

Н.М. Бирюкова¹, А.М. Островская¹, В.Г. Соколов¹,
Л.В. Кухарева², В.А. Игнатенко², Т.В. Гиль²

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СОСТАВА ФЛАВОНОИДОВ
И ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ РАСТЕНИЙ РОДА VUPL EURUM L.,
КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ**

¹Учреждение Белорусского государственного университета
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»
²Государственное научное учреждение
«Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Приведены результаты исследования качественного и количественного состава биофлавоноидов и фенолкарбонновых кислот в образцах лекарственного растительного сырья володушки, выращенных в коллекционном питомнике Центрального ботанического сада НАН Беларуси, а также прослежена сезонная изменчивость содержания этих компонентов. Методами ВЭЖХ, спектрофотометрии и бумажной хроматографии были идентифицированы агликаны флавонолов и установлено высокое содержание биофлавоноидов и фенолкарбонновых кислот. Данные образцы могут рассматриваться как перспективное сырье для разработки новых отечественных лекарственных средств.

Ключевые слова: Vupleurum L., Vupleurum aureum Fisch., Vupleurum rotungifolium L., флавоноиды, кверцетин, кемпферол, фенолкарбонновые кислоты, ВЭЖХ.

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные и прикладные исследования природных полифенолов послужили основой для создания целой

области фармацевтической индустрии, выпускающей сотни наименований лекарственных средств, пищевых и биологически активных добавок (БАД), основным компонентом которых являются

флавоноиды. Именно в сфере лечебного использования флавоноидов традиционная медицина особенно близко сомкнулась с имеющими тысячелетнюю историю восточными системами лечения, основанными на использовании лекарственных растений. Флавоноидсодержащие растения привлекают внимание исследователей вследствие их перспективности в получении лекарственных средств широкого спектра действия.

В основе антиоксидантного действия флавоноидов лежит их способность подавлять образование свободных радикалов, являющихся причиной возникновения у человека многих тяжелых патологий, и выводить их из организма. Гидроксильные группы флавоноидов содержат подвижные атомы водорода, легко реагирующие с перекисными радикалами и обрывающие цепи окисления [1,2].

Выбор объектов исследования, часто определяющий результативность работы, должен обосновываться потенциальными или доказанными возможностями их практического использования. Виды володушек (*Vupleurum L.*) используются в народной и официальной медицине в качестве желчегонных, вяжущих и стимулирующих средств. Фармакологами и клиницистами установлено желчегонное и противовоспалительное действие настоев из травы володушки, а также благоприятное действие володушки золотистой на выделение желудочного сока. Зарубежные ученые объясняют фармакологическую активность (капилляроукрепляющее и антигиалуронидазное действие) видов рода *Vupleurum L.* действием флавоноидов, содержащихся в различных органах растения [3,4].

Проведенный анализ рынка продукции, содержащей растения рода *Vupleurum L.*, выявил широкий спектр лекарственных средств, производимых в странах ближнего и дальнего зарубежья [5-9].

Род *Vupleurum L.* представлен как многолетними, так и однолетними травянистыми растениями, имеет обширный ареал. Отдельные виды их встречаются в Европе, Сибири, Казахстане, Киргизии, Монголии, Китае, на Урале и Дальнем Востоке. Растут на субальпийских лугах, высокогорных полянах, среди смешанных хвойных и лиственных лесов, реже на пойменных лугах, в горных тундрах,

на каменистых склонах в высокогорьях [4]. На территории Беларуси растения рода *Vupleurum L.* не произрастают. Одним из условий закладки искусственных плантаций полезных растений, в том числе и лекарственных, является создание базы исходного материала, источником которого является наличие особей, прошедших интродукционные испытания и показавших высокие адаптационные способности в новых условиях. Полученные в лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» результаты позволяют рассматривать володушку как лекарственную культуру, перспективную для испытания в промышленных условиях Беларуси.

Целью настоящей работы являлось изучение качественного и количественного состава биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот и установление времени оптимальных сроков сбора сырья для получения наибольшего выхода ценных компонентов в сухой надземной массе володушек, выращенных в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были выбраны образцы володушки золотистой (*Vupleurum aureum Fisch.*) и володушки крупнолистной (*Vupleurum rotungifolium L.*), выращенные в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси».

Химический анализ образцов на содержание отдельных групп фенольных соединений проводили с использованием следующих методов:

– суммарное количество антоциановых пигментов – по методу [10] с измерением оптической плотности элюатов на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Градуировочную кривую строили по кристаллическому цианидину, полученному из плодов аронии черноплодной и очищенному по методике [11];

– суммарное количество катехинов – по методу [12] с использованием ванилинового реактива. Расчет проводили по

градуировочному графику, составленному по (+)-катехину. Измерение оптической плотности элюатов проводили на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 490-500 нм;

– суммарное количество флавонолов – по методу [13], модифицированному [14]. Оптическую плотность элюатов измеряли на спектрофотометре VSU=2P (Германия) при длине волны 258 нм. Расчет проводили на кверцетин;

– суммарное количество фенолкарбоновых кислот – по методу [15]. Оптическую плотность элюатов измеряли на спектрофотометре VSU=2P (Германия) при длине волны 325 нм. Расчет проводили по градуировочному графику, составленному по хлорогеновой кислоте.

ВЭЖХ – анализ агликонов флавонолов проводили согласно методике [16].

Условия экстрагирования: 0,1 г измельченного материала заливали 10 мл 70 % этилового спирта и проводили экстрагирование на кипящей водяной бане до полного извлечения флавоноидов (4 слива через 30 мин). Для получения агликонов водно-спиртовой экстракт гидролизовали 2 N раствором хлористоводородной кислоты 2 часа на водяной бане. После охлаждения гидролизат пропускали через фильтр Шотта с диаметром пор 16 мкм.

Условия хроматографирования: для выполнения анализа использовали хроматограф Agilent 1200, оборудованный детектором на основе диодной матрицы. Разделение смеси проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, размер зерна 5 мкм), оснащенной предколонкой Zorbax SB-C18 (4,6×12,5 мм, размер зерна 5 мкм), применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1 %) изменялось от 50 до 52 % за 18 мин. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26°C. Объем вводимой пробы 20 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda=370$ нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос.ч.), ортофосфорную кислоту (ос.ч.), бидистиллированную деионизованную воду. Для приготовления стандартных образцов применяли стандарты флавоноидов производства фирмы «Sigma».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление времен удерживания сигналов веществ на хроматограммах анализируемых образцов со временем удерживания сигналов стандартных образцов флавоноидов и анализ УФ-спектров позволили достоверно идентифицировать в обоих образцах кверцетин, кверцетрин, кемпферол и изорамнетин. По величине пиков можно судить о том, что кверцетин значительно превалировал во всех образцах.

На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма гидролизата этанольного экстракта сухой надземной массы володушки.

УФ спектры идентифицированных агликонов флавонолов и их формулы представлены на рисунках 2-5 [17].

Сезонную изменчивость содержания биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот изучали на двух ценопопуляциях в 2010 году в фазах вегетации, бутонизации, цветения и плодоношения (рисунки 6, 7).

Как видно из рисунков 6, 7, в фенольном комплексе исследуемой надземной массы володушек золотистой и крупнолистой преобладали флавонолы, содержание которых различалось по фазам развития. Максимальное накопление последних достигалось в фазу вегетации: до 4352 мг% для володушки золотистой и до 1178 мг% для володушки крупнолистной.

Для володушки золотистой было характерно постепенное равномерное накопление антоциановых пигментов с максимумом в фазу созревания семян (3679 мг%). В отличие от володушки золотистой антоциановые пигменты володушки крупнолистной накапливались неравномерно с максимумом в фазу плодообразования (819 мг%) и полным отсутствием в фазы цветения и созревания семян.

Были отмечены характерные особенности в изменении содержания катехинов володушки золотистой от фазы вегетации к фазе созревания семян. Количество катехинов соответственно уменьшалось от 533 мг% до 338 мг%. Такая же закономерность наблюдалась и у фенолкарбоновых кислот – от 1409 до 528 мг%. Максимальная сумма биофлавоноидов для володушки золотистой, отражающая все текущие тенденции, составила 5538 мг% в фазу созревания семян (см. рисунок 6).

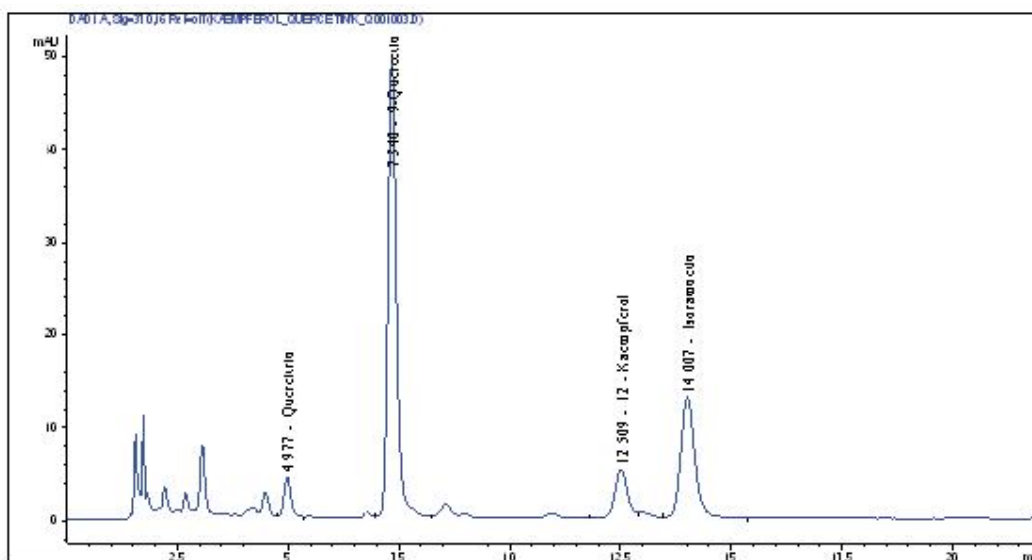


Рисунок 1 – Типичная хроматограмма гидролизата этанольного экстракта сухой надземной массы володушки.

На хроматограмме обозначены агликоны флавонолов: кверцетрин ($R_t = 4,977$ мин), кверцетин ($R_t = 7,34$ мин), кемпферол ($R_t = 12,509$ мин), изорамнетин ($R_t = 14,007$ мин)

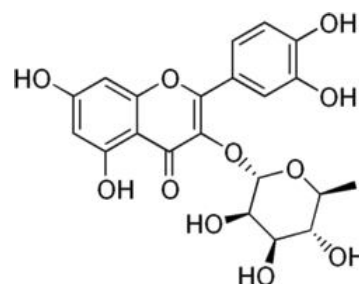
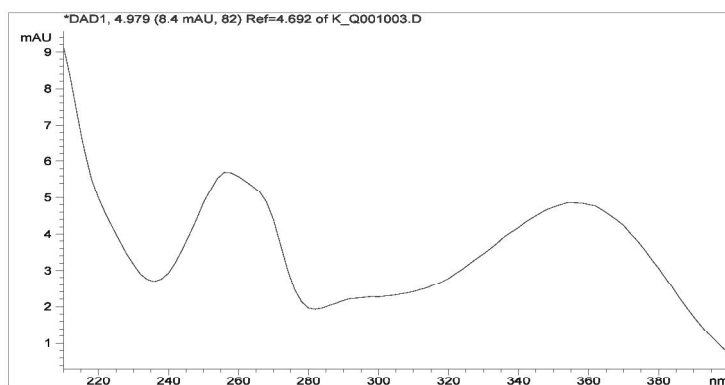


Рисунок 2 – УФ-спектр и структурная формула кверцетрина

Спектр поглощения этанольного раствора кверцетрина характеризуется $\lambda_{\text{макс.}} = 260$ и 362 нм.

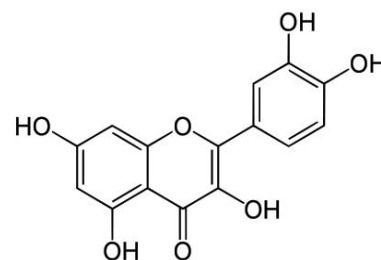
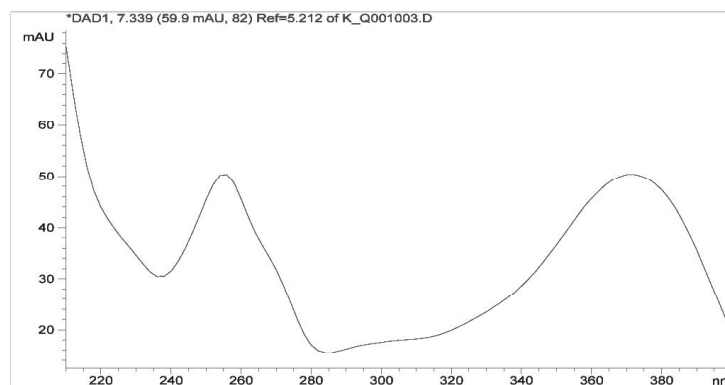


Рисунок 3 – УФ-спектр и структурная формула кверцетина

Спектр поглощения этанольного раствора кверцетина характеризуется $\lambda_{\text{макс.}} = 257$ и 375 нм.

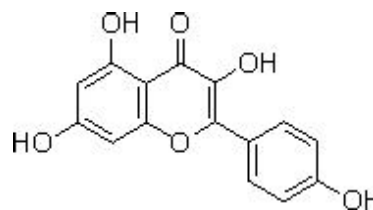
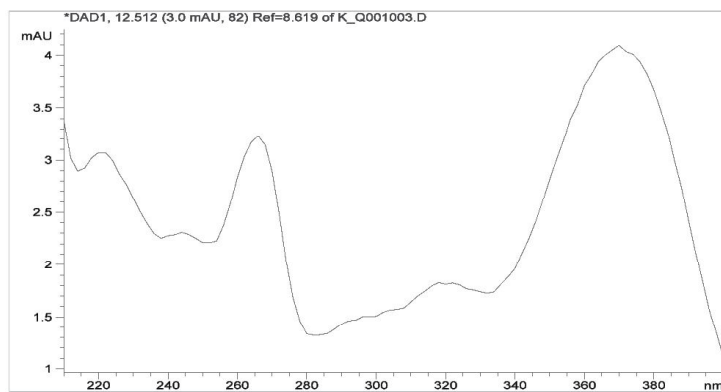


Рисунок 4 – УФ-спектр и структурная формула кемпферола

Спектр поглощения этанольного раствора кемпферола характеризуется полосами в УФ-области спектра с $\lambda_{\text{макс.}} = 218, 253, 266, 294, 322, 367$ нм.

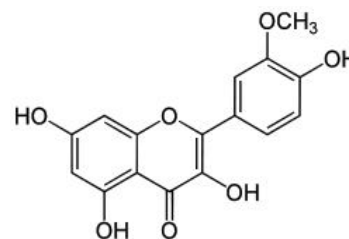
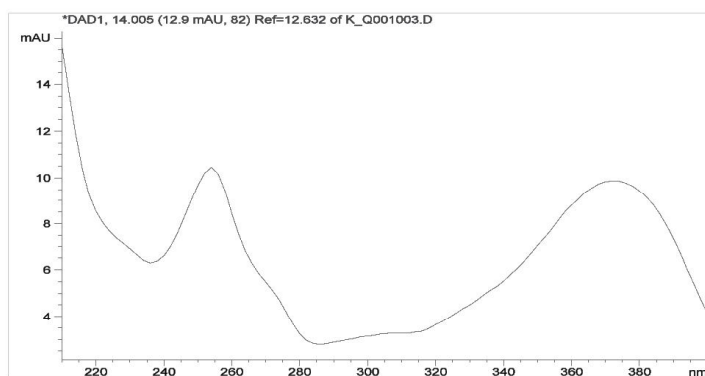


Рисунок 5 – УФ-спектр и структурная формула изорамнетина

Спектр поглощения этанольного раствора изорамнетина характеризуется полосами в УФ-области спектра с $\lambda_{\text{макс.}} = 253, 370$ нм.

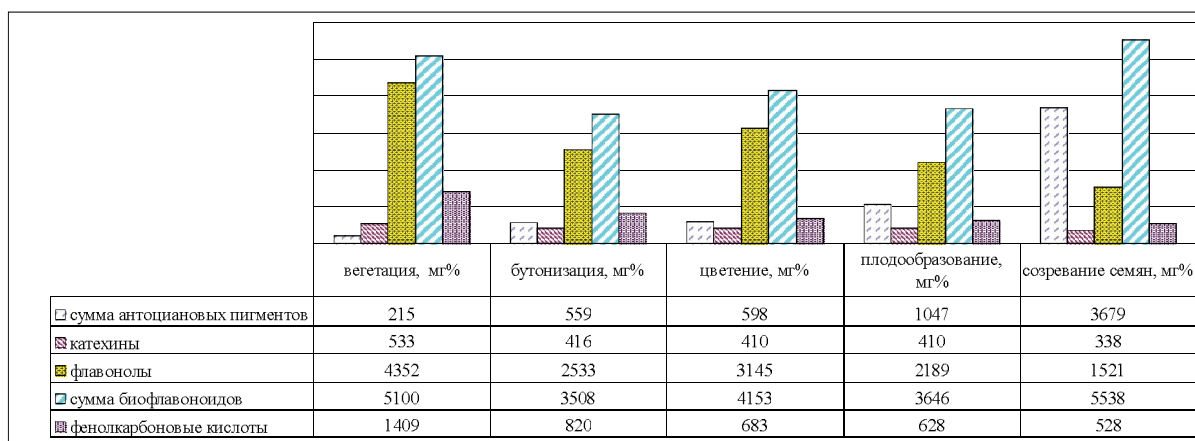


Рисунок 6 – Содержание фенольных соединений в сухой надземной массе володушки золотистой, в мг%

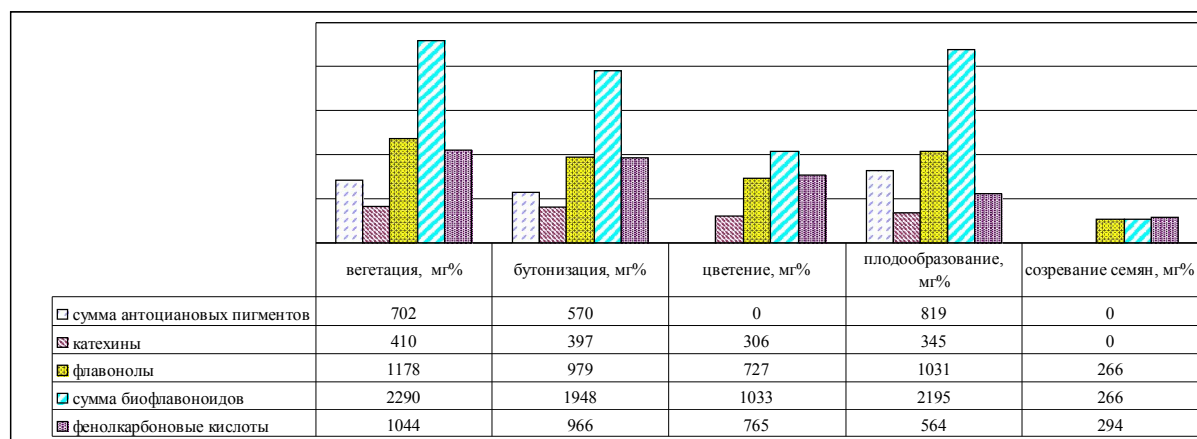


Рисунок 7 – Содержание фенольных соединений в сухой надземной массе володушки крупнолистной, в мг%

В образцах володушки крупнолистной катехины также плавно расходовались и в фазе созревания семян полностью отсутствовали. Фенолкарбоновые кислоты от максимума в фазу вегетации (1044 мг%) заметно уменьшились к фазе созревания семян (294 мг%). Эти тенденции отразились на суммарном количестве биофлавоноидов, с плавным и волнообразным переходом от фазы к фазе, проявляя тем самым своеобразие накопления веществ вторичного синтеза в процессе вегетации.

Таким образом, изучение особенностей образования и накопления биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот у растений володушек в течение вегетационного периода позволило установить, что эти особенности носят закономерный характер, тесно связанный с фазами развития в условиях произрастания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ВЭЖХ был изучен состав агликонов флавоноидов в образцах володушки золотистой и володушки крупнолистной, выращенных в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», и установлен типичный «флавоноидный профиль» для этого вида.

Определено, что в володушках золотистой и крупнолистной содержатся значительные количества биофлавоноидов (до 5538 и 2290 мг%, соответственно) и фенолкарбоновых кислот (до 1409 и 1044

мг%, соответственно). Содержание этих веществ в значительной степени определяется вегетационным периодом. Самый высокий уровень накопления биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот наблюдался в фазах вегетации и созревания семян.

Оба образца володушки, выращенные в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», характеризуются высоким содержанием биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот. С учетом высоких интродукционных показателей, а также острой потребности белорусского рынка в создании принципиально новых отечественных импортозамещающих лекарственных средств на основе растительного сырья для лечения заболеваний различного генезиса, данные образцы, безусловно, представляют интерес в качестве перспективного источника биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот как для традиционных, так и качественно новых лекарственных средств.

SUMMARY

N.M. Birykova, A. M. Ostrovskaya,
V. G. Sokolov, L.V. Kukhareva,
V.A. Ignatenko, T.V. Gil

THE INVESTIGATION
OF FLAVONOIDS' AND
PHENOLCARBONIC ACIDS' CONTENT
AND COMPOSITION OF BUPLEURUM L.,
CULTIVATED IN BELARUS

The results of the study of bioflavonoids' and phenolcarboxylic acids' content and com-

position in samples of medicinal plant raw material *Bupleurum L.* cultivated in the collection nursery of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus as well as seasonal variation of these components are given. Flavonol aglycons composition has been identified by HPLS method. High content of bioflavonoids and phenolcarbonic acids has been determined by the methods of spectrophotometry and paper chromatography. These samples can be regarded as a challenging raw material for the development of new domestic drugs.

Keywords: *Bupleurum L.*, *Bupleurum aureum Fisch.*, *Bupleurum rotungifolium L.*, flavonoids, quercetin, kaempferol, phenolcarbonic acids, HPLC.

ЛИТЕРАТУРА

- Семенов, А.А. Очерк химии природных соединений / А.А. Семенов. – Новосибирск: Наука, 2000. – 365 с.
- Костюк, В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.
- Pan, Sheng-Li. *Bupleurum* species. Scientific evaluation and clinical applications / Sheng-Li Pan. – FL, USA: Taylor & Francis Group, 2006. – 257 p.
- Минаева, В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование / В.Г. Минаева. – Новосибирск: Наука, 1978. – 256 с.
- Mori, K. Effect of *Hocho-ekki-to* (TJ-41), a Japanese herbal medicine, on the survival of mice infected with influenza virus / K. Mori, T. Kido, H. Daikuhara et al // *Antiviral Research.* – 1999. – V. 44. – №2. – P. 103–111.
- Гаман, А.В. Определение противовоспалительной активности препаратов растительного происхождения / А.В. Гаман, К.В. Яременко // Проблемы освоения лекарственных ресурсов Сибири и Дальнего Востока: Тез. докл. Всес. конф. СО АМН СССР, Новосибирск, 18-20 октября 1983 г. / Новосибирск: Наука, 1983. – С.179-181.
- Влияние водных извлечений из лекарственных растений на процессы свободнорадикального окисления / М.А. Рыжикова [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 1999. – Т. 62(2). – С. 36-38.
- Полифенольные и тритерпеновые соединения нового желчегонного препарата пекворина / П.Е. Кривенчук [и др.]; // *Материалы III Всероссийского съезда фармакологов / Свердловск, 1975.* – С. 301–302.
- Bermejo, P. Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia* / P. Bermejo, M.J. Abad, Am. Diaz et al. // *Planta Med.* – 2002. – Vol. 68(2). – P. 106-110.
- Swain, T. The phenolic constituents of *Prunus Domenstica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents / T. Swain, W. Hillis // *J.Sci. Food Agric.* – 1959. – Vol. 10(1). – P. 63-68.
- Скорикова, Ю. Г. Методика определения антоцианов в плодах и ягодах / Ю. Г. Скорикова, Э.А. Шафтан // Тр. 3 Всесоюз. семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод, 27-30 марта 1966 г. / Свердловск: Уральский лесотехнический ин-т., 1968. – С. 451-461.
- Запрометов, М.Н. Биохимия катехинов / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, 1964. – 325 с.
- Сарапуу, Л. Фенольные соединения яблони / Л. Сарапуу, Х. Мийдла // Уч. зап. Тарт. гос.ун-та, 1971. – Вып.256. – С.111-113.
- Шапиро, Д.К. Определение флавонолов в черноплодной рябине и других окрашенных плодах / Д.К. Шапиро, Л.Э. Дашкевич, Т.В. Довнар // *Интродукция растений и зеленое строительство / Ред. Смольский Н.В.* – Минск, 1974. – С. 209-213.
- Мжаванадзе, В.В. Количественное определение хлорогеновой кислоты в листьях черники кавказской (*V. arctostaphylos L.*) / В.В. Мжаванадзе, И.Л. Таргамадзе, Л.И. Драник // *Сообщ. АН Груз ССР.* 1971. – Т. 63. – вып. 1. – С. 205-210.
- Васильева, М.С. Хроматографическое исследование содержания и состава флавоноидов змеевика лекарственного *Bistorta Officinalis Delabre*, произрастающего в Сибири / М.С. Васильева, Г.И. Высочина // *Растительный мир Азиатской России.* – 2010. – Т. 5(1). – С. 87-94.
- Клышев, Л.К. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследований) / Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 218с.
- Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 3 т. Т.2. Контроль ка-

чества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: «Типография «Победа», 2008. – С. 385.

Адрес для корреспонденции:

*220030, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Ленинградская, д.14, к. 710,
Учреждение Белорусского
государственного университета
«Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем»
(НИИ ФХП БГУ)
тел. (служебный): (017)-226-56-43,
E-mail: sektormed@bsu.by,
Бирюкова Н.М.*

Поступила 27.09.2011 г.