

Г. Пуоджюнене¹, В. Янулис¹, З. Барстейгене¹, М. Камандулис²,
Р. Сладковский³, П. Солих³

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ В ЛЕКАРСТВЕННОМ СЫРЬЕ ДЕСМОДИУМА КАНАДСКОГО

¹ Каунасский медицинский университет, Каунас, Литва;

² Аптека подсолнечников, Вильнюс, Литва;

³ Градец Краловский медицинский факультет Пражского Карлового университета, Чехия

Проведено исследование качественного и количественного содержания фенольных кислот в траве десмодиума канадского (*Desmodium canadense* (L.) DC., *Fabaceae*), собранной в различные фазы вегетации в отделе лекарственных растений Каунасского ботанического сада Университета Витаутаса Великого. Методом ВЭЖХ идентифицировано 5 фенольных кислот: хлорогеновая, ванилиновая, 4-гидроксикоричная, феруловая и кофейная. Наибольшее количество идентифицированных кислот в траве накапливается в фазах бутонизации и цветения. Среди них доминировали ванилиновая (0,240 мг/г), кофейная (0,178 мг/г) и хлорогеновая (0,120 мг/г) кислоты, количество которых постепенно уменьшается в процессе вегетации растения.

Ключевые слова: десмодиум канадский, трава, флавоноиды, фенольные кислоты, фазы вегетации.

В итоге проведенных нами исследований качественного и количественного содержания флавоноидов в траве десмодиума канадского (*Desmodium canadense* (L.) DC., *Fabaceae*), собранной в различные фазы вегетации в Отделе лекарственных растений Каунасского ботанического сада Университета Витаутаса Великого, методом ВЭЖХ было идентифицировано 15 флавоноидов агликоновой и гликозидной природы: апигенин, апигенин-7-О-гликозид, лютеолин, рутин, виценин-2, витексин, изовитексин, витексина рамнозид, ориентин, гомоориентин, кверцитрин, кверцетин, гиперозид, астрагалин, кемферол, которые в большей степени и обуславливают фармакологическое действие препарата хелепина Д.

В природе распространены и другие фенольные соединения, в частности, фенольные кислоты — гидроксипроизводные бензойной и коричной кислот. В настоящее время проводятся широкие исследования по установлению присущего им не только противоокислительного [1], но и антиканцерогенного [2], гепатопротекторного [3], кардиопротекторного [4], антидиабетического (гипогликемического) [5] и др. действия.

Поскольку литературных данных об исследовании фенольных кислот в лекарственном сырье — траве десмодиума канадского не удалось найти, представлялось интересным изучить состав и количественное содержание фенольных кислот в образцах травы десмодиума канадского, выращенной в центральном регионе Литвы в отделе лекарственных растений Каунасского ботанического сада Университета Витаутаса Великого и собранной в различные фазы вегетации.

Цель исследований — количественное определение фенольных кислот в образцах травы десмодиума канадского.

Материалы и методы

В качестве эталонов использовались кофейная (> 98 %), ванилиновая (> 97 %), феруловая (> 99 %), 4-гидроксикоричная (> 97 %), галловая (> 97 %), хлорогеновая (> 95 %) и 3,4-дигидроксibenзойная (> 97 %) кислоты производства SIGMA-ALDRICH. Химикалии: аммоний хлористый (> 99,5 %), TRIZMA® основание кристаллическое [трис-(гидрокси-метил)аминометан] (> 99,5 %), изопропиловый спирт (> 99,7 %) были аналитической чистоты производства SIGMA-ALDRICH; орто-фосфорная кислота 85 % — производства MERCK; метанол CHROMASOLV® для ВЭЖХ (≥ 99,9 %), ацетонитрил CHROMASOLV® для ВЭЖХ и вода CHROMASOLV® для ВЭЖХ — производства SIGMA-ALDRICH.

Растительное сырье. Собирали верхушки стеблей растений *Desmodium canadense* (L.) D. C., *Fabaceae* длиной около 40 см, в различные фазы вегетации: во время бутонизации, в начале цветения, во время полного цветения, в начале плодоношения, во время полного созревания плодов и со скошенной и вновь отрастающей травы. Траву сушили при комнатной температуре.

Экстракция. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 710 мкм [6]. В плоскодонную колбу емкостью 50 мл всыпали 0,5000 г размельченного порошка травы десмодиума канадского, наливали 20 мл метанола 50 % и помещали в ультразвуковую баню на 30 мин. Для удаления растительного материала экстракт фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 20 мл, промывали осадок тем же растворителем и объем фильтрата доводили тем же растворителем до метки.

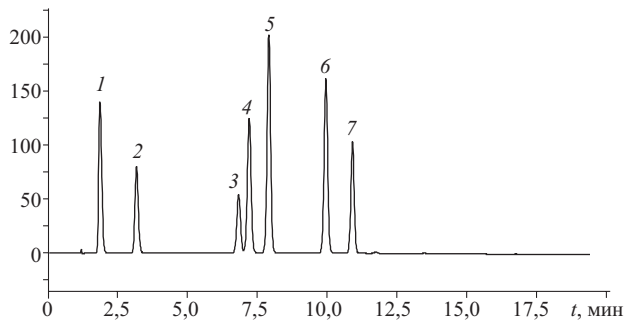


Рис. 1. Хроматограмма стандартных образцов фенольных кислот. Пики по временам удержания: 1 — галловая кислота, 2 — 3,4-дигидроксibenзойная кислота, 3 — хлорогеновая кислота, 4 — ванилиновая кислота, 5 — кофейная кислота, 6 — 4-гидроксикоричная кислота, 7 — феруловая кислота.

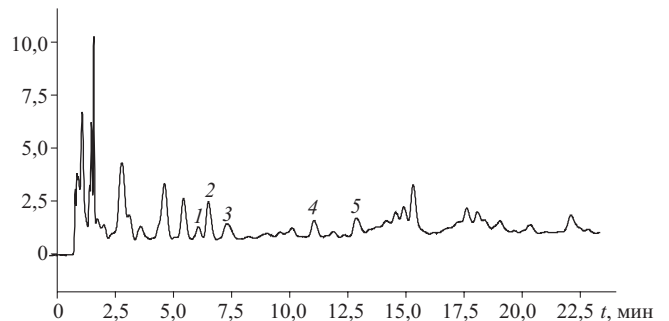


Рис. 2. ВЭЖХ хроматограмма фенольных кислот в экстракте травы десмодиума канадского, собранного в фазе цветения. Пики по временам удержания: 1 — хлорогеновая кислота, 2 — ванилиновая кислота, 3 — кофейная кислота, 4 — 4-гидроксикоричная, 5 — феруловая кислота. 3,4-Дигидроксibenзойная и галловая кислоты в экстракте не обнаружены.

Метанольный экстракт подвергали твердофазной экстракции. Через кассетку, заполненную анионообменным сорбентом Discovery DSC-SAX, пропускали 1 мл метанола, 2 мл 0,025 М раствора ТРИС. Потом по очереди через колонку медленно пропускали 1 мл смеси метанольного экстракта и 0,025 М раствора ТРИС (1:2 V/V), 1 мл смеси 0,025 М раствора ТРИС и метанола (1:4 V/V) и за тем 1 мл смеси изопропилового спирта и 1 М раствора аммония хлорида (3:7 V/V). Полученный раствор фильтровали через 0,45 мкм фильтр.

Хроматографический анализ. Хроматографирование проводили на приборе фирмы Shimadzu SIL-HTA, оснащенном дегазатором DGU-14A, дозатором LC-10AD, автоматическим регулятором градиента FCV-10AL, нагревателем колонки CTO-10AC, детектором флуоресценции RF-10A XL и детектором матрицы диодов SPD-M 10A. Начальная длина волны 190 нм, конечная — 400 нм. Расчеты проводили при длине волны 210 нм. Колонка Discovery C18 (4,0 × 125, 5 мкм). Разделение проводили методом обратных фаз, в качестве подвижной фазы использовали систему, состоящую из 2 элюентов: А — смесь метанола и 0,085 % орто-фосфорной кислоты (1,5:8,5 V/V) и Б — метанол. Программа градиентной элюции: 0–3 мин 100 % (А), 0 % (Б); 3–23 мин 100 → 70 % (А), 0 → 30 % (Б); 23–26 мин 70 → 100 % (А), 30 → 0 % (Б). Скорость потока 1,0 мл/мин, вводимый объем 10 мкл.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные данные статистически обрабатывали, ис-

пользуя компьютерную программу — пакет статистики SPSS 11 (SPSS Inc., Чикаго, США).

Результаты и их обсуждение

Для определения продолжительности экстрагирования исследуемый материал в 70 % метаноле озвучивали 30, 45 и 60 мин. Ключевыми соединениями выбрали кофейную и хлорогеновую кислоты. Если их количества в экстракте после тридцатиминутного экстрагирования принять за 100 % (это не означало стопроцентной экстракции ключевых соединений), то после 45 мин они составляли 101,1 и 102,53 %, а после 60 мин — 92,11 и 93,89 % соответственно. Таким образом, мы остановились на продолжительности экстрагирования в течение 30 мин.

С целью подбора экстрагента экстрагирование проводили метанолом 50 и 70 % и этанолом 50 и 70 %. В роле ключевых соединений были те же хлорогеновая и кофейная кислоты. После твердофазной экстракции в эксперименте выход регенерированной хлорогеновой кислоты составил 99,91 %, а кофейной кислоты — 91,37 %. Количество ключевых соединений в экстракте после 30 мин экстрагирования 50 % метанолом было принято за 100 %. Как видно из табл. 1, фенольные кислоты лучше экстрагируются 50 % метанолом.

Идентификация фенольных кислот проводилась путем сравнения времен удерживания соединений, находящихся в экстракте, с временами удерживания стандартных образцов, а также путем сравнения площадей пиков до и после прибавления раствора соответствующего стандартного образца (табл. 2).

Таблица 1
Количество регенерированных ключевых соединений в экстракте

Экстрагент	Кофейная кислота, %	Хлорогеновая кислота, %
50 % метанол	100,00	100,00
70 % метанол	84,55	90,18
50 % этанол	99,85	79,63
70 % этанол	89,41	88,36

Таблица 2
Времена удерживания ключевых соединений, мин

Стандарт	Хлорогеновая кислота	Ванилиновая кислота	Кофейная кислота	4-Гидроксикоричная кислота	Феруловая кислота
Время удерживания	6,516	6,957	7,779	11,563	13,401

Результаты исследований содержания фенольных кислот в экстракте травы (мг/г), собранной в различные фазы вегетации, и со скошенной и вновь отрастающей травы

Стадия вегетации	Хлорогеновая кислота ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)	Ванилиновая кислота ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)	4-Гидроксикоричная кислота ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)	Феруловая кислота ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)	Кофейная кислота ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)
Начало бутонизации	0,120 ± 0,006	0,1617 ± 0,017	0,020 ± 0,003	0,021 ± 0,004	0,271 ± 0,031
Бутонизация	0,121 ± 0,0071	0,240 ± 0,031	0,041 ± 0,004	0,039 ± 0,007	0,178 ± 0,026
Цветение	0,105 ± 0,0086	0,211 ± 0,025	0,039 ± 0,005	0,056 ± 0,008	0,083 ± 0,008
Начало плодоношения	0,073 ± 0,005	0,141 ± 0,016	0,015 ± 0,0012	0,060 ± 0,004	0,055 ± 0,007
Полное созревание плодов	0,093 ± 0,008	0,160 ± 0,019	0,013 ± 0,002	0,021 ± 0,003	0,078 ± 0,008
Отрастание травы после скошения	0,201 ± 0,019	0,180 ± 0,017	0,016 ± 0,0015	0,017 ± 0,0011	0,363 ± 0,056
Бутонизация отрастающей после скошения травы	0,166 ± 0,027	0,260 ± 0,031	0,027 ± 0,0052	0,008 ± 0,0006	0,292 ± 0,038

Замечание: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ — средний результат ± стандартное отклонение среднего результата.

При разработке хроматографического метода определения фенольных кислот были использованы растворы стандартных образцов кофейной, ванилиновой, феруловой, 3,4-дигидроксibenзойной, галловой, хлорогеновой и *пара*-кумариновой кислот. Наилучшее разделение было достигнуто, когда применяли следующую программу градиентной элюции: 0–3 мин 100 % (А), 0 % (Б); 4–21 мин 100 → 50 % (А), 0 → 50 % (Б); 22–26 мин 50 → 100 % (А), 50 → 0 % (Б). Полученная хроматограмма представлена на рис. 1.

Однако при апробации метода определения фенольных кислот в экстракте травы лучшие результаты были получены при увеличении концентрации метанола в мобильной фазе до 30 % в течение 20 мин (рис. 2).

Результаты исследований содержания фенольных кислот в экстракте травы, собранной в различные фазы вегетации, и со скошенной и вновь отрастающей травы представлены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 результаты показывают, что наибольшее количество фенольных кислот в траве накапливается в стадиях бутонизации и цветения растения и в дальнейшем в процессе вегетации постепенно уменьшается.

Количественное содержание фенольных кислот в скошенной и вновь отросшей траве распределилось по

тому же принципу, как и в не подвергавшейся скашиванию траве: преобладали кофейная, ванилиновая и хлорогеновая кислоты. Количество кофейной кислоты в стадии отрастания увеличилось до 0,0363 мг/г, а в стадии бутонизации — уменьшилось до 0,0292 мг/г.

Таким образом, в траве десмодиума канадского идентифицированы фенольные кислоты: хлорогеновая, ванилиновая, 4-гидроксикоричная, феруловая и кофейная. Наибольшее количество фенольных кислот достигалось в фазах бутонизации и цветения.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Tominaga, Y. Kobayashi, T. Goto, et al., *Yakugaku Zasshi.*, **125**(4), 371–375 (2005).
2. V. Staniforth and L. T. Chiu, N. S. Yang, *Carcinogenesis*, **27**(9), 1803–1811 (2006).
3. R. Rukkumani, K. Aruna, P. Suresh Varma and V. Padmanabhan Menon, *J. Med. Food*, **7**(4), 456–461 (2004).
4. V. N. Perfilova, A. V. D'iakova, IN Tiurenkov, *Eksp. Klin. Farmakol.*, **68**(5), 19–22 (2005).
5. P. Nicasio, L. Aguilar-Santamaria, E Aranda, et al., *Phytother. Res.*, **19**(8), 661–42005.
6. *European Pharmacopoeia. 6th. ed., Council of Europe, Strasbourg; Cedex, France* (2007), p. 16.

Поступила 28.07.08

QUANTITATIVE ESTIMATION OF THE CONTENT OF PHENOLIC ACIDS IN THE HERBS OF SHOWY TICK TREFOIL

G. Puodziunene¹, V. Janulis¹, Z. Barsteigene¹, M. Kamandulis², R. Sladkovsky³, and P. Solix³

¹ Kaunas University of Medicine, Kaunas, Lithuania;

² Sunflower Drugstore, Vilnius, Lithuania;

³ Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University of Prague, Prague, Czech Republic

Quantitative and qualitative analysis of phenolic acids in the herbs of Showy tick trefoil (*Desmodium canadense* (L.) DC., fam. Fabaceae), collected at different stages of vegetation at the Department of Medicinal Herbs of the Kaunas Botanical Garden (Vytautas Magnus University, Kaunas), was performed using HPLC techniques. Five phenolic acids were identified, including chlorogenic, vanillic, 4-hydroxycinnamic, caffeic and ferulic. The maximum amount of identified phenolic acids was accumulated at the butonization and flowering phases. At these stages, vanillic acid (0.240 mg/g), caffeic acid (0.178 mg/g), and chlorogenic acid (0.120 mg/g) predominated. In the following vegetation stages, the content of these acids gradually decreased.

Key words: snowy tick trefoil, herb, flavonoids, phenolic acids, phenological phases.