**Флавоноиды.**

***Классификация.***

Углеродный скелет флавоноидов может быть обозначен как С6–С3–С6 – два бензольных кольца, соединенных трехуглеродной цепью, что дает право именовать все соединения этого класса общим названием – дифенилпропаноиды.

Первично их можно разделить на два больших, но неравных класса – 1,3-дифенилпропаноиды и 1,2-дифенилпропаноиды.

Наиболее многочисленной является группа 1,3-дифенилпропаноидов (собственно флавоноидов).

***Классификация 1,3-дифенилпропаноидов.***

6-членный гетероцикл 5-членный гетероцикл ациклический



1. Флавоноиды с 6-членным гетероциклом

катехины (флаван-3-олы) лейкоантоцианидины антоцианидины

 (флаван-3,4-диолы)



 флаваноны флаванонолы



флавоны флавонолы



2. Флавоноиды с 5-членным гетероциклом

 ауроны



3. Флавоноиды с ациклическим пропановым фрагментом

 халконы дигидрохалконы



***Классификация 1,2-дифенилпропаноидов.***

 пропановый фрагмент

циклический ациклический



1. Изофлавоны (изофлаваноны) 2. Изохалконы (изодигидрохалконы)



Разнообразие флавоноидов за счет заместителей на примере флавонов и флавонолов.

1. Гидроксилирование



 апигенин лютеолин



 кемпферол кверцетин

2. Метоксилирование



 акацетин диосметин



 рамнетин изорамнетин

3. Гликозилирование



гиперозид (3-галактозид кверцетина) изокверцитрин (3-глюкозид

 кверцетина)



цинарозид (7-глюкозид лютеолина)



 рутин рутиноза



неогесперидоза



 витексин (8-С-глюкозид апигенина)

4. Ацилирование

 тилирозид

5. Пренилирование

 изоксантогумол ксантогумол

6. Окислительное сочетание

 силибинин

**Физико-химические свойства.**

 Большинство флавоноидов – твердые кристаллические вещества с определенной температурой плавления, окрашенные в желтый цвет (флавоны, флавонолы, халконы и ауроны) или бесцветные (катехины, лейкоантоцианидины, флаваноны, флаванонолы и изофлавоны) или окрашены в красный или синий цвет (антоцианы) в зависимости от рН среды.



 рН=3 (красный) рН=8 (фиолетовый)



 рН=9-10 (синий)

 У антоцианидинов обычно выделяемых в кислом растворе в виде флавилиевых солей, электрон гетероциклического атома кислорода принимает участие в образовании π-связей в гетероцикле, так что хромофором становится вся молекула. Поэтому из всех флавоноидов антоцианидины поглощают свет с наибольшей длиной волны и окрашены в красный или пурпурный цвет. При рН›7 образуются хиноидные основания окрашенные в синий цвет.

 Флавоноиды лишены запаха, некоторые обладают горьким вкусом (содержащие сахар неогесперидозу).

 Гликозиды флавоноидов растворимы в воде и водно-спиртовых раство-рах и нерастворимы в органических растворителях (эфире, хлороформе). Агликоны, напротив, растворимы в эфире, некоторые в хлороформе, спирте и плохо в воде.

 Флавоноидные гликозиды, а также агликоны катехинов, лейкоантоциа-нидинов, флаванонов и флаванонолов обладают оптической активностью.

 Флавоноидные гликозиды под действием ферментов и минеральных кислот гидролизуются до агликона и углеводного остатка. С-гликозиды с трудом расщепляются лишь при действии концентрированных кислот (соляной, уксусной или их смесей) при длительном нагревании.

 Легко окисляются в присутствии кислорода воздуха под действием света катехины и лейкоантоцианидины, превращаясь в окрашенные продукты, вплоть до высокомолекулярных полимерных форм (окисление катехинов на свежем срезе яблока). Остальные флавоноиды более устойчивы к окислению.

**Методы выделения флавоноидов из растительного материала.**

 Существует общепринятая классическая схема выделения флавоноидов.

1. Экстракция растворами этилового или метилового спирта.
2. Отгонка спирта и разбавление остатка водой.
3. Обработка водного остатка хлороформом или четыреххлористым углеродом для удаления неполярных примесей (хлорофилл, эфирные масла, стерины и др.)
4. Обработка водного остатка этиловым эфиром для отделения агликонов.
5. Обработка водного остатка этилацетатом для отделения монозидов.
6. Обработка водного остатка бутанолом для отделения биозидов и триозидов.

 Для разделения полученных фракций используют колоночную хромато-графию на полиамиде или силикагеле.

 Схема заводского производства препарата «Фламин».

 «Фламин» – препарат, содержащий сумму флавоноидов (моногликозиды нарингенина, апигенина и кемпферола) бессмертника песчаного.

1. Экстракция сухого сырья 50% этанолом в батарее из 4-х экстракторов методом противотока.
2. Упаривание в вакуум-аппарате до ¼ первоначального объема.
3. Охлаждение водного остатка, отделение выпавшего осадка (флавоно-иды).
4. Растворение осадка в горячей воде (t=50-60С°) и извлечение флавоноидов смесью этилацетат-этанол (9:1).
5. Обезвоживание экстракта безводным сульфатом натрия, удаление растворителей под вакуумом и высушивание остатка в вакуум-сушильном шкафу.

**Качественное обнаружение.**

1. Цианидиновая реакция (используется для обнаружения флаванонов. флаванонолов, флавонов, флавонолов)



1. Борно-лимонная (борно-щавелевая) реакция (р. Вильсона) (используется для обнаружения флавонов, флавонолов, халконов, ауронов)



1. Реакция с хлоридом алюминия (используется для обнаружения флавонов, флавонолов, халконов, ауронов)

 

1. Реакция с раствором щелочи.

 Флавоноиды дают желтое окрашивание, при нагревании переходящее в красное, халконы и ауроны дают сразу красное окрашивание, антоцианы – синее.

5. Флавоноиды, содержащие свободные орто-гидроксильные группы в кольце В, при обработке ацетатом свинца дают осадки (катехины, лейкоантоцианидины, флаваноны, флаванонолы, изофлавоны – белые), (флавоны, флавонолы, халконы, ауроны – желтые), (антоцианы – красные или синие в зависимости от рН среды).

 

6. Реакция образования азокрасителя (чаще используется для обнаружения флаванонов и флаванонолов)

 

7. Реакция на катехины с ванилином.



8. Реакция на лейкоантоцианидины – нагревание с кислотой (красное окрашивание) – образование антоцианидинов.

9. ТСХ обнаружение флавоноидов по собственной и индуцированной флуоресценции.

**Количественное определение**

Методы количественного определения флавоноидов основаны на их способности поглощать УФ-свет и образовывать цветные продукты реакции с различными реагентами. Методы, основанные на собственном поглощении флавоноидов, в настоящее время реализуются преимущественно в варианте ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в области 350-370 нм (флавоны, флавонолы, халконы, ауроны) или в области 260-290 нм (флаваноны, флаванонолы, изофлавоны, катехины, лейкоантоцианидины). Данным методом можно определять как отдельные флавоноиды (при наличии стандартных образцов), так и всю сумму складывая площади всех зарегистрированных пиков. Методы, основанные на измерении поглощения света в видимой области спектра окрашенных производных флавоноидов, используются для определения суммарного содержания этих соединений. Наибольшее применение здесь нашла реакция с хлоридом алюминия. В Европейской фармакопее этот метод реализуется в варианте кислотного гидролиза извлеченных из растительного материала флавоноидов с последующим добавлением хлорида алюминия, т.е. в самой реакции участвуют агликоны флавоноидов. Это позволяет унифицировать методику и использовать ее без изменений для определения флавоноидов в различных видах сырья. ГФ ХIV и другие отечественные НД используют вариант определения флавоноидов без предварительного кислотного гидролиза. Аналитическая длина волны при этом имеет меньшие значения (410 ± 5 нм), чем в методиках с кислотным гидролизом (425-430 нм). И в Европейской и в отечественной фармакопее метод реализуется в варианте т.н. называемой дифференциальной спектрофотометрии, когда в качестве раствора сравнения, на фоне которого измеряется оптическая плотность испытуемого раствора, выступает не растворитель, а само извлечение из сырья. Помимо этой реакции нашли также применение для количественных определений р. Вильсона и цианидиновая проба. Для определения суммы антоцианов используется собственное поглощение этих соединений в видимой области спектра. Для измерений извлекает антоцианы из сырья подкисленными водными или спиртовыми растворами.

**Стандартизация ЛРС, содержащего флавоноиды, Европейской фармакопеей**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЛРС** | **Качественное определение** | **Количественное определение** |
| **Показатель** | **Метод определения** |
| Листья березы (Betula pendula, B. pubescens) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (гиперозид, рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Цветки бузины (Sambucus nigra) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин, изо-кверцитрин) | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Трава горца птичьего (Polygo-num aviculare) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Трава золотарни-ка европейского (Solidago virgau-rea) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Трава золотарни-ка (Solidago gi-gantea, S. cana-densis) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (кверцетин, рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Цветки календу-лы (Calendula officinalis) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Трава пустырни-ка (Leonurus cardiaca) |  | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Цветки сафлора (Carthamus tincto-rius) |  | Сумма флавоноидов | СФ при 420 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава хвоща (Equisetum arven-se) |  | Сумма флавоноидов | СФ при 425 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Листья и цветки боярышника (С. monogyna, C. lae-vigata, C. pentagy-na, C. nigra, C. azarolus) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (гиперозид, витексин, витек-син-2-рамнозид) | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с H3BO3 и Н2С2О4 |
| Трава пассифло-ры (Passiflora in-carnata) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (диглико-зилфлавон, изо-ориентин, изови-тексин) | Сумма флавоноидов | СФ при 401 нм после реакции с H3BO3 и Н2С2О4 |
| Трава с цветками фиалки (Viola arvensis, V. trico-lor) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 405 нм после реакции с H3BO3 и Н2С2О4 |
| Цветки померан-ца горького (Cit-rus aurantium spp. aurantium) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (геспери-дин, нарингин, неоэриоцитрин, диосмин, неодио-смин) | Сумма флавоноидов | СФ при 530 нм после реакции с HCl + Mg |
| Листья гинкго (Ginkgo biloba) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ | Сумма флавоноидов | ВЭЖХ с СФ-детектированием при 370 нм после гидролиза с HCl (производные кверцетина, кемп-ферола и изорам-нетина) |
| Трава гречихи (Fagopyrum escu-lentum) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Рутин | ВЭЖХ с СФ-детектированием при 350 нм  |
| Листья ортосифо-на (Orthosiphon stamineus) | ТСХ, УФ (синен-сетин) | Синенсетин | ВЭЖХ с СФ-детектированием при 258 нм |
| Плоды прутняка обыкновенного (Vitex agnuscas-tus) |  | Кастицин | ВЭЖХ с СФ-детектированием при 348 нм |
| Цветки ромашки (Marticaria recuti-ta) |  | Апигенин-7-глюкозид | ВЭЖХ с СФ-детектированием при 340 нм |
| Плоды растороп-ши пятнистой (Si-lybum marianum) | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (силиби-нин, силикрис-тин, таксифолин) | Силимарин (сумма флаво-лигнанов) | ВЭЖХ с СФ-детектированием при 288 нм |
| Плоды черники свежие (Vaccini-um myrtillus) |  | Сумма антоцианов | СФ при 528 нм после реакции с HCl  |

Примечание: ДФБКАЭЭ – дифенилборной кислоты аминоэтиловый эфир

**Стандартизация ЛРС, содержащего флавоноиды,**

 **российскими НД (ГФ XIV и ФС)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЛРС** | **Качественное определение** | **Количественное определение** |
| **Показатель** | **Метод определения** |
| Листья березыГФ ХIV | ТСХ, УФ, + диа-зореактив (гипе-розид)  | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Почки березыГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 400 нм после реакции с AlCl3 |
| Цветки бессмерт-ника песчаногоГФ ХIV | ТСХ, УФ, + диа-зореактив (люте-олин-7-глюкозид) | Сумма флавоноидов | СФ при 418 нм после реакции с AlCl3 |
| Цветки бузины черной ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + AlCl3 + УФ (флавонои-ды)+ HCl + Mg (фла-воноиды) | Сумма флавоноидов | СФ при 408 нм после реакции с AlCl3 |
| Листья гинкго двухлопастногоГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 406 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава душицы обыкновенной ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 400 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава зверобоя ГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 415 нм после реакции с AlCl3 |
| Листья земляни-ки лесной ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + AlCl3 + УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Листья мяты пе-речной ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 400 нм после реакции с AlCl3 |
| Цветки календу-лы лекарственнойГФ ХIV  | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 408 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава полыни горькой ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава пустырни-ка ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Цветки ромашки аптечной ГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин, кверцетин) | Сумма флавоноидов | СФ при 415 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава тысячелис-тника обыкно-венного ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 400 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава фиалкиГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава хвоща по-левого ГФ ХIV | ТСХ, УФ (флаво-ноиды) | Сумма флавоноидов | СФ при 430 нм после гидролиза с HCl и реакции с AlCl3 |
| Соплодия хмеля обыкновенного ГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (рутин)+ HCl + t◦ (лейко-антоцианы) | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава чабрецаГФ ХIV | ТСХ + AlCl3 + УФ (лютеолин-7-глюкозид, флаво-ноиды) | Сумма флавоноидов | СФ при 396 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава тимьяна обыкновенногоГФ ХIV | ТСХ + AlCl3 + УФ (лютеолин-7-глюкозид, рутин, флавоноиды) | Сумма флавоноидов | СФ при 398 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава череды трехраздельнойГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (кверцетин) | Сумма флавоноидов | СФ при 415 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава пастушьей сумки обыкновен-ной ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + NH3 + УФ (рутин, лютеолин) | Сумма флавоноидов | СФ при 405 нм после реакции с AlCl3 |
| Столбики с рыль-цами кукурузы ГФ XIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ + УФ (лютеолин-7-глюкозид) | Сумма флавоноидов | СФ при 405 нм после реакции с AlCl3 |
| Плоды шиповни-ка ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 415 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава эрвы шерс-тистой ГФ ХIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Плоды боярыш-ника ГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ + УФ (гиперозид) | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава горца пти-чьего ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + AlCl3 + УФ ( кверце-тин) | Сумма флавоноидов | СФ при 410 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава горца пе-речного ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + AlCl3 + УФ (рутин, кверцетин) | Сумма флавоноидов | СФ при 408 нм после реакции с AlCl3 |
| Трава горца по-чечуйного ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + AlCl3 + УФ (рутин) | Сумма флавоноидов | СФ при 408 нм после реакции с AlCl3 |
| Листья вахты трехлистной ГФ XIV |  | Сумма флавоноидов | СФ при 432 нм после реакции с диазотированным стрептоцидом |
| Трава сушеницы топяной ГФ ХIV | ТСХ + AlCl3 + УФ (флавонои-ды) | Сумма флавоноидов | КХ + СФ при 338 нм |
| Цветки боярыш-ника ГФ ХIV | ТСХ, ДФБКАЭЭ +УФ (кверцетин, рутин, гиперозид) | Гиперозид | ТСХ + СФ при 365 нм |
| Цветки пижмы обыкновеннойГФ ХIV |  | Сумма флаво-ноидов и фенол-карбоновых к-т | СФ при 310 нм  |
| Плоды аронии черноплодной свежие ГФ ХIV |  | Сумма антоцианов | СФ при 534 нм после реакции с HCl |
| Плоды аронии черноплодной сухие ГФ ХIV |  | Сумма антоцианов | СФ при 534 нм после реакции с HCl |
| Цветки василька синего ГФ ХIV | ТСХ, + HCl (ан-тоцианы) | Сумма антоцианов | СФ при 510 нм после реакции с HCl |
| Плоды черники обыкновенной ГФ ХIV |  | Сумма антоцианов | СФ при 546 нм после реакции с HCl |
| Корни стальника полевого ГФ ХIV | ТСХ, УФ (оно-нин) | Сумма изофлавоноидов | СФ при 260 нм |
| Плоды растороп-ши пятнистой ГФ ХIV | ТСХ, УФ, + диа-зореактив (сили-бин) | Сумма флаволигнанов | СФ при 289 нм |
| Почки тополяГФ ХVI | ТСХ, УФ, + диа-зореактив (пино-стробин) | Сумма феноль-ных соединений (в пересчете на пиностробин) | СФ при 289 нм |
| Древесина маакии амурской ФСП 42-0170-2947-02 |  | Сумма стильбе-нов и изофлаво-нов | СФ при 320 нм и 272 нм |
| Побеги леспеде-цы двухцветной ФС 42-1942-89 |  | Сумма флавоноидов | СФ при 354 нм |