

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СУХОГО ЭКСТРАКТА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ СБОРА ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ТРАВЫ И ЛОПУХА БОЛЬШОГО ЛИСТА

Л.М. Федосеева, Ю.И. Чистова

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 656038 Барнаул, пр-т Ленина, 40

Контакты: Юлия Игоревна Чистова juls.chistova@mail.ru

Цель исследования — изучение фенольных соединений сухого экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа.

Материалы и методы. Разделение и идентификацию фенольных соединений изучаемого экстракта проводили методами тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

Результаты. В результате исследований установлено, что оптимальной для разделения фенольных соединений методом тонкослойной хроматографии является система этилацетат — кислота муравьиная — вода (10:2:3). На хроматограмме обнаруживаются 4 зоны адсорбции, по положению и флуоресценции в ультрафиолетовом свете соответствующие флавоноидам группы флавона и фенолоксидам (хлорогеновая и кофейная кислоты). Для дальнейшей идентификации фенольных соединений использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В ходе работы обнаружено 8 пиков, которые по временам удерживания и спектральным характеристикам соответствуют фенологликозидам, хлорогеновой кислоте, производным кофейной кислоты, феруловой кислоты, умбеллиферона.

Заключение. Установлено, что экстракт сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухой содержит гидроксикоричные кислоты и их производные, соединения кумариновой природы, фенологликозиды.

Ключевые слова: фенольные соединения, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракт сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухой

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-73-77

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF DRY EXTRACT OF DANDELION HERB AND LARGE BURDOCK LEAF TEA

L. M. Fedoseeva, Yu. I. Chistova

Altai State Medical University of the Ministry of Health of Russia; 40 Prospekt Lenina, Barnaul 656038, Russia

The purpose of this work is to study of phenolic compounds in the dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea.

Materials and methods. The separation and identification of phenolic compounds of dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography with UV-detection has been carried out.

Results. As a result of research, it has been established that during TLC the optimal system for the separation of phenolic compounds is the ethyl acetate — formic acid — water system (10:2:3). On the chromatogram four spots were found corresponding to the value of R_f and fluorescence in UV-light to flavonoids of the flavone group and phenolic acids (chlorogenic and caffeic acids). For further identification of phenolic compounds using HPLC, eight peaks were found, which in terms of retention time and spectral characteristics correspond to phenoglycosides, chlorogenic acid, caffeic acid derivatives, ferulic acid, umbelliferone.

Conclusions. Thus, the dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea contains hydroxycinnamic acids and their derivatives, compounds of coumarin nature, phenoglycosides.

Key words: phenolic compounds, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea

Введение

Нами разработана технология получения экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и ло-

пуха большого листа сухого методом ремацерации. Экстрагент — вода очищенная, соотношение «сырье: экстрагент» — 1:10. Одним из этапов исследования

лекарственных препаратов из растительного сырья является изучение качественного состава основных групп биологически активных веществ. В ходе проведенных химических реакций установлено наличие флавоноидов групп флавона и флавонола, гидролизующихся и конденсированных дубильных веществ, полисахаридов [1]. При изучении специфической активности экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого доказан его диуретический эффект, что можно объяснить входящими в состав соединениями фенольной природы [2]. Однако одним из недостатков сухих экстрактов является высокая гигроскопичность, вследствие чего ухудшается их сыпучесть, снижается качество. По этой причине мы планируем разработать лекарственную форму с экстрактом сбора сухим в виде твердых капсул.

Цель исследования — изучение фенольных соединений в экстракте сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухом физико-химическими методами.

Материалы и методы

Объект исследования — экстракт сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухой.

Для разделения и идентификации фенольных соединений экстракта использовали методы тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В ходе исследования 0,2 г экстракта растворяли в 5,0 мл 70 % этилового спирта, затем фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента, ООО «Бавер»), по 5 мкл фильтрата наносили на хроматографические пластинки Sorbfil (силикагель, ПТСХ-УФ). Хроматографическое исследование проводили с использованием 6 систем растворителей: н-бутанол—кислота уксусная ледяная—вода (4:1:1 и 4:1:2), этилацетат—кислота уксусная ледяная—вода (7:1:2), этилацетат—кислота муравьиная—вода (10:2:3), этилацетат—кислота муравьиная—кислота уксусная ледяная—вода (100:11:11:26), хлороформ—спирт этиловый 96 %—вода (26:16:3) [3–7].

В качестве стандартных образцов использовали 0,1 % спиртовые растворы рутина (каталожный номер R5143), лютеолина (L9283), кверцетина (Q4951), кверцитрина (83388), нарингенина (N5893), ориентина (O9765), хлорогеновой кислоты (C3878), кофейной кислоты (C0625), феруловой кислоты (PHR1791), π -кумаровой кислоты (C9008), приобретенных в компании ООО «Сигма-Алдрич Рус». После хроматографирования пластинки высушивали при комнатной температуре на воздухе до исчезновения запаха растворителей и просматривали в дневном и ультрафиолетовом свете до и после обработки хромогенными

реактивами (1 % спиртовой раствор алюминия (III) хлорида, пары аммиака).

Фиксировали изменения окраски зон адсорбции в исследуемых пробах и сравнивали их окраску и положение (величину R_f) с соответствующими зонами адсорбции в пробах стандартных образцов. Определение проводили в 5 повторностях.

Последующее разделение и идентификацию фенольных соединений спиртового раствора экстракта проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЭкоНова, Россия) с ультрафиолетовым детектором. Условия хроматографирования: колонка ProntoSIL 120–5-C18 AQ, 2,0 × 75 мм. Элюент А — раствор трифторуксусной кислоты водный 0,01 %, элюент Б — 100 % ацетонитрил. Скорость подачи элюента — 100 мкл/мин, объем пробы — 2 мкл, температура колонки — 35 °C; градиент 5–55 % элюента Б за 30 мин. Детектирование осуществляли при длинах волн 220, 254, 268, 300, 324, 330 и 360 нм. Соединения идентифицировали по временам удерживания (τ , мин) и спектральным характеристикам (λ_{\max} , нм), сравнивая их с аналогичными характеристиками стандартных образцов и данными литературы [8, 9].

Результаты и обсуждение

В ходе предварительных исследований установили, что для разделения фенольных соединений методом тонкослойной хроматографии оптимальной системой растворителей является этилацетат — кислота муравьиная — вода (10:2:3).

В результате исследования на хроматограмме обнаружены 4 пятна с желтой и голубой флуоресценцией, что характерно для флавоноидов группы флавона и фенолокислот. По значению R_f и цвету зон адсорбции до и после обработки хромогенными реактивами в дневном и ультрафиолетовом свете идентифицированы кофейная ($R_f = 0,66$) и хлорогеновая ($R_f = 0,81$) кислоты (табл. 1).

Для дальнейшей идентификации фенольных соединений использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В результате эксперимента на хроматограмме спиртового раствора экстракта зарегистрировано 8 пиков. В процессе исследования снимали электронные спектры поглощения индивидуальных веществ, соответствующих пикам на хроматограмме. Идентификацию индивидуальных веществ проводили по временам удерживания (τ , мин) и спектральным характеристикам (λ_{\max} , нм) в сравнении с аналогичными характеристиками стандартных образцов или данными литературы [8, 9].

Установлено, что спиртовой раствор экстракта содержит хлорогеновую кислоту, фенологликозиды, производные кофейной и феруловой кислоты,

Таблица 1. Результаты тонкослойной хроматографии экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого в системе растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3)

Table 1. Results of thin-layer chromatography of common dandelion and dried greater burdock extracts in the system of solvents ethyl acetate – formic acid – water (10:2:3)

Исследуемый образец Studied sample	Rf	УФ-свет UV light	Окрашивание после детектирования Staining after detection				Идентифицированное соединение Identified compound
			AlCl3 раствор спиртовой 1 % 1 % alcohol solution of AlCl3		Аммиака пары Ammonia fumes		
			Видимый свет Visible light	УФ-свет UV light	Видимый свет Visible light	УФ-свет UV light	
Экстракт сбора: Extract: пятно 1 blot 1	0,55 ± 0,03	Желтое Yellow	Желтое Yellow	Желто-зеленое Greenish yellow	Желто-коричневое Brownish yellow	Серое Grey	Флавоноид группы флавона Flavone type flavonoid
пятно 2 blot 2	0,66 ± 0,02	Голубое Blue	—	Серо-зеленое Greyish green	—	Голубое Blue	Кофейная кислота Caffeic acid
пятно 3 blot 3	0,72 ± 0,03	Желтое Yellow	Желтое Yellow	Желто-зеленое Greenish yellow	Желтое Yellow	Серое Grey	Флавоноид группы флавона Flavone type flavonoid
пятно 4 blot 4	0,81 ± 0,02	Голубое Blue	—	Серо-зеленое Greyish green	Желто-зеленое Greenish yellow	Голубое Blue	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid

Примечание. УФ – ультрафиолетовый.

Note. UV – ultraviolet.

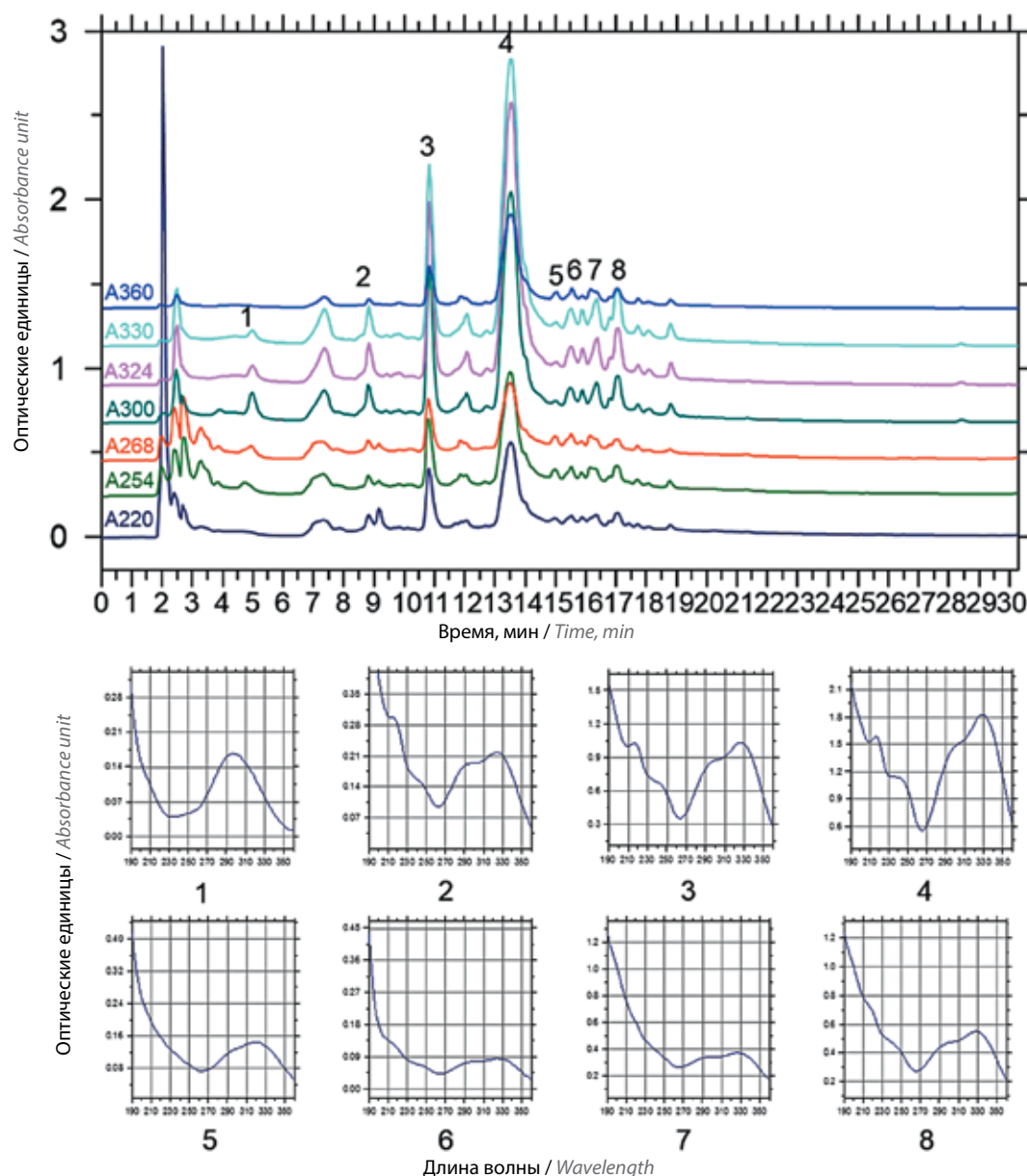
Таблица 2. Результаты идентификации фенольных соединений спиртового раствора экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Table 2. Results of identification of phenolic compounds in alcohol solution of common dandelion and dried greater burdock extracts using high-performance liquid chromatography

№ пика, п/п Peak No.	Время удерживания, мин Retention time, min	Максимум поглощения, нм Maximum absorption, nm	Идентифицированное соединение Identified compound
1	4,9	300	Фенологликозид Phenolic glycoside
2	8,7	216, 230 пл.,* 290 пл., 324 216, 230 sh*, 290 sh, 324	Производное феруловой кислоты Derivative of ferulic acid
3	10,6	218, 235 пл., 297 пл., 330 218, 235 sh, 297 sh, 330	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid
4	13,4	218, 230 пл., 295 пл., 329 218, 230 sh, 295 sh, 329	Производное кофейной кислоты Derivative of caffeic acid
5	14,8	320	Фенологликозид Phenolic glycoside
6	15,3	209 пл.; 229 пл., 292, 325 209 sh; 229 sh, 292, 325	Производное умбеллиферона Derivative of umbelliferone
7	16,1	290, 328	
8	16,9	212, 230 пл., 290, 330 212, 230 sh, 290, 330	Производное кофейной кислоты Derivative of caffeic acid
Стандартные образцы Standard samples			
1	10,6	218, 235 пл., 297 пл., 330 218, 235 sh, 297 sh, 330	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid
2	12,0	217, 242, 298 пл., 328 217, 242, 298 sh, 328	Кофейная кислота Caffeic acid
3	15,0	218, 234, 293 пл., 323 218, 234, 293 sh, 323	Феруловая кислота Ferulic acid

*Пл. – плечо.

*Sh – shoulder.



Хроматограмма и спектры индивидуальных веществ спиртового раствора экстракта сбора травы одуванчика лекарственного и листа лопуха большого сухого: 1 – фенологликозид; 2 – производное феруловой кислоты; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – производное кофейной кислоты; 5 – фенологликозид; 6 – производное умбеллиферона; 7 – производное умбеллиферона; 8 – производное кофейной кислоты

Chromatogram and spectra of individual compounds of alcohol solutions of common dandelion and dried greater burdock: 1 – phenolic glycoside; 2 – derivative of ferulic acid; 3 – chlorogenic acid; 4 – derivative of caffeic acid; 5 – phenolic glycoside; 6 – derivative of umbelliferone; 7 – derivative of umbelliferone; 8 – derivative of caffeic acid

умбеллиферона. Результаты представлены в табл. 2 и на рисунке.

Таким образом, в результате высокоэффективной жидкостной хроматографии удалось идентифицировать гидроксикоричные кислоты и их производные, соединения кумариновой природы, фенологликозиды.

Заключение

Для разделения и идентификации фенольных соединений экстракта сбора методом тонкослойной

хроматографии использовали систему растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3). Применение данной системы позволяет обнаружить 4 зоны адсорбции с желтой и голубой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете со значениями $R_f = 0,55$, $0,72$ и $R_f = 0,66$, $0,81$ соответственно. Желтая флуоресценция характерна для флавоноидов группы флавона. Пятна с голубой флуоресценцией идентифицированы как кофейная и хлорогеновая кислоты. В результате идентификации

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в спиртовом растворе экстракта сбора обнаружены хлорогеновая кислота, производные феруловой и кофейной кислот, умбеллиферона

и фенологликозиды. Полученные результаты будут использоваться для стандартизации экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чистова Ю.И., Федосеева Л.М. Качественный анализ экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого. Молодежь – Барнаул: материалы XVII–XIX городской научно-практической конференции молодых ученых. Барнаул, 2018. С. 899–901. [Chistova Yu.I., Fedoseeva L.M. Qualitative analysis of the dry extract of dandelion herb and large burdock leaf specie. Youth – Barnaul: materials of XVII–XIX municipal scientific-practical conference of young scientists. Barnaul, 2018. P. 899–901. (In Russ.)].
2. Чистова Ю.И., Федосеева Л.М. Изучение диуретической активности экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа. SCIENTIST 2018;1(1):69–72. [Chistova Yu.I., Fedoseeva L.M. the study of the diuretic activity of the extract of dandelion herb and large burdock leaf specie. SCIENTIST 2018;1(1):69–72. (In Russ.)].
3. Галияхметова Э.Х., Кудашкина Н.В., Чуйкин С.В., Егорова Е.Г. Использование денситометрии в качественном анализе флавоноидов листьев лимонника китайского. Медицинский вестник Башкортостана 2016;5(65):70–3. [Galiakhmetova E.H., Kudashkina N.V., Chujkin S.V., Egorova E.G. the use of densitometry in the qualitative analysis of flavonoids of schisandrachinensis leaves. Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal 2016;5(65):70–3. (In Russ.)].
4. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Платонов И.А., Павлова Л.В. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной. Химия растительного сырья 2015;1:95–100. DOI: 10.14258/jcprm.201501410. [Kurkin V.A., Ryzanova T.K., Platonov I.A., Pavlova L.V. Quantitative determination of arbutin in the leaves of arctostaphylosuva-ursi (L.) spreng. Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material 2015;1:95–100. (In Russ.)].
5. Латыпова Г.М. Вопросы стандартизации листьев первоцвета весеннего. Вестник Оренбургского государственного университета 2009;6:195–7. [Latypova G.M. Issues of standardization of primrose leaves. Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University 2009;6:195–7. (In Russ.)].
6. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Сорокина О.Н. и др. Тонкослойная хроматография флавоноидов на силикагеле в модифицированных мицеллярных подвижных фазах на основе додецилсульфата натрия. Сорбционные и хроматографические процессы 2014;14(1):52–64. [Sumina E.G., Shtykov S.N., Sorokina O.N. et al. TLC on silicagelin flavonoids modified micellar mobile phases based on sodium dodecylsulfate. Sorbtionnyye i khromatograficheskiye protsessy = Sorption and chromatographic processes 2014;14(1):52–64. (In Russ.)].
7. Шаталова Т.А., Вдовенко-Мартынова Н.Н., Айрапетова А.Ю. и др. Разработка технологии и анализа косметического крема на основе травы мелиссы лекарственной. Современные проблемы науки и образования 2015;4. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=20993>. [Shatalova T.A., Vdovenko-Martynova N.N., Ajrapetova A.Yu. et al. Development of technology and the analysis of cosmetic cream on the basis of the grass of melissa officinalis. Modern problems of science and education 2015;4. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=20993>. (In Russ.)].
8. Wagner H., Bauer R., Melchart D. et al. Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines. New-York: Springer, 2011. 1012 p.
9. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. the Systematic Identification of Flavonoids. New-York: Springer, 1970. 354 p.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.И. Чистова/Yu.I. Chistova: <https://orcid.org/0000-0003-1923-8097>

Вклад авторов

Л.М. Федосеева: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;

Ю.И. Чистова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи.

Author's contributions

L.M. Fedoseeva: developing the research design, analysis of the obtained data;

Yu.I. Chistova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing, reviewing of publications of the article's theme.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 13.02.2019. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 13.02.2019. Accepted for publication: 12.04.2019.