

СОСТАВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СЫРЬЕВОЙ ЧАСТИ
LEONURUS QUINQUELOBATUS GILIB. ИЗ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ
Ю. В. Загурская, В. Г. Васильев, А. Л. Богатырев, И. И. Баяндина

PHENOLIC COMPOUNDS COMPOSITION OF LEONURUS QUINQUELOBATUS GILIB.
HERB FROM DIFFERENT REGIONS OF WESTERN SIBERIA
Yu. V. Zagurskaya, V. G. Vasiliev, A. L. Bogatyrev, I. I. Bayandina

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №10-04-98011-р_сибирь_а).

Для выяснения влияния антропогенного загрязнения на качество сырья пустырника проведено изучение состава основных фенольных соединений (флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и их производных) и их соотношения в траве *Leonurus quinquelobatus* Gilib. из Кемеровской области, регионов с менее развитой химической и угледобывающей промышленностью (Новосибирская и Омская область) и экологически чистых территорий (Горный Алтай) в 2011 году. Разработана методика предварительной отчистки и анализа методом ВЭЖХ-МС этанольных экстрактов (70 %) из травы *L. quinquelobatus*. Пропускали через патрон, заполненный обращено-фазовым сорбентом (Диапак С16), наилучшее извлечение флавоноидов и фенолкарбоновых кислот обеспечивает метанол. Для разделения использовали элюент: 2 % муравьиная кислота-метанол в режиме ступенчатого элюирования – сочетание изократического и градиентного режимов. В образцах обнаружено 9 основных компонентов фенольной природы, из них 5 компонентов являются флавоноидами или их производными: хлорогеновая кислота, эфир кофейной и яблочной кислот, тетрозодипентозид кофеилхинной кислоты, тетрозопентозид кофеилхинной кислоты, рутин, гексозокумароиллютеолин, изомеры квинквелозида, метиловый эфир апигенина. По составу соединений растения из различных регионов Западной Сибири не различались. Высокое содержание рутина и хлорогеновой кислоты в лекарственных препаратах *L. quinquelobatus* не свидетельствует о хорошем качестве анализируемого сырья, так как количество этих веществ может возрастать при повреждении растений болезнями и вредителями. Сравнение качества образцов *L. quinquelobatus* предпочтительнее осуществлять по производным апигенина (в том числе квинквелозиду).

The main phenol compounds composition (flavonoids, phenolcarboxylic acids and its derivatives) and their ratio in *Leonurus quinquelobatus* Gilib. herb from Kemerovo region, regions with less developed chemical and coal-mining industries (Novosibirsk and Omsk regions) and environmentally friendly areas (Altai Republic) were studied in 2011 for developing the influence of anthropogenic pollution on the quality of raw motherwort. The primary purification method and analysis by HPLC-MS of the *L. quinquelobatus* herb alcoholic extracts (70 %) was developed. Passed through a patron filled with phase reversed sorbent (Diapak C16), methanol furnished the best extract of flavonoids and hydroxycinnamic acids. An eluent was used for separation: 2 % formic acid-methanol in the stepwise elution mode (isocratic and gradient modes combination). The 9 main phenolic compounds were found in the samples, 5 of them are flavonoids and their derivatives (chlorogenic acid, ether caffeic and malic acid, tetrosopentozide chlorogenic acid, tetrosodipentozide chlorogenic acid, rutin, hexosokumarouilluteolin, quinquelozide isomers, methyl apigenin ether). A compound composition of the plants from different regions of Western Siberia was not different. The high content of rutin and chlorogenic acids in *L. quinquelobatus* medications did not demonstrate the high quality of the analysed raw material because the amount of these compounds can increase if the plants are damaged by diseases and blasts. Comparison of the quality of the *L. quinquelobatus* samples should better be carried out by apigenin derivatives (including quinquelozide).

Ключевые слова: *Leonurus quinquelobatus* Gilib., пустырник пятилопастной, ВЭЖХ-МС, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, фенольные соединения.

Keywords: *Leonurus quinquelobatus* Gilib., motherwort, HPLS-MS, flavonoids, phenolcarboxylic acids, phenolic compounds.

Известно, что в состав биологически активных веществ *Leonurus quinquelobatus* Gilib. (пустырника пятилопастного) и *L. cardiaca* L. (пустырника сердечного) входят флавоноиды (рутин, квинквелозид), дубильные вещества, сапонины. Антиаритмическое и кардиотоническое действие этих видов пустырника обусловлено наличием фенольных соединений, в частности флавоноиды обладают кардиотоническим и седативным действием (в 2 – 3 раза сильнее, чем у настойки валерианы) и включены в Российскую Фармакопею XI издания [3; 12; 15]. Траву пустырника применяют в качестве

лекарственного средства при вегето-сосудистой дистонии, гипертонической болезни (ранние стадии), повышенной возбудимости. Как наружное средство настойку пустырника используют с целью заживления ожогов, отморожений и ран [1; 6].

Сведений о составе и содержании фенольных соединений для видов рода *Leonurus* L. в литературе мало. В растениях видов рода *Leonurus* были обнаружены 8-гидроксифлавоны 7-аллозилглюкозид и р-кумароилглюкозид [17 – 18]. В траве *L. cardiaca* показано наличие в растениях этого вида кверцетина, рутина,

гиперозида, эпикатехина, процианидина В2 [11; 14]. В Китае методами колоночной хроматографии из растений *L. heterophyllus* Sweet. выделены кверцетин-3-О-[3-4-гидрокси-3,5-диметоксибензил-альфа-L-рамнопиранозил]-бета-D-галактопиранозид, кверцетин-3-О-рабинозид, рутин, изокверцитрин, гиперозид, кверцетин, апигенин, генкванин; установлено, что флавоноиды этого растения обладают антиоксидантной, антибактериальной, противораковой активностью [8; 10]. В растениях *L. glaucescens* Bunge обнаружены фенилпропаноиды: леонуризин А и В, β -(3,4-дигидроксифенил)-этил-О- α -L-арабинопиранозил-(1 \rightarrow 2)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 3)-4-О-ферулоил- β -D-глюкопиранозид, β -(3-гидрокси, 4-метоксифенил)-этил-О- α -L-арабинопиранозил-(1 \rightarrow 2)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 3)-4-О-ферулоил- β -D-глюкопиранозид, лавандулифолиозид и вербаскозид [9]. Из травы *L. japonicus* выделен генкванин 4'-глюкозид [4]. В образцах *L. persicus* Boiss. выявлены фенолы: леукоцептозид А, эвгенил- β -рутинозид, кемпферол-3-О-глюкозид, доказана антибактериальная активность этих соединений [16]. В растениях *L. cardiaca* найдены гидроксикоричные кислоты: феруловая и кофейная [7; 13; 19]. Существуют методики определения содержания флавоноидов: спектрофотометрическая в траве *L. cardiaca* и фотоколориметрическая в траве *L. glaucescens* в пересчете на рутин [5]. Т. Т. Зиэп и Е. В. Жоховой на основании спектроскопических данных разработана методика количественного определения флавоноидов в траве *L. japonicus* Hoult. и *L. quinquelobatus* методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин ($\lambda = 410$ нм) и цинарозид ($\lambda = 400$ нм) соответственно [3 – 4].

Таким образом, на данный момент фенольные соединения вида *Leonurus quinquelobatus* изучены недостаточно, методики определения состава фенольных веществ ВЭЖХ-МС в растениях этого вида нет.

Цель работы: выяснить влияние промышленного загрязнения на состав и соотношение фенольных соединений (флавоноидов и гидроксикоричных кислот и их производных) в растениях *Leonurus quinquelobatus*.

Для этого поставлены следующие задачи:

1) подобрать методику анализа фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах из травы *L. quinquelobatus* методом ВЭЖХ-МС;

2) выяснить состав фенольных соединений в растениях *L. quinquelobatus*, выращенных в регионах Западной Сибири с различной степенью техногенного загрязнения;

3) сравнить состав и соотношение основных компонентов фенольной природы в образцах из Кемеровской области, по сравнению с образцами из регионов с менее развитой химической и угледобывающей промышленностью (Новосибирская и Омская область) и экологически чистых территорий (Горный Алтай).

Экспериментальная часть. ВЭЖХ-МС анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 SL (с диодно-матричным детектором) и гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Bruker micrOTOFQ в декабре 2011 года.

Изучали траву (лекарственное сырье) *Leonurus quinquelobatus*, растения получены рассадным спосо-

бом из генетически однородных семян в 4 регионах Западной Сибири на территории:

1) Кузбасского ботанического сада ИЭЧ СО РАН (г. Кемерово);

2) сада Мичуринцев НГАУ (г. Новосибирск);

3) Горно-Алтайского ботанического сада (пос. Камлак);

4) Агро-биостанции ОмГПУ (г. Омск).

Сырье для анализа заготавливали в 2011 году по достижении растениями фенологического состояния, соответствующего требованиям Государственной фармакопеи (1990): в начале цветения нижних цветочных мутовок (Новосибирск – 23 июня, Кемерово – 30 июня, Камлак – 6 июля). Растения из Омска оказались поражены мучнистой росой и использованы для сравнения состава фенольных веществ с образцами здоровых растений (дата сбора 10 июля). Для приготовления средних образцов брали аликвотную массу (1 %) измельченного образца каждого растения. Полученную пробу тщательно перемешивали, отбирали около 1 г (точная навеска), трижды экстрагировали на водяной бане 70 %-ным раствором этанола (исчерпывающая экстракция), фильтровали для удаления взвеси.

Важный этап пробоподготовки при высокоэффективной жидкостной хроматографии – отделение от экстрактов хлорофиллов, которые могут удерживаться обращено-фазовым сорбентом хроматографической колонки, что приводит к различным проблемам с хроматографической системой (повышение давления, изменение времен удерживания различных веществ из-за уменьшения эффективной площади сорбента и др.). Использовали метод твердофазной экстракции. Аликвоту полученного экстракта (700 мкл) пропускали через патрон, заполненный обращено-фазовым сорбентом (Диапак С16). При пропускании через патрон хлорофиллы почти необратимо связываются с фазой. Затем патрон промывали элюентом (700 мкл) для извлечения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. В качестве элюента можно использовать ацетонитрил и этиловый спирт, но в нашем случае наиболее эффективным оказался метанол.

Полученные растворы анализировали методом ВЭЖХ-МС с обращено-фазовым режимом элюирования – колонка Zorbax SB-C18 (2,1 x 150 мм, 3,5 мкм). Колонка находилась в термостате при температуре 25⁰С. Оптимальная скорость потока растворителя для совместного использования хроматографа и масс-спектрометра для анализа растительных экстрактов – 0,2 мл/мин. Хроматограммы регистрировались на двух диапазонах длин волн: 340 ± 50 нм – основной диапазон поглощения интересующих нас соединений (флавоноидов и фенолкарбоновых кислот) и 650 ± 50 нм, в котором поглощают различные хлорофиллы, этот диапазон использовался для контроля количества хлорофиллов после очистки экстрактов твердофазной экстракцией. Оптимальный вводимый объем пробы раствора составил 5 мкл.

Для разделения использовали элюент: 2 % муравьиная кислота-метанол в режиме ступенчатого элюирования – сочетание изократического и градиентного режимов.

Экспериментально установили, что оптимальное разделение для экстрактов *L. quinquelobatus* достига-

ется при следующем элюировании: первые пять минут 10 % метанола в изократическом режиме, затем в течение 30 минут объемное содержание метилового спирта менялось от 10 до 100 %, а потом снова изократическое элюирование чистым метанолом в течение 10 минут, чтобы удалить хлорофиллы с фазы хроматографической колонки.

В качестве способа получения ионов в МСД использовалась ионизация электрораспылением (ESI, электроспрей). Рабочие параметры ионизации: давление газа-распылителя – 2 бара; скорость подачи газа-осушителя – 8 л/мин; температура осушителя – 240°С; напряжение на конце капилляра – ±4 кВ. Диапазон регистрации m/z: 100 – 1200; точность определения массы ±0,01 Да. МСМС-спектры получали, фрагментируя флавоноиды с m/z меньше 400 Да (т. е. агликоны флавоноидов) и фенолкарбоновые кислоты при энергии столкновений 20 эВ, а флавоноиды с m/z больше 400 Да (т. е. гликозиды флавоноидов) – при 40 эВ.

Были записаны хроматограммы и масс-спектры экстрактов и раствора, содержащего смесь стандартов хлорогеновой кислоты, рутина, кверцитрина, кверцетина, апигенина и лютеолина. При помощи полученных масс-спектров были определены молекулярные

массы основных фенольных соединений в экстрактах. Масс-детектирование велось в режиме как положительных, так и отрицательных ионов.

Вышеописанным методом изучен состав фенольных соединений *L. quinquelobatus* из четырех модельных регионов.

Результаты и их обсуждение. После сравнения полученных данных для всех экстрактов и смеси стандартов в составе экстрактов удалось идентифицировать только два вещества – хлорогеновую кислоту и рутин, остальные пики хроматограммы экстракта пришлось идентифицировать по полученным УФ- и масс-спектрам. Всего обнаружено 9 основных компонентов – 4 производных гидроксикоричных кислот и 5 веществ, относящихся к классу флавоноидов: кофеилхинная (хлорогеновая) кислота ($t_R = 16.9$ мин), эфир кофейной и яблочной кислот ($t_R = 20.8$ мин), тетрозодипентозид кофеилхинной кислоты ($t_R = 22.5$ мин), тетрозопентозид кофеилхинной кислоты ($t_R = 22.8$ мин), 3-О-рутинозид кверцетина (рутин) ($t_R = 24.2$ мин), гексозокумароиллютеолин ($t_R = 25.7$ мин), изомеры гексозокумароилапигенина (квинквелозида) (пики с $t_R = 28.6$ и 29.7 мин), метиловый эфир апигенина ($t_R = 33.3$ мин) (рис. 1).

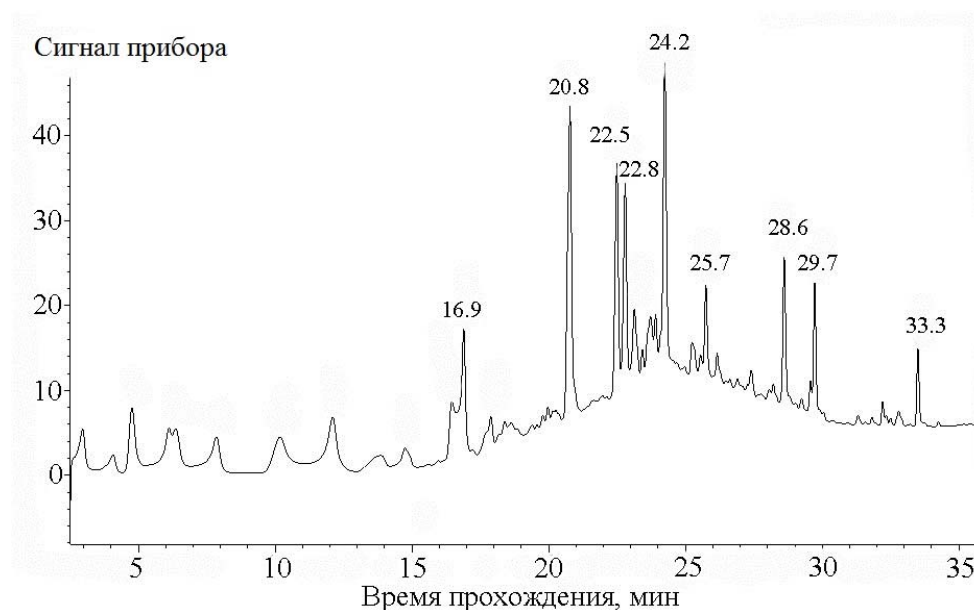


Рис. 1. Схема ВЭЖХ-хроматограммы водно-этанольного экстракта из травы *L. quinquelobatus* (время прохождения основных фенольных соединений)

образцы из различных регионов и поврежденные мучнистой росой по составу флавоноидов и гидроксикоричных кислот не различались, но показали различия в соотношении компонентов. Минимальное количество рутина и производных хлорогеновой кислоты обнаружено в образцах сырья из Новосибирска, где растения обладают наибольшими размерами [2]. Известно, что фенольные соединения, в частности хлорогеновая кислота, являются одним из эффективных антиоксидантов и участвуют в регуляции ростовых процессов растения. Суммарное содержание компонентов фенольной природы также минимально в

образцах из Новосибирска, кемеровские и алтайские растения различались по данному показателю несущественно (таблица 1).

Среди здоровых растений наиболее заметные отличия в относительном содержании всех флавоноидных компонентов (особенно квинквелозида и рутина) демонстрирует образец с Алтая. В растениях из Новосибирской и Кемеровской областей содержание рутина уступает алтайским образцам почти в 2 раза. Прямых зависимостей между экологическими факторами и суммарным содержанием фенольных веществ в пустырнике выявлено не было, что может быть связано с

высокой адаптивной способностью растений пустырника к широкому спектру условий: вид обычно харак-

теризуется R-стратегией и способен очень быстро захватывать свободные ресурсы.

Таблица 1

Соотношение основных фенольных компонентов в сырьевой части *L. quinquelobatus* из различных регионов Западной Сибири (в пересчете на минимальную площадь пика)

<i>Соединение / Образец</i>	<i>Камлак (ГА)</i>	<i>Новосибирск</i>	<i>Кемерово</i>	<i>Омск*</i>
Рутин	2,6	1,0	1,6	6,3
Гексозокумароиллютеолин	1,5	1,0	1,4	3,6
Гексозокумароилапигенин (изомеры квинквелозида)	4,2	2,9	3,0	1,0
Метилловый эфир апигенина	2,4	2,5	2,1	1,0
Хлорогеновая кислота и её производные	1,6	1,0	1,6	3,4
Эфир кофейной и яблочной кислот	1,5	1,7	1,6	1,0
Сумма	1,6	1,0	1,5	3,1

Примечания: * – растения поражены мучнистой росой.

В образцах, поврежденных мучнистой росой, обнаружено большее (в 2 и более раз) количество рутина, гексозокумароиллютеолина и производных хлорогеновой кислоты по сравнению с максимальным содержанием в здоровых растениях, а количество изомеров квинквелозида и производного апигенина в этих растениях было достоверно меньше. Содержание производных апигенина в поврежденных растениях было существенно ниже, по сравнению со здоровыми.

Таким образом, с помощью разработанной нами методики анализа водно-этанольных экстрактов из травы *Leonurus quinquelobatus* в образцах, выращен-

ных в 4 регионах Западной Сибири, идентифицировано 9 фенольных соединений. По составу соединений растения из различных регионов не различались. Высокое содержание рутина и хлорогеновой кислоты в лекарственных препаратах *L. quinquelobatus* не всегда свидетельствует о хорошем качестве анализируемого сырья, так как количество этих веществ может возрастать при повреждении растений болезнями и вредителями. Сравнение качества образцов *L. quinquelobatus* предпочтительнее осуществлять по производным апигенина (в том числе по квинквелозиду).

Литература

1. Государственная фармакопея СССР: 11-е издание. М.: Медицина, 1990. 400 с.
2. Загурская Ю. В., Баяндина И. И., Сиromля Т. И., Сысо А. И., Дымина Е. В., Вронская О. О., Казанцева Л. М. Качество сырья лекарственных растений при выращивании в антропогенно нарушенных регионах Западной Сибири на примере *Nuregicum perforatum* L. и *Leonurus quinquelobatus* Gilib. // Химия растит. сырья, 2013. № 4. С. 141 – 150.
3. Зиэп Т. Т. Н. Фармакогностическое изучение травы *Leonurus japonicus* Houtt.: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: Санкт-Петербургская гос. хим.-фарм. акад., 2008. 16 с.
4. Зиэп Т. Т. Н., Жохова Е. В. Разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве пустырника спектрофотометрическим методом // Химия растит. сырья. 2007. № 4. С. 73 – 77.
5. Попов Д. М., Пашинская Е. В., Коваленко Л. И. Контроль качества сырья препаратов пустырника спектрофотометрическим методом // Фармация. 1992. № 4. С. 27 – 31.
6. Пронченко Г. Е. Лекарственные растительные средства: справочник / под ред. А. П. Арзамасцева, И. А. Самылиной. М: ГЭОТАР МЕД, 2002. 288 с.
7. Bernatoniene R., Bernatoniene J., Ramanauskiene K. The analysis of tincture for improvement of blood circulation // Medicina (Kaunas). 2004. V. 40. I. 8. P. 758 – 761.
8. Cong Y., Guo J., Wang T., Li M., Li K., Wang J., Li Q. Chemical constituents and antitumor activity on leukemia K562 cell of *Leonurus heterophyllus* // Zhongguo Zhong Yao ZaZhi. 2009. V. 34. I. 14. P. 1816 – 1818.
9. Cong Y., Wang J. H., Li X. A new flavonoid from *Leonurus heterophyllus* // J. Asian Nat. Prod. Res., 2005. V. 3. I. 7. P. 273 – 277.
10. Çaliş İ., Ersöz T., Taşdemir D., Rüedi P. Two phenylpropanoid glycosides from *Leonurus glaucescens* // Phytochemistry, 1992. V. 31. I. 1. P. 357 – 359.
11. Dusková J., Dusek J. *Leonurus cardiaca* in vitro // Ceska Slov Farm. 2004. V. 53. I. 1. P. 39 – 41.
12. Hayashi Y. Studies on the ingredients of *Leonurus sibiricus* L. // Yakugakuzasshi. 1962. V. 82. I. 7. P. 1020 – 1023.
13. Luo Y., Luo S., Zhou B. Chromatographic identification of a compound similar to ferulic acid in the decoction of Herb Leonuri // Zhong Yao Cai. 2002. V. 25. I. 10. P. 713 – 714.
14. Masteiková R., Muselík J., Bernatoniene J., Majiene D., Savickas A., Malinauskas F., Bernatoniene R., Peciura R., Chalupová Z., Dvoráčková K. Antioxidant activity of tinctures prepared from hawthorn fruits and motherwort herb // Ceska Slov Farm., 2008. V. 57. I.1. P. 35 – 38.

15. Ritter M., Melichar K., Strahler S., Kuchta K., Schulte J., Sartiani L., Cerbai E., Mugelli A., Mohr F. W., Rauwald H. W., Dhein S. Cardiac and Electrophysiological Effects of Primary and Refined Extracts from *Leonurus cardiaca* L. (Ph.Eur.) // *Planta Med.* 2010. V. 76. I. 6. P. 572 – 582.

16. Tasdemir D., Scapozza L., Zerbe O., Linden A., Calis I., Sticher O. Iridoid glycosides of *Leonurus persicus* // *J Nat Prod.* 1999. V. 62. I. 6. P. 811 – 816.

17. Tomás-Barberán F. A., Gil M. I., Ferreres F., Tomás-Lorente F. Flavonoid p-coumaroylglucosides and 8-hydroxyflavone allosylglucosides in some labiatae // *Phytochemistry.* 1992. V. 31. I. 9. P. 3097 – 3102.

18. Tomás-Barberán F. A., Krestovskaya T., Gil M. I. Flavonoid p-coumaroylglucosides in some *Leonurus*, *Chaiturus* and *Panzerina* species (Lamiaceae) // *Biochemical Systematics and Ecology.* 1993. V. 21. I. 4. P. 531 – 532.

19. Tschesche R., Diederich A., Jha H. C. Caffeic acid 4-rutinoside from *Leonurus cardiaca* // *Phytochemistry.* 19, 12, 2783 (1980).

Информация об авторах:

Загурская Юлия Васильевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник Института экологии человека Сибирского отделения Российской академии наук (ИЭЧ СО РАН), syji@mail.ru.

Yulia V. Zagurskaya – Candidate of Biology, Research Associate at the Institute of Human Ecology of the Siberian Branch of the RAS.

Васильев Владимир Геннадьевич – кандидат химических наук, научный сотрудник, Новосибирского института органической химии Сибирского отделения Российской академии наук им. Н. Н. Ворожцова (НИОХ СО РАН), vgvasil@nioch.nsc.ru.

Vladimir G. Vasiliev – Candidate of Chemistry; Research Associate at N. N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the RAS.

Богатырев Алексей Леонидович – студент Новосибирского национального исследовательского государственного университета, lexa.analitik@gmail.com.

Aleksey L. Bogatyrev – student at National Research Novosibirsk State University.

Баяндина Ирина Ивановна – кандидат биологических наук, доцент Новосибирского государственного аграрного университета, bayandina@ngs.ru.

Irina I. Bayandina – Candidate of Biology, Assistant Professor at Novosibirsk State Agrarian University.

Статья поступила в редколлегию 30.10.2014 г.