

УДК 582.734: 615.322

СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХИНОВ В ЛИСТЬЯХ И КОРНЯХ *COMARUM SALESOVIANUM* И *COMARUM PALUSTRE* (ROSACEAE)*

© Т.А. Кукушкина, В.А. Костикова**, Е.П. Храмова

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская,
101, Новосибирск, 630090, Россия, serebryakova-va@yandex.ru

Поиск дополнительных источников катехинов среди местной флоры является актуальным на сегодняшний день. Цель настоящего исследования – изучение состава и содержания катехинов в листьях и корнях растений рода *Comarum* L. флоры Азиатской России с помощью спектрофотометрического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Проведена валидация методики определения содержания катехинов спектрофотометрическим методом в листьях полукустарника сабельника Залесова (*Comarum salesovianum* (Steph.) Asch. et Graebn.) из семейства Rosaceae Juss. Исследовано содержание катехинов в пересчете на (±)-катехин в листьях и корневищах двух видов рода *Comarum* – *C. salesovianum* и *C. palustre* L. (сабельник болотный). Наибольшее содержание катехинов выявлено в корнях *C. palustre* (4%) и листьях *C. salesovianum* (2.58%). Предложена методика определения состава и содержания индивидуальных катехинов в листьях и корневищах двух представителей рода *Comarum* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В листьях и корнях обнаружено 3 катехина: (±)-катехин, галлат эпигаллокатехина и (-)-эпикатехин. Из катехинов в листьях и корнях *C. palustre* и *C. salesovianum* преобладают (±)-катехин и (-)-эпикатехин. Содержание галлат эпигаллокатехина не превышает 0.1 мг/г. Концентрация (±)-катехина самая высокая в корнях *C. palustre* (1.21 мг/г), а (-)-эпикатехина – в листьях *C. salesovianum* (1.35 мг/г).

Ключевые слова: *Comarum*, катехины, спектрофотометрия, ВЭЖХ, валидация.

Для цитирования: Кукушкина Т.А., Костикова В.А., Храмова Е.П. Содержание катехинов в листьях и корнях *Comarum salesovianum* и *Comarum palustre* (Rosaceae) // Химия растительного сырья. 2024. №2. С. 196–206. DOI: 10.14258/jcpr.20240212561.

Введение

Катехины или флаван-3-олы, являются наиболее восстановленными представителями класса флавоноидов. В молекуле катехинов имеются два асимметричных атома углерода в пирановом кольце (C₂ и C₃), в связи с чем для каждой молекулы возможны 4 изомера и 2 рацемата. Характерная особенность катехинов – способность присоединять остаток галловой кислоты с образованием сложных эфиров – галлатов [1]. Катехины являются общепризнанными антиоксидантами, что объясняется наличием в структуре большого количества фенольных гидроксильных групп. Из-за наличия гидроксила в галлатной группе галлат эпигаллокатехина и галлат эпикатехина являются более высокоэффективным поглотителем свободных радикалов по сравнению со многими другими стандартными антиоксидантами такими как аскорбиновая кислота, токоферол и тролокс [2, 3]. Кроме антиоксидантных свойств катехины проявляют антимикробную, противоаллергенную, противовирусную, противовоспалительную и другие активности [3–6]. Непревзойденным источником негаллированных форм катехинов, так же как и галлированных катехинов, или катехингаллатов, является растение *Camelia sinensis*, а также культуры, инициированные из него *in vitro* [1, 7–9]. Технологическая ценность зеленых листьев данного растения в содержании большого количества катехинов, поэтому оно используется как сырье для производства чая и для получения капиллярукрепляющего комплекса катехинов с Р-витаминной активностью [8]. Поиск дополнительных источников катехинов среди местной флоры является актуальным на сегодняшний день.

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcpr.20240212561s

** Автор, с которым следует вести переписку.

Сабельник болотный (*C. palustre* L., семейство Rosaceae Juss.) – полукустарничек 20–70 см высотой с длинным ползучим корневищем. Листья с 2–3 парами листочков. Темно-пурпуровые цветки собраны в немногочетковые соцветия. Плоды – орешки голые. Произрастает по болотам, болотистым лугам, заболоченным лесам, в тундрах, по берегам рек и озер. Распространен повсеместно в Европе, Кавказе, Средней Азии, Америке, Монголии, Китае, Японии и в России [10]. Согласно литературным данным, основными метаболитами надземной части сабельника болотного являются флавоноиды, простые фенолы, фенолкарбоновые кислоты, жирные кислоты, аминокислоты, стероиды, катехины, органические кислоты, кумарины, тритерпеновые сапонины, каротиноиды, моно- и полисахариды [11, 12]. Корневища с корнями сабельника болотного считаются перспективным лекарственным растительным сырьем для лечения и профилактики воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата. Преобладающей группой биологически активных веществ в подземной части сабельника болотного являются полифенольные соединения, преимущественно конденсированного ряда (катехины) [13, 14]. О.Л. Сайбель и др. [15] установлено, что УФ-спектр спиртового извлечения из корневищ с корнями сабельника болотного практически идентичен спектру (+)-катехина и имеет максимум поглощения при 279 ± 1 нм. Ранее исследователями был выделен (+)-катехин из подземных органов сабельника болотного в кристаллическом состоянии [16]. Разработана методика количественного определения суммы полифенольных соединений методом спектрофотометрии с использованием стандартного образца (+)-катехина [15]. Наибольшее содержание полифенольных соединений наблюдается в корнях и корневищах сабельника болотного в фазе конца вегетации (12.09%). В сырье сабельника, заготовленном в разных местах ареала растения, содержится различное количество полифенольных соединений. Норму по этому показателю в проекте нормативной документации авторы предлагают установить не менее 10% [15]. О.А. Ёршик и Г.Н. Бузук [17, 18] предложена методика количественного определения проантоцианидинов (полимерные флаван-3-олы, мономеры которых являются катехин и эпикатехин) в различных органах сабельника болотного спектрофотометрическим методом, основанная на кислотном гидролизе указанных соединений до антоцианидинов в присутствии катализатора (ионов Fe^{3+}) в пересчете на хлорид цианидина. Наибольшее содержание проантоцианидинов обнаружено в стеблях (4.69%) и корневищах (4.70%) [17].

Другой представитель рода *Comarum* L., произрастающий в Сибири – сабельник Залесова (*C. salesovianum* (Steph.) Asch. et Graebn.). Полукустарник 30–100 см высотой. Ветви покрыты буро-коричневой отслаивающейся корой, более молодые – беловатые, прижато-волосистые. Листья с 3–4 парами листочков, снизу часто белые от мучнистого налета. Белые с розовым оттенком цветки собраны в рыхлые малоцветковые соцветия или одиночные. Орешки длинноволосистые. Произрастает по долинам горных рек, каменистым склонам, россыпям и галечникам. Распространен в Средней и Центральной Азии и в Сибири (Горный Алтай) [10]. В листьях и цветках *C. salesovianum* обнаружено значительное количество флавонолов (до 4.7%), органические кислоты [19], фенольные липиды [20] алкилсалициловые кислоты [21], микроэлементы [22]. Выявлено, что Сабельник Залесова проявляет антифунгальную [21], антимикробную [23], противовирусную [24] и антибактериальную [20] активность. Состав и содержание катехинов растений *C. salesovianum* тщательно не изучался. Обнаружено высокое содержание катехинов в листьях данного вида – 1.76% [25].

Цель настоящего исследования – исследование состава и содержания катехинов в листьях и корнях растений *C. salesovianum* и *C. palustre* с помощью спектрофотометрического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили листья и корни *C. salesovianum* и *C. palustre*. Растительный материал собран в период массового цветения растений. *C. salesovianum* собран в Кош-Агачском районе Республики Алтай: урочище Кёк-Сайры, окр. с. Теленгит-Сортогой, сухое русло р. Кёк-Сайры, на высоте 2184 м от ур.м. (географические координаты: N 50°03'24.710", E 88°47'35.613"); полынно-сабельниковая закустаренная каменистая пойма реки, на галечнике. *C. palustre* собран в Константиновском районе Амурской области: окрестности с. Войково, на высоте 112 м от ур.м. (географические координаты: N 49°36'59.09", E 128°11'29.57").

Для определения содержания катехинов брали по 5–10 однолетних побегов с 25–30 особей. Побеги сушили в сухом помещении без доступа солнечных лучей. При валидации методики количественного содержания катехинов нами использованы листья *C. salesovianum*.

Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ «Microsoft Excel 2010».

Результаты и их обсуждение

Дифференциальная спектрофотометрия определения в видимой области света является наиболее часто используемым методом исследования количественного содержания отдельной группы веществ, например фенольных соединений [15, 26], флавоноидов [27], дубильных веществ [14], фенолоксилов [28], а также катехинов [1, 29] в растительном сырье. Для количественного определения суммы катехинов в листьях и корнях растений рода *Comarum* нами предложена валидация методики спектрофотометрического определения на приборе СФ-56 (ЛОМО, Россия). Стандартом для количественного определения послужил (\pm)-катехин фирмы Sigma ($\geq 99\%$).

Количественное содержание катехинов определяли спектрофотометрическим методом, основанном на способности катехинов давать малиновое окрашивание с раствором ванилина (4-окси-3-метоксибензальдегидом) в концентрированной соляной кислоте [1, 30]. Катализатором реакции служит соляная кислота. Оптическая плотность раствора продуктов конденсации пропорциональна исходной концентрации катехинов [31]. На основании проведенных исследований проведена валидация количественного определения катехинов в листьях *C. salesovianum*.

Около 1.0 г (точная навеска) сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2–3 мм, помещали в круглодонную колбу с притертой крышкой, объемом 100 мл. Сырье заливали 30 мл 70% этилового спирта, колбу присоединяли к обратному холодильнику и помещали на кипящую водяную баню на 30 мин. Колбу время от времени взбалтывали, чтобы смыть частицы сырья со стенок. После чего колбу с извлечением охлаждали и первую порцию экстракта фильтровали в коническую колбу с притертой крышкой объемом на 100 мл через бумажный фильтр. Далее сырье на фильтре помещали в круглодонную колбу и опять заливали 30 мл 70% спирта и экстрагировали в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Вторую порцию экстракта охлаждали и фильтровали к первой порции экстракта в колбу на 100 мл. Процедуру повторяли еще раз. Три порции экстракта перемешивали и замеряли объем полученного объединенного экстракта.

В две пробирки на 5 мл переносили по 0.8 мл водно-этанольного извлечения, в одну из них прибавляли 4.0 мл 1% раствора ванилина в концентрированной соляной кислоте. Объем обеих пробирок доводили до 5 мл концентрированной соляной кислотой. Пробирка без ванилина служила в качестве раствора сравнения. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 502 нм.

Содержание суммы катехинов в процентной концентрации (X) в пересчете на (\pm)-катехин вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times V_1 \times V_2}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times M \times V_3}$$

где D – оптическая плотность анализируемого раствора при длине волны 502 нм; V_1 – объем извлечения, мл; V_2 – объем разбавления, мл; M – масса сырья, г; V_3 – объем аликвоты, взятой на анализ, мл; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель 1% раствора катехина в кювете толщиной 1 см.

Валидацию разработанной методики количественного определения катехинов проводили по показателям: линейности, повторяемости, воспроизводимости, правильности в соответствии с руководством «Валидация аналитических методик» [32].

При проверке линейности методики были приготовлены 5 растворов (\pm)-катехина, проведена реакция с раствором ванилина в соляной кислоте, измерены их оптические плотности при длине волны 502 нм и построен график зависимости оптической плотности от концентрации катехинов (рис. в электронном приложении, табл. 1). График зависимости имеет линейный характер и описывается уравнением $y = 112.07x + 0.0471$. Коэффициент корреляции составил $R = 0.999598$, следовательно, данную методику можно использовать для анализа катехинов в растительном сырье в пересчете на (\pm)-катехин в указанном диапазоне концентраций.

Для расчета среднего $E_{1\text{см}}^{1\%}$ провели анализ линейности в течение 3 дней с раствором (\pm)-катехина (табл. 2). Раствор (\pm)-катехина готовили в день проведения реакции.

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ рассчитывали по формуле:

$$E_{1\text{см}}^{1\%} = 10 \times D / K,$$

где D – оптическая плотность анализируемого раствора при длине волны 502 нм; K – концентрация катехина, мг/мл.

Среднее $E_{1\text{см}}^{1\%}$ за три дня составило 1131.8. В дальнейших расчетах использовали данное значение $E_{1\text{см}}^{1\%}$.

Проверена зависимость показаний прибора (D) от времени прохождения реакции раствора (\pm)-катехина с ванилином в соляной кислоте (табл. 3). Для анализа брали 4 разные концентрации раствора (\pm)-катехина. Наилучшим временем замера содержания катехинов является первая минута реакции, так как максимум показания прибора зарегистрирован после 1 мин прохождения реакции. В дальнейшем показания прибора снижаются.

Для подтверждения повторяемости разработанной методики анализировали 10 экстрактов из наземной части *C. salesovianum*. Для этого получали десять независимых результатов измерений одним методом, в одной лаборатории, одним лаборантом-исследователем с использованием одного спектрофотометра в пределах короткого промежутка времени. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10% (табл. 4).

Воспроизводимость методики определяли на трех образцах сырья в 10 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Он составил 0.03% (табл. 5).

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания катехинов в пересчете на катехин в извлечениях, полученных путем добавления необходимого количества стандартного раствора (\pm)-катехина 0.16 мг/мл – 1 мл, 2 мл и 3 мл к исследуемому извлечению. Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, его средняя величина должна находиться в пределах $100\pm 5\%$. В разработанной методике процент колеблется от 96.27% до 100.38%, его среднее значение составляет 98.31% при относительной ошибке 1.16% (табл. 6).

Таблица 1. Определение линейности разработанной методики количественного определения катехинов

№ измерения	Объем аликвоты, мл	Концентрация, рассчитанная для данного измерения по графику, мг/мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)
1	0.5	0.001384	0.2056
2	2	0.005536	0.6638
3	4	0.011072	1.2656
4	6	0.016608	1.9515
5	8	0.022144	2.5084

Таблица 2. Проверка показателя $E_{1\text{см}}^{1\%}$ в течении 3 дней

День	Аналитическая повторность	E
1	1	1162.5
1	2	1136.4
1	3	1171.4
Среднее $E_{1\text{см}}^{1\%}$ за 1 день		1156.8
2	1	1125.3
2	2	1136.2
2	3	1131.2
Среднее $E_{1\text{см}}^{1\%}$ за 2 день		1130.9
3	1	1101.3
3	2	1105.7
3	3	1116.0
Среднее $E_{1\text{см}}^{1\%}$ за 3 день		1107.7
Среднее $E_{1\text{см}}^{1\%}$ за три дня		1131.8

Таблица 3. Оптическая плотность (D) в зависимости от продолжительности реакции раствора (\pm)-катехина с ванилином в соляной кислоте

Время, мин	Концентрация (\pm)-катехина, мг/мл			
	0.0174	0.0348	0.0696	0.1044
1	0.3366	0.6184	1.1934	1.7945
5	0.3246	0.6011	1.1637	1.7248
10	0.3133	0.5609	1.1052	1.6010
15	0.3024	0.5361	1.0578	1.5355
20	0.2935	0.5123	1.0227	1.4676

Катехины считаются нестабильными соединениями. В чистом виде они относительно стабильны, но легко окисляются в растворах [1]. Поэтому проверен срок хранения экстрактов для корректного анализа содержания катехинов (табл. 7). В расчет брали три биологические повторности. Исследовали содержание катехинов в сырье на 0–4, 8, 13, 16 и 20 сутки хранения экстрактов. Выявлено, что постепенно концентрация катехинов в листьях *C. salesovianum* падает. В первые сутки хранения экстракта потери в содержании катехинов составили 5%, во вторые сутки – 7%, на третьи сутки – 14%, на четвертые сутки – 19%, на восьмые сутки – 20%, на тринадцатые сутки – 31%, на шестнадцатые сутки – 36% и на двадцатые сутки – 44% по сравнению с концентрацией катехинов в сырье в день приготовления экстракта (0 сутки). Анализ содержания катехинов в растительном материале желательнее проводить в день приготовления экстракта, в крайнем случае через 1–2 дня после экстрагирования, так как концентрация катехинов значительно падает при хранении экстракта.

По разработанной методике установлено содержание катехинов в листьях и корнях *C. palustre* и *C. salesovianum* (табл. 8). Обнаружено, что в корнях *C. palustre* содержание катехинов в 16 раз выше, чем в листьях. У вида *C. salesovianum*, напротив, катехины преобладают в листьях по сравнению с корнями. Сравнительный анализ двух видов показал, что содержание катехинов в листьях *C. salesovianum* на порядок выше по сравнению с листьями *C. palustre*. При этом в корнях *C. palustre* катехинов накапливается в 2.4 раза больше, чем в корнях *C. salesovianum*.

Кроме валидации методики количественного определения суммы катехинов спектрофотометрическим методом, мы предлагаем методику качественного и количественного анализа отдельных соединений из группы катехинов в сырье растений рода *Comarum* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (табл. 9, рис.).

Для идентификации отдельных катехинов 1 мл свежеприготовленного вышеуказанным способом 70% водно-этанольного экстракта разбавляли бидистиллированной водой до 5 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (ЗАО «БиоХимМак»). Вещества смывали с патрона небольшим количеством (2 мл) 70% водно-этанольного раствора, а затем 1 мл 96% этанола. Объединенный элюат пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм.

Таблица 4. Определение повторяемости методики

№	Содержание суммы катехинов, %	Метрологические характеристики
1	2.67	$X_{cp} = 2.58$ $S^2 = 0.01$ $S = 0.09$ $S_x = 0.03$ $S_r = 0.03$ $P(\%) = 95$ $t(P, f) = 2.26$ $\Delta x_{cp} = 0.06$ $\epsilon, \% = 2.44$
2	2.62	
3	2.56	
4	2.70	
5	2.66	
6	2.47	
7	2.55	
8	2.44	
9	2.58	
10	2.50	

Таблица 5. Определение воспроизводимости методики

Повторяемость	Содержание суммы катехинов в пересчете на (\pm)-катехин в сырье <i>C. salesovianum</i> , %		
	Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	2.64	2.46	2.37
2	2.63	2.39	2.28
3	2.61	2.36	2.49
4	2.62	2.35	2.45
5	2.64	2.30	2.43
6	2.59	2.46	2.37
7	2.62	2.45	2.42
8	2.49	2.44	2.39
9	2.53	2.44	2.39
10	2.42	2.38	2.39
Среднее значение, %	2.58	2.40	2.40
Относительное стандартное отклонение (RCD, %)	0.03	0.02	0.02

Таблица 6. Определение правильности методики

№	Содержание суммы катехинов в пересчете на (\pm)-катехин, мг	Добавлено СО (\pm)-катехин, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Значение выхода, %	Статистические характеристики
1	0.726	0.160	0.886	0.868	97.97	$X_{cp} = 98.31\%$
2	0.726	0.160	0.886	0.888	100.23	$S^2 = 2.21$
3	0.726	0.160	0.886	0.867	97.86	$S = 1.49$
4	0.726	0.320	1.046	1.050	100.38	$S_x = 0.50$
5	0.726	0.320	1.046	1.039	99.33	$S_r = 0.02$
6	0.726	0.320	1.046	1.014	96.94	$P(\%) = 95$
7	0.726	0.480	1.206	1.193	98.92	$t(P, f) = 2.31$
8	0.726	0.480	1.206	1.161	96.27	$\Delta X_{cp} = 1.14$
9	0.726	0.480	1.206	1.169	96.93	$\varepsilon, \% = 1.16$

Таблица 7. Содержание катехинов в водно-этанольном экстракте из листьев *C. salesovianum* в зависимости от времени хранения экстракта

Сутки	№ экстракта (биологическая повторность)	Содержание, %
0	1	2.53 \pm 0.02
0	2	2.34 \pm 0.04
0	3	2.42 \pm 0.002
Среднее значение в день приготовления экстракта		2.43 \pm 0.06
1	1	2.37 \pm 0.03
1	2	2.25 \pm 0.00
1	3	2.29 \pm 0.02
Среднее значение после 24 ч хранения экстрактов		2.30 \pm 0.04
2	1	2.32 \pm 0.01
2	2	2.26 \pm 0.001
2	3	2.24 \pm 0.001
Среднее значение после 48 ч хранения экстрактов		2.27 \pm 0.02
3	1	2.06 \pm 0.08
3	2	2.06 \pm 0.08
3	3	2.15 \pm 0.02
Среднее значение после 72 ч хранения экстрактов		2.09 \pm 0.03
4	1	2.03 \pm 0.01
4	2	1.93 \pm 0.01
4	3	1.95 \pm 0.15
Среднее значение после 96 ч хранения экстрактов		1.97 \pm 0.03
8	1	2.02 \pm 0.03
8	2	1.92 \pm 0.01
8	3	1.97 \pm 0.02
Среднее значение после 192 ч хранения экстрактов		1.95 \pm 0.03
13	1	1.68 \pm 0.01
13	2	1.73 \pm 0.04
13	3	1.65 \pm 0.001
Среднее значение после 312 ч хранения экстрактов		1.69 \pm 0.02
16	1	1.60 \pm 0.04
16	2	1.53 \pm 0.01
16	3	1.51 \pm 0.01
Среднее значение после 384 ч хранения экстрактов		1.55 \pm 0.03
20	1	1.46 \pm 0.006
20	2	1.33 \pm 0.006
20	3	1.32 \pm 0.01
Среднее значение после 480 ч хранения экстрактов		1.37 \pm 0.5

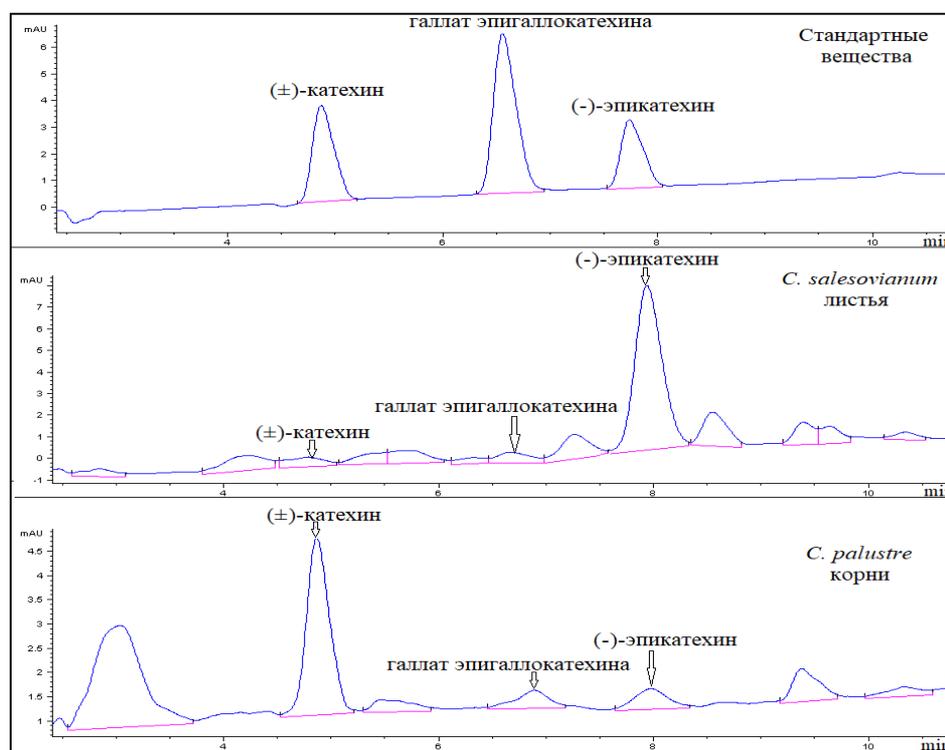
Примечание: в таблице представлены средние значения \pm ошибка среднего.

Таблица 8. Содержание катехинов в водно-этанольных экстрактах из органов видов рода *Comarum*

Вид	Орган	Содержание катехинов, %
<i>C. palustre</i>	лист	0.25±0.002
	корень	4.00±0.002
<i>C. salesovianum</i>	лист	2.58±0.03
	корень	1.66±0.002

Таблица 9. Состав и содержание катехинов в экстрактах из органов растений рода *Comarum*

Вид	Орган	Содержание фенольных соединений (мг/г воздушно-сухого сырья)		
		(±)-катехин	галлат эпигаллокатехина	(-)-эпикатехин
		$\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ нм}; t_{\text{R}} = 4.8 \text{ мин}$	$\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ нм}; t_{\text{R}} = 6.5 \text{ мин}$	$\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ нм}; t_{\text{R}} = 7.6 \text{ мин}$
<i>C. palustre</i>	лист	0.20±0.01	0.09±0.003	0.34±0.01
<i>C. palustre</i>	корень	1.21±0.05	0.09±0.003	0.18±0.01
<i>C. salesovianum</i>	лист	0.22±0.01	0.04±0.00	1.35±0.05
<i>C. salesovianum</i>	корень	0.55±0.02	0.02±0.00	0.21±0.01



Хроматограммы стандартных веществ катехинов и 70% водно-этанольных экстрактов из листьев растений *C. salesovianum* и корней *C. palustre* при 280 нм. По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – сигнал детектора, единица оптической плотности

Анализ фенольных соединений, содержащихся в элюате, проводили на аналитической ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent 1200» (США) с диодно-матричным детектором, автосамплером и системой для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. Колонка Zorbax SB-C18, 4.6×150 мм, 5 мкм. Хроматографический анализ проводили в режиме градиентного элюирования: в подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0.1%) изменялось от 22 до 100% за 36 мин. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26 °С. Объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование осуществляли при λ 254, 210, 230, 280, 315, 340 и 360 нм.

Количественное определение индивидуальных компонентов в образцах растений проводили по методу внешнего стандарта при $\lambda = 280 \text{ нм}$. Для приготовления стандартных образцов использовали (±)-катехин («Sigma»), (-)-эпикатехин («Serva») и галлат эпигаллокатехина («Teavigo»). Стандартные растворы готовили в концентрации 10 мкг/мл.

Относительное стандартное отклонение повторяемости при определении флаван-3-олов составило $\sigma_{\text{отн}} = 0.011$, относительное стандартное отклонение по времени удерживания у метода ВЭЖХ – 0.0018.

В стеблях и корнях *C. palustre* отмечены значительное содержание (+)-катехина 18.0/11.92 мг/г соответственно [33]. Кроме катехина, в подземной и надземной частях *C. palustre* обнаружены также (-)-эпигаллокатехин, (-)-эпикатехин, (+)-галлокатехин, эпигаллокатехин-3-О-галлат и L-эпигаллокатехингаллат [33–36].

В результате анализа катехинов в водно-этанольных экстрактах из листьев и корней двух видов рода *Comarum* нами выявлено, что все образцы содержат (±)-катехин, галлат эпигаллокатехина и (-)-эпикатехин (табл. 9, рис.). Из катехинов в листьях и корнях *C. palustre* и *C. salesovianum* преобладают (±)-катехин и (-)-эпикатехин. Концентрация (±)-катехина более высокая в корнях (1.21 мг/г) *C. palustre*, а (-)-эпикатехина – в листьях *C. salesovianum* (1.35 мг/г). Содержание галлат эпигаллокатехина не превышает 0.1 мг/г.

Заключение

Проведена валидация методики спектрофотометрического определения содержания катехинов в листьях *C. salesovianum*.

Анализ содержания катехинов в листьях и корнях двух видов растений рода *Comarum* показал, что корни *C. palustre* (4%) и листья *C. salesovianum* (2.58%) являются перспективным источником катехинов.

Методом ВЭЖХ в листьях и корнях представителей рода *Comarum* обнаружены 3 флаван-3-ола: (±)-катехин, галлат эпигаллокатехина и (-)-эпикатехин. По содержанию (±)-катехина выделены корни *C. palustre* (1.21 мг/г), (-)-эпикатехина – листья *C. salesovianum* (1.35 мг/г).

Дополнительная информация

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprtm.20240212561s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № АААА-А21-121011290025-2.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Запрометов М.Н. Биохимия катехинов. М., 1964. 325 с.
2. Kim E., Hwang K., Lee J., Han S.Y., Kim E.-M., Park J., Cho J.Y. Skin protective effect of epigallocatechin gallate // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19 (1). Article 173. DOI: 10.3390/ijms19010173.
3. Bae J., Kim N., Shin Y., Kim S.Y., Kim Y.J. Activity of catechins and their applications // Biomed. Dermatol. 2020. Vol. 4. Article 8. DOI: 10.1186/s41702-020-0057-8.
4. Ohmori Y., Ito M., Kishi M., Mizutani H., Katada T., Konishi H. Antiallergic constituents from oolong tea stem // Biol. Pharm. Bull. 1995. Vol. 18 (5). Pp. 683–686. DOI: 10.1248/bpb.18.683.
5. de Oliveira Caleare A., Hensel A., Mello J.C., Pinha A.B., Panizzon G.P., Lechtenberg M., Petereit F., Nakamura C.V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains // Fitoterapia. 2017. Vol. 118. Pp. 87–93. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.03.002.
6. Marques T.R., Cesar P.H.S., Braga M.A., Marcussi S., Corrêa A.D. Fruit bagasse phytochemicals from *Malpighia emarginata* rich in enzymatic inhibitor with modulatory action on hemostatic processes // J. Food Sci. 2018. Vol. 83 (11). Pp. 2840–2849. DOI: 10.1111/1750-3841.14330.
7. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. М., 1993. 272 с.
8. Isemura M. Catechin in Human Health and Disease // Molecules. 2019. Vol. 24 (3). Article 528. DOI: 10.3390/molecules24030528.
9. Зубова М.Ю., Нечаева Т.Л., Карташов А.В., Загоскина Н.В. Регуляция накопления фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения при раздельном и совместном действии света и ионов кадмия // Известия РАН. Серия биологическая. 2020. №6. С. 604–615. DOI: 10.31857/S000233292006017X.
10. Курбатский В.И. *Comarum* L. – сабельник // Флора Сибири. Новосибирск, 1988. Т. 8. С. 35–38.
11. Складневская Н.В. Фармакогностическое изучение надземной части сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), произрастающего на Северо-Западе России: дис. ... канд. фарм. наук. СПб, 2009. 163 с.
12. Стругар Й., Орлова А.А., Понкратова А.О., Уэйли А.К., Повыдыш М.Н. Выделение индивидуальных соединений из травы сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) и установление их структуры спектроскопическими

- методами // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022. Т. 11, №4. С. 177–184. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184.
13. Наумчик Г.Н. Фитохимическое исследование сабельника болотного и приготовление из него некоторых лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Л., 1964. 16 с.
 14. Чемесова И.И., Чижиков Д.В. Определение дубильных веществ в корневищах *Comarum palustre* L и настойки из него спектрофотометрическим методом // Растительные ресурсы. 2004. Т. 40, №3. С. 122–130.
 15. Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Зайко Л.Н. Разработка методики количественного определения суммы полифенольных соединений в подземных органах сабельника болотного *Comarum palustre* L. // Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация. 2008. №12. С. 16–21.
 16. Жукова О.Л., Стихии В.А., Шейченко В.И., Даргаева Т.Д. Выделение (+)-катехина из корневищ сабельника болотного *Comarum palustre* L. // Международная конференция: Лекарственное растениеводство: сборник научных трудов. М., 2006. С. 260–265.
 17. Ёршик О.А., Бузук Г.Н. Количественное определение проантоцианидинов в сабельнике болотном *Comarum palustre* L. // Вестник фармации. 2007. №4 (38). С. 10–17.
 18. Ёршик О.А., Бузук Г.Н. Спектрофотометрическое определение проантоцианидинов конденсацией с 4-(N,N-диметиламино)коричным альдегидом // Растительные ресурсы. 2015. Т. 51, №2. С. 220–228.
 19. Триль В.М. Анатомо-морфологическая структура листа *Comarum salesovianum* (Steph.) Aschers et Graebn // Наука: комплексные проблемы. 2015. №2 (6). С. 19–27.
 20. Odontuya G., Banzragchgarav O., Murata T., Batkhoo J., Sasaki K., Yoshizaki F. Antibacterially active phenolic lipid derivatives from *Comarum salesovianum* (Steph.) Aschers. et Gr. // Phytochemistry Letters. 2015. Vol. 13. Pp. 360–364. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.07.020.
 21. Букреева Т.В., Шаварда А.Л. Анакардовые кислоты на поверхности цветков и листьев *Comarum salesovianum* (Rosaceae) // Растительные ресурсы. 2017. Т. 53, №3. С. 435–442.
 22. Храмова Е.П., Чанкина О.В., Сыева С.Я., Костикова, В.А. Особенности накопления минеральных элементов кустарниками Горного Алтая // Растительный мир Азиатской России. 2019. №3(35). С. 62–69. DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2019-3(62-69)
 23. Gonchig E., Erdenebat S., Togtoo O., Bataa S., Gendaram O., Kim Y.S., Ryu S. Y. Antimicrobial activity of Mongolian medicinal plants // Natural Product Sciences. 2008. Vol. 14, no. 1. Pp. 1–5.
 24. Лобанова И.Е., Филиппова Е.И., Кукушкина Т.А., Проценко М.А., Храмова Е.П., Мазуркова Н.А., Высочина Г.И. Сравнительная оценка противовирусной активности экстрактов некоторых высших растений в отношении вируса гриппа А *in vitro* // Химия в интересах устойчивого развития. 2021. Т. 29. С. 675–682. DOI: 10.15372/KhUR2021346.
 25. Храмова Е.П., Кукушкина Т.А., Шалдаева Т.М., Сыева С.Я. Сравнительное исследование биологически активных веществ *Dasiphora fruticosa* и *Comarum salesovianum* из Горного Алтая // Химия растительного сырья. 2020. №1. С. 189–197. DOI: 10.14258/jcrpm.2020015145.
 26. Жукова О.Л., Абрамов А.А., Даргаева Т.Д., Маркарян А.А. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2006. Т. 47, №5. С. 342–345.
 27. Коновалов Д.А., Коновалова Д.С. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве пиретрума девичьего и ее валидация // Актуальные проблемы медицины. 2012. №16 (135). Вып. 19. С. 156–159.
 28. Андреева В.Ю., Калинин Г.И., Ли В.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенолокислот в надземной части зизифоры клиноподиовидной (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) // Химия растительного сырья. 2019. №3. С. 161–168. DOI: 10.14258/jcrpm.2019034683.
 29. Иванова Е.В., Лукша Е.А., Калинин Г.И., Погодин И.С. Определение катехинов и лейкоантоцианов в надземной и подземной частях *Aconogonon divaricatum* // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2016. №4 (60). С. 118–120.
 30. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins // J. Agric. Food Chem. 1998. Vol. 46, no. 10. Pp. 4267–4274. DOI: 10.1021/jf980366j.
 31. Кривенцов В.И. Методические рекомендации по анализу плодов на биохимический состав. Ялта, 1982. 21 с.
 32. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14 изд. М., 2018. Т. 4. С. 6143.
 33. Olennikov D.N. Ellagitannins and other phenolic compounds from *Comarum palustre* // Chemistry of Natural Compounds. 2016. Vol. 52, no. 4. Pp. 721–723. DOI 10.1007/s10600-016-1754-9.
 34. Чайка В.М., Соболевская К.А., Минаева В.Г. К хемосистематике рода *Potentilla* L // Известия СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1973. №2. С. 31–36.
 35. Жукова О.Л. Фитохимическое изучение сабельника болотного, сухого экстракта на его основе и их стандартизация: дис. ... канд. фарм. наук. М., 2007. 145 с.
 36. Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Olennikov D.N. Agrimoniin, an active ellagitannin from *Comarum palustre* herb with anti- α -glucosidase and antidiabetic potential in streptozotocin-induced diabetic rats // Molecules. 2017. Vol. 22(1). Article 73. DOI: 10.3390/molecules22010073.

Поступила в редакцию 14 февраля 2023 г.

После переработки 3 октября 2023 г.

Принята к публикации 9 октября 2023 г.

Kukushkina T.A., Kostikova V.A.* , Khranova E.P. CONTENT OF CATECHINS IN LEAVES AND ROOTS OF *COMARUM SALESOVIANUM* AND *COMARUM PALUSTRE* (ROSACEAE)

Central Siberian Botanical Gardens SB RAS, Zolotodolinskaya st., 101, Novosibirsk, 630090, Russia, serebryakovava@mail.ru

The search for additional sources of catechins among the local flora is relevant today. The method for determining the content of catechins by the spectrophotometric method in the leaves of the subshrub Zalesov's cinquefoil (*Comarum salesovianum* (Steph.) Asch. et Graebn.) from the Rosaceae Juss. family was validated. The content of catechins in terms of (\pm)-catechin in the leaves and rhizomes of two species of the genus *Comarum* – *C. salesovianum* and *C. palustre* L. (marsh cinquefoil) was studied. The highest content of catechins was found in the roots of *C. palustre* (4%) and leaves of *C. salesovianum* (2.58%). A method for determining the composition and content of individual catechins in the leaves and roots of two representatives of the genus *Comarum* by high-performance liquid chromatography has been proposed. Three catechins [(\pm)-catechin, epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin] were found in leaves and roots. (\pm)-catechin and (-)-epicatechin are predominant in the leaves and roots of *C. palustre* and *C. salesovianum*. The content of epigallocatechin gallate does not exceed 0.1 mg/g. The concentration of (\pm)-catechin is highest in the roots (1.21 mg/g) of *C. palustre*, and (-)-epicatechin is highest in the leaves (1.35 mg/g) of *C. salesovianum*.

Keywords: *Comarum*, catechins, spectrophotometry, HPLC, validation.

For citing: Kukushkina T.A., Kostikova V.A., Khranova E.P. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 2, pp. 196–206. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpm.20240212561.

References

- Zaprometov M.N. *Biokhimiya katekhinov*. [Biochemistry of catechins]. Moscow, 1964, 325 p. (in Russ.).
- Kim E., Hwang K., Lee J., Han S.Y., Kim E.-M., Park J., Cho J.Y. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19 (1), article 173. DOI: 10.3390/ijms19010173.
- Bae J., Kim N., Shin Y., Kim S.Y., Kim Y.J. *Biomed. Dermatol.*, 2020, vol. 4, article 8. DOI: 10.1186/s41702-020-0057-8.
- Ohmori Y., Ito M., Kishi M., Mizutani H., Katada T., Konishi H. *Biol. Pharm. Bull.*, 1995, vol. 18 (5), pp. 683–686. DOI: 10.1248/bpb.18.683.
- de Oliveira Caleare A., Hensel A., Mello J.C., Pinha A.B., Panizzon G.P., Lechtenberg M., Petereit F., Nakamura C.V. *Fitoterapia*, 2017, vol. 118, pp. 87–93. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.03.002.
- Marques T.R., Cesar P.H.S., Braga M.A., Marcussi S., Corrêa A.D. *J. Food Sci.*, 2018, vol. 83 (11), pp. 2840–2849. DOI: 10.1111/1750-3841.14330.
- Zaprometov M.N. *Fenol'nyye soyedineniya. Rasprostraneniye, metabolizm i funktsii v rasteniyakh*. [Phenolic compounds. Distribution, metabolism and functions in plants]. Moscow, 1993, 272 p. (in Russ.).
- Isemura M. *Molecules*, 2019, vol. 24 (3), article 528. DOI: 10.3390/molecules24030528.
- Zubova M.Yu., Nechayeva T.L., Kartashov A.V., Zagorskina N.V. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*, 2020, no. 6, pp. 604–615. DOI: 10.31857/S000233292006017X. (in Russ.).
- Kurbatskiy V.I. *Flora Sibiri*. [Flora of Siberia]. Novosibirsk, 1988, vol. 8, pp. 35–38. (in Russ.).
- Sklyarevskaya N.V. *Farmakognosticheskoye izucheniye nadzemnoy chasti sabel'nika bolotnogo (Comarum palustre L.), proizrastayushchego na Severo-Zapade Rossii: dis. ... kand. farm. nauk*. [Pharmacognostic study of the aerial part of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre* L.), growing in the North-West of Russia: dis. ...cand. pharm. Sci.]. St. Petersburg, 2009, 163 p. (in Russ.).
- Strugar Y., Orlova A.A., Ponkratova A.O., Ueyli A.K., Povydysh M.N. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2022, vol. 11, no. 4, pp. 177–184. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184. (in Russ.).
- Naumchik G.N. *Fitokhimicheskoye issledovaniye sabel'nika bolotnogo i prigotovleniye iz nego nekotorykh lekarstvennykh preparatov: avtoref. dis. ... kand. farm. nauk*. [Phytochemical study of marsh cinquefoil and the preparation of some medicinal preparations from it: abstract of thesis. dis. ...cand. pharm. Sci.]. Leningrad, 1964, 16 p. (in Russ.).
- Chemesova I.I., Chizhikov D.V. *Rastitel'nyye resursy*, 2004, vol. 40, no. 3, pp. 122–130. (in Russ.).
- Saybel' O.L., Dargayeva T.D., Zayko L.N. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta. Meditsina i farmatsiya*, 2008, no. 12, pp. 16–21. (in Russ.).
- Zhukova O.L., Stikhii V.A., Sheychenko V.I., Dargayeva T.D. *Mezhdunarodnaya konferentsiya: Lekarstvennoye rasteniyevodstvo: sbornik nauchnykh trudov*. [International conference: Medicinal plant growing: collection of scientific papers]. Moscow, 2006, pp. 260–265. (in Russ.).
- Yorshik O.A., Buzuk G.N. *Vestnik farmatsii*, 2007, no. 4 (38), pp. 10–17. (in Russ.).
- Yorshik O.A., Buzuk G.N. *Rastitel'nyye resursy*, 2015, vol. 51, no. 2, pp. 220–228. (in Russ.).
- Tril' V.M. *Nauka: kompleksnyye problemy*, 2015, no. 2 (6), pp. 19–27. (in Russ.).
- Odontuya G., Banzragchgarav O., Murata T., Batkhuu J., Sasaki K., Yoshizaki F. *Phytochemistry Letters*, 2015, vol. 13, pp. 360–364. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.07.020.
- Bukreyeva T.V., Shavarda A.L. *Rastitel'nyye resursy*, 2017, vol. 53, no. 3, pp. 435–442. (in Russ.).

* Corresponding author.

22. Khramova Ye.P., Chankina O.V., Syeva S.Ya., Kostikova, V.A. *Rastitel'nyy mir Aziatskoy Rossii*, 2019, no. 3(35), pp. 62–69. DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2019-3(62-69). (in Russ.).
23. Gonchig E., Erdenebat S., Togtoo O., Bataa S., Gendaram O., Kim Y.S., Ryu S.Y. *Natural Product Sciences*, 2008, vol. 14, no. 1, pp. 1–5.
24. Lobanova I.Ye., Filippova Ye.I., Kukushkina T.A., Protsenko M.A., Khramova Ye.P., Mazurkova N.A., Vysochina G.I. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2021, vol. 29, pp. 675–682. DOI: 10.15372/KhUR2021346. (in Russ.).
25. Khramova Ye.P., Kukushkina T.A., Shaldayeva T.M., Syeva S.Ya. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2020, no. 1, pp. 189–197. DOI: 10.14258/jcprm.2020015145. (in Russ.).
26. Zhukova O.L., Abramov A.A., Dargayeva T.D., Markaryan A.A. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya*, 2006, vol. 47, no. 5, pp. 342–345. (in Russ.).
27. Kononov D.A., Kononova D.S. *Aktual'nyye problemy meditsiny*, 2012, no. 16 (135), pp. 156–159. (in Russ.).
28. Andreyeva V.Yu., Kalinkina G.I., Li V.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 161–168. DOI: 10.14258/jcprm.2019034683. (in Russ.).
29. Ivanova Ye.V., Luksha Ye.A., Kalinkina G.I., Pogodin I.S. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2016, no. 4 (60), pp. 118–120. (in Russ.).
30. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, vol. 46, no. 10, pp. 4267–4274. DOI: 10.1021/jf980366j.
31. Kriventsov V.I. *Metodicheskiye rekomendatsii po analizu plodov na biokhimicheskiy sostav*. [Methodological recommendations for analyzing fruits for biochemical composition]. Yalta, 1982, 21 p. (in Russ.).
32. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. 14 izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed.]. Moscow, 2018, vol. 4, p. 6143. (in Russ.).
33. Olenikov D.N. *Chemistry of Natural Compounds*, 2016, vol. 52, no. 4, pp. 721–723. DOI 10.1007/s10600-016-1754-9.
34. Chayka V.M., Sobolevskaya K.A., Minayeva V.G. *Izvestiya SO AN SSSR. Ser. biol. nauka*, 1973, no. 2, pp. 31–36.
35. Zhukova O.L. *Fitokhimicheskoye izucheniye sabel'nika bolotnogo, sukhogo ekstrakta na yego osnove i ikh standartizatsiya: dis. ... kand. farm. nauk.* [Phytochemical study of marsh cinquefoil, dry extract based on it and their standardization: dis. ... cand. pharm. Sci.]. Moscow, 2007, 145 p. (in Russ.).
36. Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Olenikov D.N. *Molecules*, 2017, vol. 22(1), article 73. DOI: 10.3390/molecules22010073.

Received February 14, 2023

Revised October 3, 2023

Accepted October 9, 2023

Сведения об авторах

Кукушкина Татьяна Абдулхайловна – старший научный сотрудник, kukushkina-phyto@yandex.ru

Костикова Вера Андреевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, serebryakova-va@yandex.ru

Храмова Елена Петровна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией фитохимии, elenakhramova2023@yandex.ru

Information about authors

Kukushkina Tatyana Abdulkhailovna – senior researcher, kukushkina-phyto@yandex.ru

Kostikova Vera Andreevna – candidate of biological sciences, senior researcher, serebryakova-va@yandex.ru

Khramova Elena Petrovna – Doctor of Biological Sciences, chief researcher, head of the laboratory of phytochemistry, elenakhramova2023@yandex.ru