustainable Development 2007; 15:601-15.
- GAIŽAUSKIENĖ A. „Įvairių juodųjų serbentų (*Ribes nigrum* L.) veislių pumpurų cheminė sudėtis“. Daktaro disertacija. 2009, Kaunas.
- GARBACKI N, TITS M, ANGENOT L, DAMAS J. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats.BMC Pharmacol. 2004. 4, 25.
- JANULIS V, PUODŽIŪNIENĖ G, MALINAUSKAS F.. Fitocheminė analizė, Mokomoji knyga. Kaunas, 2008. ISBN 978-9955-835-37-0. psl.89-108.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). ESCOP Monographs: Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, Germany, 2nd ed, (2003), pp. 425–428.
- LUZAK B, BONCLER M, RYWANIĄK J. et all. „Extrakt from *Ribes nigrum* leaves in vitro activates nitric oxide synthase (eNOS) and increase CD39 expression in human endothelial cells.“ J.Physiol Biochem. 2014. 70:1007-1019.
- RIJKE E, OUT P, NIESSEN WMA, ARIESE F, GOOIJER C, BRINKMAN UAT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of Chromatography 2006; 1112: 31.
- Community herbal monograph on *Ribes nigrum* L., folium. EMA/HMPC/142986/2009 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)6May2010

Edita Elijošūtė, Audronis Lukošius, Ona Ragažinskienė, Audrius Maruška

Determination of flavonoids in black currant leaves (*Ribis nigri folium*)

Summary

Black currant leaves (*Ribis nigri folium*) accumulate phenolic compounds. The major phenolic compounds in black currant leaves are flavonoids. Spectrophotometry showed that blackcurrant leaves accumulate from 53,69 to 60,07 RE mg/g flavonoids. The quantity of flavonoids increases during plant vegetation phases.

High performance liquid chromatography – one of the basic and most commonly method for qualitative and quantitative determination of flavonoids. Rutin, catechin, quercetin, hyperoside and chlorogenic acid are the main compounds found in black currant leaves. The dominant compound is rutin. Its content is 35% of all identified compounds. Hyperoside – the second compound, whose amount is much higher than other. Its amount on average is 2,98 RE mg/g. Pharmacy raw material – black currant leaves (*Ribis nigrum folium*) has the therapeutic effect and is included in the European Community plant monograph.

Gauta 2016 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2016 m. balandžio mėn.

Edita ELIJOŠUTĖ. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos fakulteto magistrantūros studentės. Adresas: Eivenių g. 4 Kaunas. el. paštas: Edita.Elijosiutes@gmail.com.

Edita ELIJOŠUTĖ. Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, MSc student. Address: [Eivenių g. 4, Kaunas](#), LT-44404 Kaunas. e-mail: Edita.Elijosiutes@gmail.com.

Ona RAGAŽINSKIENĖ. Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo Vaistinių ir prieskoninių augalų kolekcijų sektoriaus vedėja, biomedicinos (farmacijos) mokslų daktarė, prof. Adresas: Kaunas Žilibero g. 6, LT-46324 Kaunas. Tel. (+370 37) 29 52 87, el. paštas: o.ragazinskiene@bs.vdu.lt

Ona RAGAŽINSKIENĖ. Vytautas Magnus University, Kaunas Botanical Garden, prof. doctor of biomedical (pharmacy) sciences. Address: Žilibero g. 6, LT-46324 Kaunas. Tel. (+370 37) 29 52 87, e-mail: o.ragazinskiene@bs.vdu.lt

Audrius MARUŠKA. Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biologijos katedros profesorius, habil. dr.. Adress: Vileikos g. 8, LT-, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370 37) 327907, e-mail: a.maruska@gmf.vdu.lt

Audrius MARUŠKA. Vytautas Magnus University Faculty of Natural Sciences, Department of Biology, **Professor, habil. dr.** Address: Vileikos g. 8, LT-, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370 37) 327907, e-mail: a.maruska@gmf.vdu.lt