

О. И. Попова, А. С. Никитина, О. М. Маркова

ИЗУЧЕНИЕ ИРИДОИДОВ ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО, КУЛЬТИВИРУЕМОГО В УСЛОВИЯХ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.), семейство яснотковые, – травянистое однолетнее растение высотой до 80 см. Трава змееголовника молдавского содержит эфирное масло, флавоноиды, иридоиды, дубильные вещества, оксикоричные и карбоновые кислоты. Для изучения качественного состава иридоидных гликозидов использовали водные и спиртовые извлечения травы змееголовника молдавского. Хроматографирование проводили на пластинках “Сорбфил” в различных системах растворителей. Идентифицировали соединения по люминисцентно-хроматографической характеристике пятен на хроматограммах и значениям R_f . Установлено, что в извлечениях присутствуют от 4 до 6 соединений иридоидной природы, из которых пятна со значениями R_f 0,43 и 0,89 идентифицированы соответственно как гарпагид и гарпагида ацетат. Для оценки количественного содержания иридоидных гликозидов использован метод спектрофотометрии, основанный на определении продуктов гидроксамовой реакции. В качестве стандартного вещества выбран гарпагида ацетат. Относительная ошибка определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,8\%$. Исследования показали, что наиболее оптимальными условиями при определении содержания иридоидов являются: размер частиц не более 1 мм, экстракция сырья 70% спиртом этиловым в соотношении 1:40 в течение 1 ч на кипящей водяной бане. Установлено содержание иридоидов в траве змееголовника молдавского, заготовленной в фазу бутонизации (0,11 – 0,27%), в фазу массового цветения (0,18 – 0,51%), в фазу плодоношения (0,04 – 0,30%), наибольшее содержание иридоидов (0,51%) в траве змееголовника молдавского наблюдается в фазу массового цветения.

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.), семейство яснотковые, — травянистое однолетнее растение высотой до 80 см. Растет в Китае, Монголии, а также в Гималаях, где поднимается на высоту до 2700 – 3100 м над уровнем моря; в европейской части России, в Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке, Украине, в Средней Азии и Белоруссии. В южной и средней полосах России и ряде других стран культивируется как эфирномасличное и медоносное растение [1]. Согласно данным литературы и собственным исследованиям, трава змееголовника молдавского содержит терпеноиды — эфирное масло (0,01 – 0,3 %) с запахом мелиссы, основной составной частью которого являются изомер цитрала — нераль (от 1 до 63 %) и гераниол (от 16,5 до 51,0 %), флавоноиды, иридоиды, дубильные вещества, оксикоричные и карбоновые кислоты [2, 3]. Водные и спиртовые из-

влечения из сырья обладают многообразным фармакологическим действием: успокаивающим, болеутоляющим, способны возбуждать аппетит, усиливать деятельность пищеварительных органов. Доказана нейротропная активность настоя (1:10) травы змееголовника молдавского, что позволяет использовать его в составе чаёв, сборов и напитков седативного и снотворного действия [4].

Учитывая тот факт, что синтез терпеноидов, компонентов эфирного масла, в растениях связан с накоплением предшественников в синтетической цепочке иридоидов [5], целью наших исследований явилось изучение иридоидов змееголовника молдавского, культивируемого в условиях Ставропольского края. Сырьём служила воздушно-сухая измельченная трава змееголовника молдавского, заготовленная в разные фазы ве-

Данные ТСХ-анализа фракции иридоидов травы змееголовника молдавского

Т а б л и ц а 1

Экстрагент	Значения R_f на ТСХ-хроматограмме. Система хлороформ – этанол (20:1)						Число зон абсорбции на хроматограмме
	0,22***	—	0,57**	0,71***	0,89*	—	
Вода	0,22***	—	0,57**	0,71***	0,89*	—	4
40 % этанол	0,23**	0,44**	0,56**	0,72**	0,87*	0,93***	6
50 % этанол	—	0,45**	0,54**	0,73**	0,82***	0,95***	5
70 % этанол	0,25**	0,43***	0,53**	0,69**	0,89***	0,95***	6
90 % этанол	0,25*	0,42*	0,58**	0,74**	0,88*	0,96***	6

Примечания: “—” — отсутствие пятна на хроматограммах. * — значения R_f слабых и очень бледных пятен на хроматограммах; ** — значения R_f пятен, характеризующихся средней интенсивностью окраски; *** — значения R_f доминирующих пятен на хроматограммах.

гетации: бутонизации, массового цветения, плодоношения.

Изучение качественного состава иридоидных гликозидов проводили в водных и спиртовых извлечениях травы змееголовника молдавского. В качестве экстрагентов для получения извлечений использовали воду и спирт этиловый различной концентрации (40, 50, 70 и 90 %). Установлено, что в ряду вода — 90 % спирт этиловый оптимальным экстрагентом для извлечения иридоидов змееголовника молдавского является 70 % спирт этиловый. Хроматографирование проводили на пластинках “Сорбфил” в системах растворителей: хлороформ-этанол (20:1), хлороформ – этанол – вода (80:2:1), *n*-бутанол – кислота уксусная – вода (4:1:2), хлороформ – метанол – вода (80:2:0,1). Идентификацию соединений проводили по люминисцентно-хроматографической характеристике пятен на хроматограммах и значениями R_f . Хроматограммы проявляли следующими реактивами: Шталя (раствор *n*-диметиламинобензальдегида в смеси воды очищенной, уксусной и фосфорной кислот), Бэкона-Эдельмана (раствор 0,5 г бензидина в смеси 20 мл трихлоруксусной кислоты и 80 мл спирта этилового 95 %) с последующим нагреванием при 80 °С в течение 5 мин; раствором анисового альдегида (раствор анисового альдегида 0,5 мл в смеси 8 мл спирта этилового 95 % и 0,5 мл кислоты серной концентрированной), 2 % спиртовым раствором флороглюцина с последующим опрыскиванием кислотой хлористоводородной концентрированной; 2 М водным раствором кислоты серной; парами йода [5]. Иридоиды при этом проявлялись в виде пятен с розовой и сиреневой окраской, постепенно переходящей в синюю. Оптимальной по эффективности разделения признана система хлороформ – этанол (20:1). Очистку спиртовых извлечений осуществляли фильтрованием через колонку (20 × 1) с алюминия оксидом (IV степени активности). Сопоставление качественного состава иридоидов, выделяемых из травы змеего-

ловника молдавского различными растворителями, представлено в табл. 1.

Установлено, что в извлечениях присутствуют от 4 до 6 соединений иридоидной природы, из которых пятна со значениями R_f около 0,40 ± 0,05 соответствуют гарпагиду, зоны с R_f около 0,85 ± 0,05 идентифицируют как гарпагида ацетат [6, 7]. Наибольшее число ярко выраженных пятен на тонкослойной хроматограмме (6) обнаружено в извлечении, полученном с использованием 70 % спирта этилового, по интенсивности окраски доминируют пятна соединений с R_f 0,43, 0,89, 0,95. Извлечения, полученные с помощью других экстрагентов, характеризуются наличием 4 – 6 пятен. Интересно отметить, что в водном извлечении преобладают пятна с R_f 0,22 и 0,71. В извлечении, полученном 50 % спиртом этиловым по сравнению со всеми остальными извлечениями, доминируют пятна соединений с R_f 0,82 и 0,95. В извлечении, полученном 90 % спиртом этиловым, все пятна очень бледные, так как присутствуют только следы соединений.

Иридоиды — группа нелетучих соединений, представляющих собой циклические монотерпены с циклопентановым кольцом, имеющих в своей структуре сложноэфирную группировку. Иридоидные гликозиды относятся к числу достаточно гидрофильных соединений. В присутствии гидроксилamina в щелочной среде сложные эфиры расщепляются с образованием гидроксамовых кислот, которые при взаимодействии с хлоридом железа(III) имеют максимум поглощения при длине волны 512 нм. Данная реакция не является специфичной для иридоидов, так как она характерна также и для других биологически активных веществ (БАВ), содержащих сложноэфирную группу. Протекание гидроксамовой реакции зависит от многих факторов, в частности от: pH извлечения, присутствия сопутствующих веществ, температуры и др. Образование гидроксамовых кислот протекает практически полностью за 10 – 15 мин при pH > 11, при pH < 9 кислоты не образуются. В зависимости от соотношения

Таблица 2

Результаты определения содержания иридоидов в траве змееголовника молдавского в разные фазы вегетации

Условия экстрагирования		Содержание суммы иридоидов, %		
		Фазы вегетации растения		
		бутонизации	массового цветения	плодоношения
Степень измельченности сырья, мм	1,0	0,27	0,51	0,30
	2,0	0,25	0,36	0,25
	5,0	0,18	0,23	0,16
	7,0	0,11	0,18	0,09
Концентрация спирта этилового	40 %	0,15 – 0,27	0,32 – 0,36	0,04 – 0,24
	50 %	0,11 – 0,25	0,18 – 0,31	0,16 – 0,30
	70 %	0,16 – 0,22	0,36 – 0,51	0,14 – 0,25
	90 %	0,13 – 0,18	0,23 – 0,26	0,09 – 0,12
Соотношение сырьё – экстрагент	1:20	0,15	0,31	0,14
	1:40	0,22	0,55	0,25
Время извлечения, мин	45 + 15	0,19	0,47	0,17
	30 + 30	0,24	0,43	0,13

Таблица 3
Метрологические характеристики методики количественного определения иридоидов в траве змееголовника молдавского

f	\bar{X}	$S_{\bar{x}}$	$P, \%$	$T(p, f)$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{E}, \%$
6	0,320	0,0037	95	2,45	$\pm 0,009$	$\pm 2,80$

количества железа(III), гидроксамовой кислоты и pH раствора могут получаться продукты с различной окраской: красно-бурой ($\lambda = 435 - 440$ нм), вишнево-красной ($\lambda = 470 - 495$ нм) и красно-фиолетовой ($\lambda = 510 - 540$ нм) [6, 8, 9].

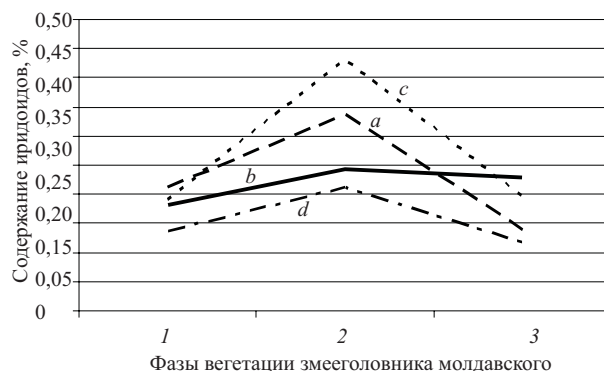
В ходе предварительного эксперимента изучены следующие факторы: степень измельченности сырья, выбор экстрагента, режим экстракции сырья (время экспозиции, соотношение сырьё — экстрагент), аналитическая длина волны, разведение (табл. 2). Расчет содержания иридоидов проводили в пересчете на гарпагида ацетат по значению удельного показателя поглощения гарпагида ацетата ($E_{1\text{см}}^{1\%} 56,03$) [8].

Методика количественного определения иридоидов в сырье змееголовника молдавского

Около 2,0 г (точная навеска) измельченной травы змееголовника молдавского, проходящей через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл спирта этилового 70 %, взбалтывали и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и фильтровали извлечение через ватный тампон в мерную колбу вместимостью 100 мл. К шроту прибавляли 40 мл спирта этилового 70 % и нагревали на водяной бане в течение 15 мин. Охлаждали и фильтровали извлечение в ту же мерную колбу. Доводили объем раствора до метки спиртом этиловым 70 %. Затем 10 мл фильтрата упаривали до 5 мл. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки водой, фильтровали через стеклянную колонку диаметром 1 см с 3 г алюминия оксида для хроматографии IV степени активности. Элюат собирали в мерную колбу вместимостью 10 мл, колонку промывали водой до достижения объема мерной колбы (до 10 мл). Полноту элюирования иридоидных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии.

1 мл элюата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл щелочного раствора гидроксилamina гидрохлорида и выдерживали в течение 5 мин. Затем прибавляли 5 мл 1 % раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной, доводили до метки 1 М раствором кислоты хлороводородной, перемешивали.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 512 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь, приготовленную в мерной колбе вместимостью 25 мл, для чего к 5 мл воды прибавляли 5 мл щелочно-



Содержание суммы иридоидов в траве змееголовника молдавского в различные фазы вегетации: 1 — фаза бутонизации, 2 — фаза массового цветения, 3 — фаза плодоношения; a — раствор 40 % этанольного извлечения, b — раствор 50 % этанольного извлечения, c — раствор 70 % этанольного извлечения, d — раствор 90 % этанольного извлечения

го раствора гидроксилamina, 5 мл 1 % раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты, доводили до метки 1 М раствором кислоты хлороводородной.

Содержание суммы сложных эфиров (иридоидов и других БАВ, содержащих сложноэфирную группу) в сырье в пересчете на гарпагида ацетат ($X, \text{г}$) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения стандартного образца гарпагида ацетата, равный 56,03; a — навеска сырья, г; W — влажность сырья, %.

Результаты количественного определения иридоидов в траве змееголовника молдавского представлены в табл. 2.

Для определения воспроизводимости методики количественного определения иридоидов проанализированы образцы травы змееголовника молдавского и проведена статистическая обработка результатов (табл. 3). Относительная ошибка определения с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 2,8 \%$.

Исследования показали, что наибольший выход иридоидов достигается при размере частиц не более 1 мм и экстракции сырья 70 % спиртом этиловым в соотношении 1:40 в течение 1 ч на кипящей водяной бане.

С помощью данной методики проанализирован 21 образец травы змееголовника молдавского, установлено содержание иридоидов в траве змееголовника молдавского, заготовленной в фазу бутонизации (0,11 – 0,27 %), в фазу массового цветения (0,18 – 0,51 %), в фазу плодоношения (0,04 – 0,30 %). Эксперименты показали, что наибольшее содержание иридоидов (0,51 %) в траве змееголовника молдавского наблюдается в фазу массового цветения (рисунок).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Л. Буданцев, А. Л. Шаварда, *Раст. ресурсы*, № 4, 550 – 561 (1986).
2. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Scrophulariaceae-Plantaginaceae*, Наука, Ленинград (1990).
3. О. И. Попова, А. С. Никитина, *Сборник науч. трудов 60-й конференции “Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции”*, Пятигорск (2005), сс. 49 – 50.
4. Р. И. Китаева, М. С. Евтеева, В. П. Попова, *Тез. докл. I республиканской конференции по мед. ботанике*, Киев (1984), сс. 153 – 154.
5. В. А. Мнацаканян, *Иридоидные гликозиды*, Изд-во АН Арм. ССР, Ереван (1986), сс. 45 – 48.
6. О. М. Хишова, Л. Н. Дунец, Н. А. Алексеев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **38**(2), 37 – 40 (2004).
7. А. Н. Шиков, В. Г. Макаров, В. Е. Рыженков, *Растительные масла и масляные экстракты: технология, стандартизация, свойства*, Русский врач, Москва (2004), сс. 167 – 174.
8. Л. В. Федосеева, Д. М. Попов, *Фармация*, № 4, 18 – 21 (1997).
9. Н. В. Шаменкова, *Фармация*, № 5, 15 – 19 (2005).

Поступила 15.05.06

QUANTITATIVE DETERMINATION OF IRIDOIDS IN *DRACOCEPHALUM MOLDAVICA* CULTIVATED IN STAVROPOL REGION

O. I. Popova, A. S. Nikitina, and O. M. Markova

Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Russia

The above-ground part of *Dracocephalum moldavica* L. (DM) grown in Stavropol region contains a large number of biologically active substances, including iridoid glycosides, tannins, hydroxycynamic and carboxylic acids, and essential oil. It is established by TLC that DM extracts contain 4 – 6 iridoids, and the fractions with $R_f = 0.43$ and 0.89 are identified with harpagide and harpagide acetate. Optimum conditions for the isolation of iridoids from DM are determined, according to which the initial material is crushed to particles with dimensions below 1 mm and extracted with 70% ethanol in a 1 : 40 ratio for 1 h on a boiling water bath. A method for the quantitative determination of iridoids based on their hydroxamic reaction followed by photocolometric quantitative detection with reference to harpagide acetate is proposed. The relative error of determination is 2.8% at a confidence probability of 95%. The content of iridoids in DM leaves is 0.11 – 0.27% in the stage of budding, 0.18 – 0.51% (maximum) in the stage of blooming, and 0.04 – 0.30% in the stage of fruiting.