

УДК 615.322:582.734.4:581.45.07.

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНОГО СОСТАВА ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО

О.Л. Жукова¹, А.А. Абрамов, Т.Д. Даргаева¹, А.А. Маркарян²

(кафедра радиохимии; e-mail: aaa@radio.chem.msu.ru)

Проведено изучение фенольного состава корневищ сабельника болотного методами УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлен качественный и количественный состав анализируемой группы веществ. На основании полученных данных разработаны унифицированные методики качественного и количественного анализа суммы действующих веществ.

Сабельник болотный (*Comarum palustre L.*) – небольшой полукустарничек семейства розоцветных (*Rosaceae*) с длинным одревесневающим подземным стеблем, переходящим в горизонтальное корневище, достигающее в длину 1 м. Ареал растения распространяется от Европейской части России до Западной и Восточной Сибири [1].

Сабельник болотный получил довольно широкое применение в народной медицине, однако в официальной терапии он не используется.

Проведенный ранее комплекс фармакологических исследований показал, что сабельник обладает ранозаживляющим, болеутоляющим, противовоспалительным, иммуностимулирующим, антиревматоидным и противоопухолевым действием [1–3]. В настоящее время отечественным производителем выпускается биологически активная добавка к пище (БАД) «Сабельник-Эвалар», которая рекомендована Минздравом России в качестве общеукрепляющего средства при повышенных нагрузках на опорно-двигательный аппарат [4].

Изучение химического состава сырья сабельника показало, что доминирующей группой биологически активных веществ (БАВ) являются дубильные вещества и мономерные катехины. В настоящее время для количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье используют известный перманганатометрический метод – метод Левенталя [5, 6]. Однако, учитывая тот факт, что перманганат калия является сильным окислителем в кислой среде, при титровании в реакцию вступают не только дубильные вещества, но и другие группы БАВ (витамины, фенолы, дигидрофлавоноиды и др.), что приводит к завышенным результатам.

Данная работа посвящена изучению состава фенольных соединений и разработке селективной методики их количественного определения с использова-

нием современных физико-химических методов исследования.

Экспериментальная часть

Для разработки метода количественного анализа по доминирующим группам БАВ необходимо детальное изучение химического состава сабельника болотного. Качественными реакциями и методом тонкослойной хроматографии удалось обнаружить в подземных частях растения флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, эфирные масла, каротиноиды, тритерпеновые сапонины. С учетом результатов фармакологического скрининга и данных предварительного химического анализа проведено изучение фенольных соединений в извлечениях из растительного сырья. Для анализа фенольного состава использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), отличающийся высокой чувствительностью и точностью и позволяющий достоверно судить о качественном составе изучаемой группы БАВ. Исследование проводили на приборе «Gilson» с последующей компьютерной обработкой результатов (программа «Мультихром» для «Windows»). В работе применяли обращеннофазный вариант метода, в качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку «Alltima C-18» (4,6×250 мм); подвижная фаза: метанол–вода–фосфорная кислота (конц.) в соотношении 40:60:0,5. Анализ проводили при комнатной температуре (20±2°С) в изократическом режиме элюирования. Скорость подачи элюента 0,7 мл/мин. Для детектирования использовали УФ-детектор ($\lambda = 254$ нм). Продолжительность анализа составляла 42 мин.

Методика проведения анализа

10 г корневищ сабельника болотного измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (ГОСТ 214-83).

¹Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН; ²Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова.

Навеску измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 70 мл 70%-го спирта и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания спирто-водной смеси, экстракцию повторяют дважды. Извлечения охлаждают, объединяют и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем тем же растворителем до метки (раствор А). Параллельно готовят 0,05%-е растворы сравнения в метаноле: рутин, кверцетин, кемпферола, гесперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, галловой, цикоревой, феруловой, эллаговой, хлорогеновой, салициловой и коричной кислот, танина, пирогаллола, эпикатехина. По 20 мкл исследуемого раствора и растворов сравнения вводят в хроматограф и анализируют в условиях, описанных выше. Полученные результаты приведены на рис. 1.

Таким образом, извлечения, полученные из сабельника болотного, содержат следующие вещества фенольной природы, идентифицированные по времени удерживания стандартных растворов: гесперидин, лютеолин, лютеолин-7-гликозид, галловая, цикориевая, эллаговая, хлорогеновая, салициловая и коричная кислоты, а также танин, пирогаллол.

С помощью ВЭЖХ-анализа удалось подтвердить качественный фенольный состав веществ, идентифицированных ранее с помощью тонкослойной хроматографии, а также получить представление о том, какие фенольные соединения доминируют в изучаемом растительном сырье, что крайне необходимо для последующей разработки методики их количественного определения. Разработке оптимальной ме-

тодики количественного анализа предшествовала работа по изучению поглощений в УФ-области спектра водно-спиртовых извлечений, приготовленных по нижеприведенной методике.

Методика приготовления водно-спиртовых извлечений

Около 10 г навески корневищ сабельника болотного помещают в колбу объемом 200 мл, добавляют 70 мл 70%-го спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания спирто-водной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, и доводят объем этим же растворителем до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,5 мл раствора А, доводят соответствующим растворителем до метки и перемешивают. Спектр поглощения полученного раствора снимают в диапазоне длин волн 220–450 нм на саморегистрирующем спектрофотометре "Gelios" (США) в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность растворов стандартных образцов: рутин, кверцетин, кемпферола, гесперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, галловой, цикориевой, феруловой, эллаговой, хлорогеновой, салициловой и коричной кислот, танина, пирогаллола, эпикатехина в 70%-м спирте. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что спектры поглощения водно-спиртовых извлечений из сырья имеют максимум поглощения при длине волны 280 нм. Поскольку наличие полос поглощения при 250–290 и 320–380 нм характерно для соединений фенольного ряда, можно сделать вывод о содержании в извлечениях флавоноидов, дубильных веществ и фенолкарбоновых кислот, что согласуется с результатами, полученными методом ВЭЖХ.

Фенольные соединения являются доминирующими в изучаемом сырье и на их долю приходится основной вклад ожидаемого фармакологического эффекта. Поскольку эти вещества поглощают в УФ-области спектра, при разработке методики количественного анализа за основу предложен метод УФ-спектрофотометрии.

Из литературных источников известно [5], что главная проблема при разработке методики количественного определения для лекарственного растительного сырья состоит в изучении основных гидродинамических факторов экстракционного процесса. Настоящая работа посвящена изучению влияния природы экстрагента и других факторов (соотношение с сырьем, измельченность сырья, продолжи-

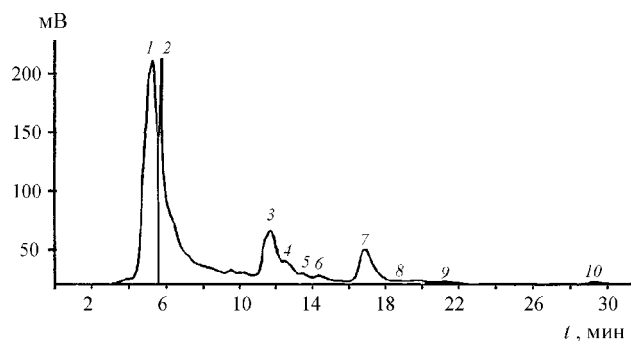


Рис. 1. Хроматограмма 70%-го спиртового извлечения из корневищ сабельника:

Номер пика	Название	Время удерживания, мин
1	Хлорогеновая кислота	4,67
2	Галловая кислота	4,83
3	Цикориевая кислота	10,83
4	Гесперидин	12,25
5	Пирогаллол	12,75
6	Лютеолин-7-гликозид	14,17
7	Эллаговая кислота	16,42
8	Лютеолин	18,33
9	Салициловая кислота	20,58
10	Коричная кислота	28,67

Т а б л и ц а 1

Результаты спектрофотометрического определения 70%-го спиртового извлечения из корневищ сабельника и растворов стандартных образцов

УФ-спектр поглощения	Максимум поглощения, нм
Исследуемого извлечения	280
Арбутина	221, 285
Хлорогеновой кислоты	235, 244, 324
Кофейной кислоты	290, 309
Коричной кислоты	270
Галловой кислоты	267
Эпикатехина	279
Феруловой кислоты	215, 292, 318
Лютеолин-7-гликозида	213, 221, 254, 267, 291, 352
Лютеолина	212, 255, 291, 352
Гиперозида	213, 257, 357
Кверцетина	256, 291, 371
Рутина	257, 358

тельность и кратность экстракций) на выход действующих веществ.

При выборе экстрагента использовали разные растворители, настаивая в них растительное сырье при комнатной температуре на водяной бане с обратным холодильником в течение 2 ч. В качестве оптимального экстрагента выбран 70%-й спирт. При последующем изучении условий экстракции установлено, что с увеличением ее времени выход действующих веществ не увеличивается. Экстрагирование биологически активных соединений из корневищ сабельника болотного целесообразно проводить однократно, так как при удлинении времени экстракции содержание фенольных веществ в сырье не увеличивается. Опытным путем установлено оптимальное соотношение сырье:экстрагент (1:10). Измельченность сырья – 2 мм. Результаты изучения условий экстракции представлены в табл. 2.

При выборе аналитической длины волны опирались на данные, полученные в результате УФ-спектрофотометрического исследования водно-спиртового извлечения из сырья и рабочего стандартного образца (PCO) хлорогеновой кислоты. Максимумы спектров поглощения изучаемых объектов совпадают при 280–290 нм (рис. 2). Выбор хлорогеновой кислоты в качестве PCO обусловлен ее доминированием в количественном отношении и наличием плеча (280–300 нм) в УФ-области спектра. Таким образом, экспериментально установлены параметры для разработки методики количественного анализа.

Методика проведения анализа

Около 10 г (точная навеска) корневищ сабельника болотного помещают в колбу объемом 200 мл, прибавляют 70 мл 70%-го спирта, присоединяют колбу к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания спирто-водной смеси. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем этим же растворителем до метки (раствор А). В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,5 мл раствора А, доводят 70%-м спиртом до метки и перемешивают.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на саморегистрирующем спектрофотометре "Gelios" (США) в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали 70%-й спирт.

Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность PCO хлорогеновой кислоты в 70%-м спирте. Для этого 0,055 г (точная навеска) хлорогеновой кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл 70%-го спирта, перемешивали до растворения и доводили 70%-м спиртом до метки (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5 мл раствора Б и доводили до метки 70%-м спиртом. Расчет количественного содержания фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухую массу в сырье проводили по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 250 \cdot 100}{D_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 250 \cdot 1,5 \cdot (100 - W)} \cdot 100\%$$

Т а б л и ц а 2

Влияние условий экстракции на выход фенольных соединений (ФС) из корневищ сабельника болотного

Условия экстракции	Содержание суммы ФС, %
Концентрация спирта, %	
40	1,79
50	1,83
70	1,85
90	1,81
Соотношение сырья и экстрагента	
1:5	1,76
1:10	1,85
1:15	1,82
Время экстракции, ч	
0,5	1,68
1	1,85
1,5	1,83
Измельченность, мм	
0,5	1,74
1	1,84
2	1,85
3	1,79
5	1,65

Т а б л и ц а 3

Метрологическая характеристика методики количественного определения фенольных соединений в корневищах сабельника болотного в пересчете на РСО хлорогеновой кислоты

F	\bar{X}	S ²	S	P, %	t _(p,f)	Δx	E, %
10	1,85	0,0009	0,03	95	2,23	0,067	±3,62

Т а б л и ц а 4

Результаты опытов с добавками РСО хлорогеновой кислоты

Содержание фенольных соединений в сырье, мг	Добавлено РСО хлорогеновой кислоты, мг	Должно быть, мг	Найдено, мг	Абсолютная ошибка, мг	Относительная ошибка, %
1,8	0,1	1,9	1,89	-0,01	-0,53
1,8	0,2	2,0	1,99	-0,01	-0,50
1,8	0,3	2,1	2,11	+0,01	+0,47

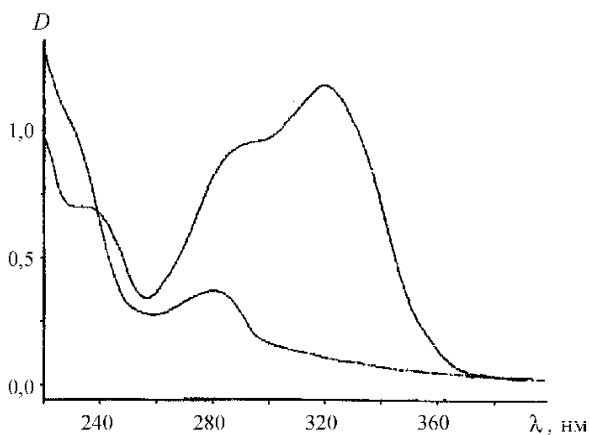


Рис. 2. УФ-спектры поглощения 70%-го водно-спиртового извлечения из корневищ сабельника (1) и РСО хлорогеновой кислоты (2)

где D – оптическая плотность испытуемого раствора, D_0 – оптическая плотность РСО хлорогеновой кислоты, m_0 – масса РСО хлорогеновой кислоты (г), m_1 – масса растительного сырья (г), W – потеря в массе при высушивании сырья (%).

Результаты исследований и метрологические характеристики методики количественного определения фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту представлены в табл. 3. Как видно из данных этой таблицы, содержание фенольных соединений составляет 1,85% при относительной погрешности ±4,35% (для доверительной вероятности 95%). Отсутствие систематической ошибки методики доказано опытами с добавками РСО хлорогеновой кислоты в навеску сырья. Результаты анализа представлены в табл. 4. На основании этих результатов

можно сделать вывод, что относительная ошибка опыта находится в пределах случайной погрешности предложенной методики и свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при определении содержания фенольных соединений в сырье сабельника болотного в пересчете на РСО хлорогеновой кислоты. Разработанная методика количественного определения фенольных соединений корневищ сабельника болотного будет включена в проект фармакопейной статьи, регламентирующей его качество.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукьянов О.Л. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004.
2. Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения (растения-целители). М., 1990. С. 207.
3. Наумчик Г.Н. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Л., 1964.
4. Прокопьева Л.Г., Виноградов А.К., Калачикова Л.Г., Трубников В.Г., Козлов Б.И., Сапожникова К.А. // Мат-лы VII Межд. съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». Пушкин, 2003. С. 454.
5. Государственная фармакопея. XI изд. Вып. I. М., 1987.
6. Запрометов М.Н. Основы биохимии природных соединений. М., 1974.

Поступила в редакцию 02.06.05

STUDY ON THE PHENOL COMPOSITION OF THE CAMARUM POLUSTRE SOIL COVERED ORGANS

O.L. Zhukova, A.A. Abramov, T.D. Dargaeva, A.A. Markarian

(Division of Radiochemistry)

A phenol composition of the soil covered organs *Camarum Polustre* was investigated by UV-spectrophotometry and HPLC techniques. Both quality and quantitative composition of the tested compounds group has been found. Taking into account the obtained data, a unified methods for quality and quantitative analyses of the active compounds pool has been developed.