

© Коллектив авторов, 2009

Г. Пуоджюнене¹, В. Янулис¹, Л. Иванаускас¹, З. Барстейгене¹,
В. Рибокайте², О. Рагажинскене³

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ДЕСМОДИУМА КАНАДСКОГО МЕТОДОМ ВЭЖХ

¹ Каунасский медицинский университет, Каунас, Литва;

² ЗАО аптека "Гербария", Каунас, Литва;

³ Университет Витаутаса Великого, Каунас, Литва

Проведено исследование 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 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 и кемферол. Наибольшее количество идентифицированных веществ в траве достигалось в фазе начала цветения (13573,83 мкг/г). Среди них доминировали ориентин и гомоориентин (6236,24 мкг/г), виценин-2 (2040,25 мкг/г), витексин (1717,12 мкг/г), изовитексин (1767,82 мкг/г) и рутин (925,72 мкг/г).

Ключевые слова: десмодиум канадский, вегетативные органы, трава, репродукционные органы, флавоноиды, фазы вегетации.

Изучение биологической активности наиболее широко представленных в природе флавоноидов показало, что для них характерно противоаллергическое, противовоспалительное, противовирусное и антиоксидантное действие. В основе их антиоксидантной активности лежит способность к хелатообразованию с ионами железа и других металлов, обладающих переменной валентностью, высокая способность к переносу электронов, что химически объясняется присутствием большого количества гидроксильных групп в молекуле. Просматривается аналогия в механизме антиоксидантного действия флавоноидов с витаминами С и Е. Противовоспалительное действие обусловлено способностью тормозить образование медиаторов воспаления — простагландинов и лейкотриенов. Они также принимают участие в активизации ряда типов клеток, в том числе базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, гепатоцитов и др. [1 – 3]. Известны и мочегонные свойства флавоноидов. Диуретический эффект обнаружен, в частности, у кверцетина, кемпферола, морина, кверцитрина, рутина, робинина, гиперина, гесперидина, лютеолина и ряда других флавоноидов, а у некоторых их производных выявлена гипотензивная активность. Обнаружен и нефропротективный эффект флавоноидов [2].

Лекарственным препаратом хелепин Д, полученный из надземной части десмодиума канадского, семейства бобовых (*Desmodium canadense* (L.) DC., *Fabaceae*) [4], содержит не менее 55 % [5] суммы флавоноидов, в которой идентифицированы изоориентин, витексин,

изовитексин, виценин-2 и др. [6, 7]. Хелепин Д обладает противомикробным [8], обезболивающим [7], противовирусным [5] действием и применяется для лечения герпетической инфекции [9]. Он увеличивает число иммунокомпетентных клеток, стимулирует Т лимфоциты *in vitro* и *in vivo*, особенно Th [10 – 12].

С применением упрощенной технологии экстрагирования и очистки получен сухой экстракт, содержащий не менее 15 % суммы флавоноидов (в пересчете на изоориентин) [13] и обладающий противовоспалительной [14], гипотензивной [15] и иммуностимулирующей [16] активностью. Созданы глазные капли хелепина Д (0,2 % раствор), применяемые для лечения офтальмогерпеса и аденовирусной инфекции глаз [17].

Ввиду перспективы возрастающего применения препаратов десмодиума канадского в практической медицине в 1994 г. это растение было интродуцировано в отделе лекарственных растений Каунасского ботанического сада Университета Витаутаса Великого.

Лекарственным растительным сырьем десмодиума канадского является трава. Цель исследований — количественное определение флавоноидов в образцах травы десмодиума канадского, собранных в центральном регионе Литвы в отделе лекарственных растений Каунасского ботанического сада Университета Витаутаса Великого.

Материалы и методы

Химикалии. Использовали стандартные образцы: апигенин, апигенин-7-О-гликозид, лютеолин, рутин,

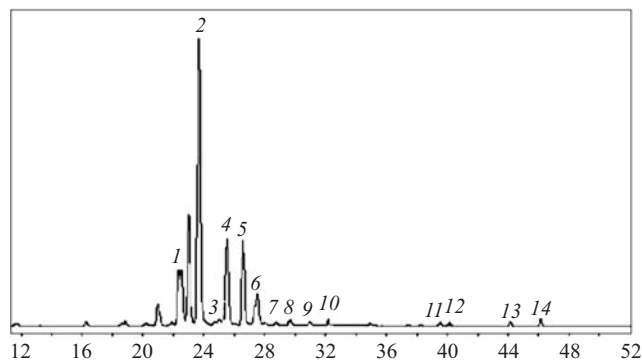


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограмма этанольного экстракта, приготовленного на 70 % этиловом спирте, травы десмодиума канадского, собранной в фазе бутонизации. Пики по времени удерживания: 1 — вицинин-2, 2 — ориентин и гомоориентин, 3 — витексина рамнозид, 4 — витексин, 5 — изовитексин, 6 — рутин, 7 — гиперозид, 8 — апигенин-7-О-гликозид, 9 — астрагалин, 10 — кверцитрин, 11 — лютеолин, 12 — кверцетин, 13 — апигенин, 14 — кемферол.

вицинин-2, витексин, изовитексин, витексина рамнозид, ориентин, гомоориентин, кверцитрин, кверцетин, гиперозид, астрагалин, кемферол для ВЭЖХ — производимые фирмами Carl Roth GmbH (Германия), Chromadex (США) и Fluka (Швейцария). Растворы стандартов в 70 % этиловом спирте приготавливали в концентрациях от 0,5 до 100 мкг/мл. Концентрация этанола выражена в объемных процентах. Ацетонитрил CHROMASOLV® для ВЭЖХ и воду CHROMASOLV® для ВЭЖХ использовали производства фирмы SIGMA-ALDRICH.

Растительное сырье. Собирали верхушки стеблей десмодиума канадского (*Desmodium canadense* (L.) DC.) длиной около 40 см, в различные фазы вегетации: во время бутонизации, в начале цветения, во время полного цветения, в начале плодоношения и во время полного созревания плодов.

Экстракция. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с от-

верстиями размером 355 мкм [18]. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в плоскодонную колбу вместимостью 25 мл, заливали 25 мл 70 % этилового спирта, закрывали стеклянной пробкой, взбалтывали и оставляли в темном месте при комнатной температуре в течение 6 ч. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки 70 % этиловым спиртом. Полученные экстракты фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Carl Roth GmbH, Германия).

Хроматографический анализ. Анализ проводили методом ВЭЖХ, используя хроматографическую систему Waters 2690 Alliance (Waters, США) с УФ/Вис детектором Waters 2487 и детектором матрицы диодов Waters 996. Хроматографическое разделение проводили с помощью колонки “XTerra RP 18” 3,5 мкм (150 × 3,9 мм). Температура колонки 20 °С. Объем инъекции — 10 мкл. Разделение проводили методом обратных фаз, в качестве подвижной фазы использовали систему, состоящую из 2 элюентов: А — 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты (ТФК) в воде и Б — 0,1 % раствор ТФК в ацетонитриле. Программа градиентной элюции: 0 – 45 мин 95 → 55 % А, 5 → 45 % Б; 45 – 50 мин 55 % А, 45 % Б; 50 – 55 мин 55 → 95 % А, 45 → 5 % Б. Скорость элюирования — 0,4 мл/мин.

Детектирование пиков проводили при длине волны 360 нм. Идентификацию пиков проводили, сравнивая времена удерживания пиков исследуемых и стандартных образцов. Также применяли детектор матрицы диодов, с помощью которого сравнивали УФ-спектры исследуемых пиков с УФ-спектрами стандартных образцов в области 200 – 400 нм.

Величина разрешения пиков (R_s) как в хроматограммах исследуемых экстрактов, так и в хроматограммах стандартных образцов превышала величину 2,0 и была более высокой, чем рекомендуемая. Количественное определение проводили с применением

Таблица 1

Содержание флавоноидов в спиртовых экстрактах травы десмодиума канадского, мкг/г, $\bar{X} \pm S_x$

№	Название действующих веществ	50 % раствор этилового спирта	70 % раствор этилового спирта	90 % раствор этилового спирта
1	Вицинин-2	1691,47 ± 93,81	1793,83 ± 71,48	982,77 ± 97,24
2	Ориентин и гомоориентин	6377,78 ± 302,19	6489,76 ± 309,06	4206,84 ± 296,71
3	Витексина рамнозид	89,05 ± 6,71	100,75 ± 12,86	66,64 ± 9,28
4	Витексин	1537,65 ± 70,54	1564,86 ± 75,24	1038,67 ± 107,31
5	Изовитексин	1315,41 ± 93,71	1324,92 ± 85,75	913,69 ± 45,86
6	Рутин	662,30 ± 34,82	848,09 ± 70,1	773,02 ± 92,06
7	Гиперозид	64,52 ± 6,17	73,28 ± 3,69	41,15 ± 2,44
8	Апигенин-7-О-гликозид	160,06 ± 20,15	135,76 ± 7,27	138,31 ± 6,85
9	Астрагалин	54,43 ± 15,93	66,31 ± 19,15	47,68 ± 8,85
10	Кверцитрин	10,05 ± 0,63	21,38 ± 2,78	10,99 ± 2,41
11	Лютеолин	6,69 ± 0,73	10,01 ± 1,04	5,04 ± 1,67
12	Кверцетин	23,13 ± 2,94	31,46 ± 5,02	22,82 ± 4,59
13	Апигенин	7,98 ± 1,62	21,82 ± 2,54	9,17 ± 2,13
14	Кемферол	21,55 ± 2,59	28,07 ± 4,45	11,66 ± 0,96
15	Сумма флавоноидов	11121,07	12511,30	8268,45

Примечание: $\bar{X} \pm S_x$ — средний результат ± стандартное отклонение среднего результата.

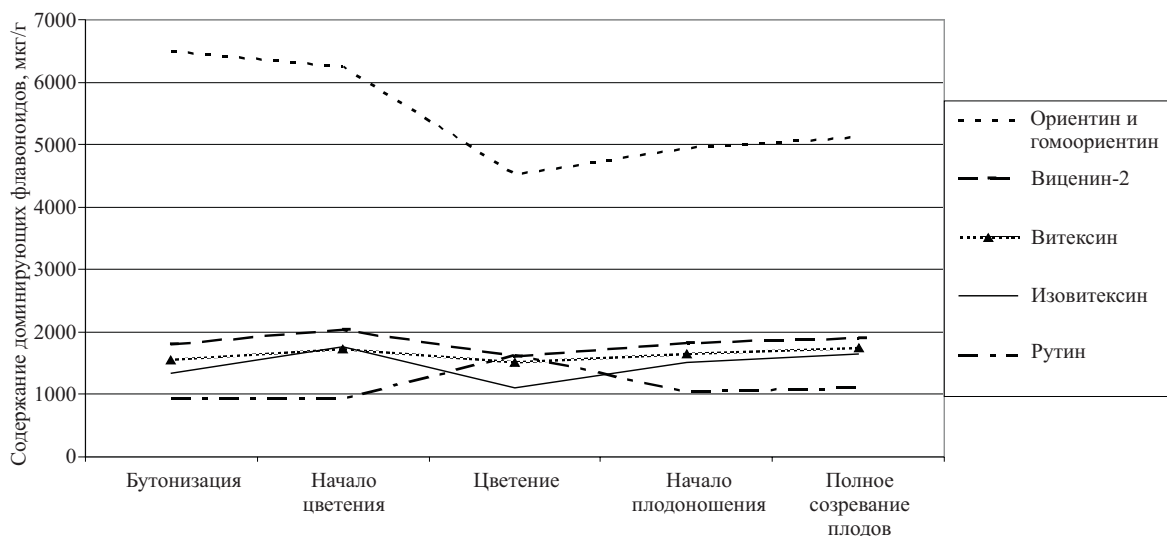


Рис. 2. Динамика накопления доминирующих флавоноидов в траве десмодиума канадского в различные фазы вегетации

наружного стандарта, используя калибровочные графики, которые получали из данных анализов разведенных стандартных растворов. Установленные коэффициенты регрессии калибровочных кривых (R^2) идентифицированных пиков были более 0,99 [19].

Статистическая обработка полученных данных. Полученные данные статистически обрабатывали, используя компьютерную программу — пакет статистики SPSS 11 (SPSS Inc., Чикаго, США).

Результаты и их обсуждение

Для разработки оптимальных условий экстракции флавоноидов из травы десмодиума канадского использовали 50, 70 и 90 % этиловый спирт. Экстракции подвергалась трава, собранная в фазе бутонизации. Коли-

чественное содержание флавоноидов в экстракте определяли методом ВЭЖХ (см. рис. 1).

Результаты анализа качественного и количественного содержания флавоноидов в спиртовых экстрактах травы представлены в табл. 1.

Исходя из полученных данных, для экстракции флавоноидов из травы десмодиума канадского в дальнейшем использовали 70 % этиловый спирт.

Для определения оптимальной продолжительности экстракции измельченное сырье экстрагировали в течение 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 и 7 ч и сумму флавоноидов, пересчитанную на гликозид лютеолина изоориентин, определяли спектрофотометрическим методом [17]. Извлеченное количество суммы

Таблица 2

Динамика накопления флавоноидов в траве десмодиума канадского в разные фазы вегетации

№	Название флавоноидов	Содержание флавоноидов, мкг/г, $\bar{X} \pm S_x$				
		фаза бутонизации	фаза начала цветения	фаза цветения	фаза начала плодоношения	фаза полного созревания плодов
1	Ориентин и гомоориентин	6493,8 ± 309,1	6236,2 ± 477,2	4524,5 ± 95,4	4944,9 ± 528,3	5126,2 ± 512,1
2	Виценин-2	1803,9 ± 21,5	2040,3 ± 123,1	1607,3 ± 38,1	1824,3 ± 180,5	1904,8 ± 141,4
3	Витексин	1544,9 ± 75,2	1717,1 ± 125,6	1513,0 ± 65,2	1646,2 ± 29,4	1751,5 ± 189,7
4	Изовитексин	1334,9 ± 85,8	1767,8 ± 165,1	1111,7 ± 38,7	1507,9 ± 166,1	1655,6 ± 195,0
5	Рутин	938,1 ± 70,1	925,7 ± 74,4	1629,9 ± 42,7	1041,8 ± 221,8	1102,7 ± 115,3
6	Апигенин-7-О-гликозид	195,8 ± 7,3	311,7 ± 35,3	658,5 ± 9,9	193,1 ± 40,4	45,2 ± 4,2
7	Витексина рамнозид	99,8 ± 8,9	65,2 ± 8,0	122,5 ± 27,2	187,6 ± 16,1	402,3 ± 59,4
8	Астрагалин	65,3 ± 9,2	238,0 ± 27,0	887,5 ± 21,4	125,7 ± 11,8	93,6 ± 10,0
9	Гиперозид	73,3 ± 3,7	112,8 ± 15,9	313,4 ± 28,3	82,4 ± 11,3	162,4 ± 84,1
10	Кверцетин	34,5 ± 5,0	34,0 ± 4,4	57,4 ± 7,4	24,4 ± 5,6	21,4 ± 4,4
11	Кверцитрин	21,4 ± 7,8	43,9 ± 5,4	45,3 ± 4,5	34,8 ± 4,9	14,2 ± 1,5
12	Кемферол	28,9 ± 4,5	37,8 ± 2,7	89,9 ± 6,6	25,4 ± 3,0	10,9 ± 1,1
13	Апигенин	21,8 ± 2,5	28,9 ± 2,8	9,2 ± 1,3	12,7 ± 2,0	6,9 ± 0,2
14	Лютеолин	10,0 ± 1,0	14,5 ± 1,4	15,2 ± 2,2	15,6 ± 1,8	3,5 ± 0,3
15	Сумма флавоноидов	12666,76	13573,83	12585,16	11666,76	12301,2

Примечание: $\bar{X} \pm S_x$ средний результат ± стандартное отклонение среднего результата.

флавоноидов из 1 г травы зависит от продолжительности экстрагирования:

Время экстрагирования, ч	Содержание извлеченного количества суммы флавоноидов из 1 г травы десмодиума канадского, мг
1	6,91
1,5	7,12
2	7,29
2,5	7,41
3	7,55
3,5	7,88
4	7,91
4,5	8,09
5	8,31
5,5	8,96
6	8,96
6,5	8,69
7	8,56

Исходя из полученных данных, оптимальной продолжительностью экстракции флавоноидов из травы оказалась шестичасовая экстракция.

Динамика накопления флавоноидов в траве десмодиума канадского в различные фазы вегетации представлена в табл. 2.

Из представленных результатов анализа видно, что оптимальным временем заготовки лекарственного сырья травы десмодиума канадского является фаза начала цветения растения, поскольку накапливаются наибольшие количества — 1,36 % идентифицированных флавоноидов, то есть в 1,07 раз больше, чем в фазе бутонизации; в 1,08 раз больше, чем в фазе цветения, и в 1,15 раз больше, чем в фазе начала плодоношения травы.

Динамика накопления доминирующих флавоноидов в траве десмодиума канадского в различные фазы вегетации представлена на рис. 2.

Среди идентифицированных 15 флавоноидов в траве доминируют ориентин и гомоориентин, виценин-2, витексин, изовитексин и рутин. Так, в фазе начала цветения растения, ориентин и гомоориентин составляет 45,94 % от общего количества идентифицированных флавоноидов: виценин-2 — 15,03 %, витексин — 12,65 %, изовитексин — 13,02 %, рутин — 6,88 %, в то время когда апигенин составляет 0,21 %, а лютеолин — 0,11 %.

Таким образом, в результате исследований установлено, что наибольшее количество флавоноидов извлекается 70 % (V/V) этиловым спиртом в течение 6 ч. Заготовку лекарственного сырья — травы десмодиума

канадского рекомендуется проводить в фазе начала цветения растения, когда накапливается наибольшее количество флавоноидов (до 1,36 %).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Захаров, Н. Н. Яхно, *Рус. мед. журн.*, **9**(15), 645 – 649 (2001).
2. T. Ahlenstiel, G. Burkhardt, H. Kohler, *Kidney Int.*, **63**(2), 554 – 563 (2003).
3. F. V. DeFeudis, K. Drieu, *Cur. Drug Targets*, **1**(1), 25 – 58 (2000).
4. V. Janulis, R. Bernatoniene, *7th Lithuanian Symposium on Arts and Sciences, Medicina, Farmacija ir klinikinė farmakologija (Медицина, фармация и клиническая фармакология)*, Kaunas (1992), pp. 18 – 20.
5. V. Janulis, P. Malinauskas, R. Bernatoniene, *7th Lithuanian Symposium on Arts and Sciences, Medicina, Farmacija ir klinikinė farmakologija (Медицина, фармация и клиническая фармакология)*, Kaunas (1992), pp. 16 – 17.
6. Н. С. Батюк, Е. А. Васильченко, Л. Н. Васильева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **27**(1), 63 – 67 (1987).
7. В. П. Янулис, *Desmodium canadense D. C. — новый растительный источник получения противовирусных и гипотензивных препаратов*, Каунас (1993).
8. V. Jurkštienė, G. Šimonienė, L. Mačiulytė, et al., *Study and use of Echinacea: inter. Sci. Conf.*, Poltava (1998), pp. 146 – 149.
9. L. N. Timofeyeva, G. Sadykov, *Intern. J. Immunorehabilitation*, № 12, 84 (1999).
10. A. J. Kondrotas, V. L. Stankaitis, V. Janulis and V. Briedis, *XVI Eur. Congress of Allergology and Clinical Immunology*, Madrid (1995), pp. 977 – 981.
11. Г. Шимонене, Б. Тарутене, *Иммунология, аллергология и инфектология*, № 1, 81 – 82 (1999).
12. G. Šimonienė, V. Janulis, A. Kondrotas, *Int. J. Immunorehabilitation*, № 12, Supplement, 65 (1999).
13. V. Janulis, *7th Lithuanian Symposium on Arts and Sciences, Medicina, Farmacija ir klinikinė farmakologija (Медицина, фармация и клиническая фармакология)*, Kaunas (1992), pp. 20 – 22.
14. Л. Н. Шантанова, А. Г. Мондодаев, Т. Т. Бадашкева и др., *Растит. ресурсы*, **28**(2), 69 – 73 (1992).
15. Л. Н. Шантанова, А. Г. Мондодаев, Т. Т. Бадашкева и др., *Растит. ресурсы*, **29**(1), 49 – 52 (1993).
16. G. Šimonienė, A. Kondrotas, V. Jurkštienė, et al., *Int. J. Immunorehabilitation*, **3**(1), 17 (2001).
17. A. Lukošius, *Antivirusinių γ-pirono darinų akių lašų vaistinių formų sukūrimas (Создание новых глазных капель противовирусного действия на основе производных γ-пирона)*, Kaunas (1997).
18. *European Pharmacopoeia, 6th. ed. Council of Europe*, Strasbourg; Cedex, France (2007), p. 16.
19. V. Jakštas, *Summary of doctoral dissertation Biomedical sciences, pharmacognosy (09 B)*, Kaunas (2005).

Поступила 28.07.08

QUANTITATIVE HPLC ESTIMATION OF FLAVONOIDS IN SHOWY TICK TREFOIL HERBS

G. Puodziunene¹, V. Janulis¹, L. Ivanauskas¹, Z. Barsteigene¹, V. Ribokaite², and O. Ragazinskene³

¹ Kaunas University of Medicine, Kaunas, Lithuania;

² “Herbaria” Drugstore, Kaunas, Lithuania;

³ Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania

Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in showy tick trefoil (*Desmodium canadense* L., *Fabaceae* family) herbs collected in various phases of vegetation at the Department of Medicinal Herbs of the Kaunas Botanical Garden (Vytautas Magnus University) was performed using HPLC techniques. A total of fifteen flavonoids of the aglicone and glycoside nature were identified, including apigenin, apigenin-7-O-glycoside, luteolin, rutin, vicenin-2, vitexin, isovitexin, vitexin rhamnoside, orientin, homoorientin, quercitrin, quercetin, hyperoside, astragaloside, and kaempferol. The maximum amount of identified flavonoids (13573.83 mg/g) was observed at the budding stage. Among these flavonoids, orientin and homoorientin (6236.24 mg/g), vicenin-2 (2040.25 mg/g), vitexin (1717.12 mg/g), isovitexin (1767.82 mg/g) and rutin (925.72 mg/g) predominated.

Key words: showy tick trefoil herbs, flavonoids, vegetative organs, reproductive organs, vegetative phases.