

УДК 582.711.711: 577.13 (571.6)

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *SPIRAEA BETULIFOLIA* PALL. МЕТОДОМ ВЭЖХ**

© **В.А. Костикова**

*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская,  
101, Новосибирск, 630090 (Россия), e-mail: serebryakova-va@yandex.ru*

Проведены исследования по оптимизации условий экстракции фенольных соединений из листьев *Spiraea betulifolia* Pall. для дальнейшего фитохимического и хемотаксономического исследования методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При планировании эксперимента в качестве переменных факторов были выбраны концентрация экстрагента (водные и водно-этанольные 20, 40, 50, 60, 70, 80 и 96% извлечения) и масса навески сырья (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 и 1 г). Об эффективности экстракции судили по качественному составу фенольных веществ на ВЭЖХ-хроматограммах. Проведенные исследования показали, что для изучения состава фенольных соединений, содержащихся в листьях *S. betulifolia*, методом ВЭЖХ, следует использовать концентрированные экстракты, полученные из навески 0,1–1 г с использованием 40–70% водно-этанольных растворов. В листьях *S. betulifolia* методом ВЭЖХ выявлено 25 фенольных соединений, из которых идентифицированы хлорогеновая и *p*-кумаровая кислоты, дигидрокверцетин, кверцетин, кемпферол, рутин, гиперозид и астрагалин.

*Ключевые слова:* *Spiraea betulifolia*, экстракция, фенольные соединения, ВЭЖХ.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-00106 мол\_а.*

### **Введение**

Потенциал биологической активности лекарственных растений определяется содержанием в них комплекса веществ, которые оказывают целебное действие. Исследование биохимического разнообразия растений помогает оценить перспективность растений как носителей биологически активных веществ, а также вносит дополнительные сведения в систематику спорных таксонов [1, 2].

Виды рода *Spiraea* L. (спирея) представляют значительный интерес как растения, используемые в народной медицине и имеющие большой ресурсный потенциал. В спиреях обнаружены фенольные соединения с высокой биологической активностью: флавонолы, флавоны, флаваны, фенолкарбоновые кислоты, сапонины и др. [3–5]. *S. betulifolia* Pall. (спирея березолистная) является одной из малоизученных спирей на содержание вторичных метаболитов и проявление биологической активности. Известно, что спирея березолистная проявляет антимикробную активность, на Чукотке используется как суррогат чая, а также она имеет кормовое значение. Сок листьев проявляет фитонцидную активность [3, 6]. Выявлена антиоксидантная активность водных и водно-этанольных экстрактов из листьев и соцветий спиреи [7].

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с успехом применяется в изучении состава и содержания различных групп биологически активных веществ в экстрактах растений, в том числе и фенольных соединений [8]. Это высокоточный и чувствительный метод, позволяющий исследовать вещества в смеси. На процесс экстрагирования веществ из растительного сырья влияют различные факторы: степень измельчения сырья, температура, продолжительность процесса экстракции, природа экстрагента и др. [9]. Поэтому для каждого растительного объекта необходим подбор условий экстракции для более полного извлечения фенольных соединений методами ВЭЖХ.

---

*Костикова Вера Андреевна* – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник,  
e-mail: serebryakova-va@yandex.ru

Цель настоящей работы – выбор оптимальных условий экстракции фенольных соединений из листьев *S. betulifolia* для их исследования методом ВЭЖХ.

### Объекты и материалы

Объектом для исследования фенольных соединений послужила *S. betulifolia*. Материал был собран автором в Еврейской автономной области, в окрестностях п. Облучье в фазе образования плодов в августе 2013 г. Для исследования фенольных соединений с 15 особей равномерно по всей кроне куста брали по десять листьев и высушивали их на воздухе в затененном месте. После сушки сырье измельчали до 2–3 мм, перемешивали и отбирали среднюю пробу. Анализ проводили в двух повторностях.

При планировании эксперимента в качестве переменных факторов были выбраны концентрация экстрагента и масса навески сырья.

Хроматографическое изучение фенольных соединений проводили в водном и водно-этанольных (20, 40, 50, 60, 70, 80 и 96%) извлечениях из листьев *S. betulifolia*, полученных экстракцией на водяной бане. Точную навеску (0,5 г) измельченного воздушно-сухого материала экстрагировали дважды: сначала 30 мл экстрагента в течение 30 мин, затем 20 мл экстрагента в течение 20 мин. После фильтрации остаток в колбе и на фильтре промывали 5 мл 70% спирта. Мерным цилиндром измеряли объем полученного объединенного экстракта, который составил 40–50 мл [2].

При исследовании влияния массы навески сырья (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 г) на состав фенольных соединений *S. betulifolia* использовали экстракты, полученные с применением 40% водно-этанольного раствора.

После проведения анализа на ВЭЖХ экстракты концентрировали в вытяжном шкафу («Ezermester») в фарфоровых чашечках до 10–15 мл (точный объем) и снова анализировали. Об эффективности экстракции судили по качественному составу фенольных веществ на ВЭЖХ-хроматограммах.

1 мл экстракта разбавляли бидистиллированной водой до 5 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (ЗАО «БиоХимМак») для освобождения от примесей гидрофильной природы. Вещества смывали с патрона небольшим количеством (3 мл) этанола соответствующей концентрации (водный экстракт смывали 40% водно-этанольным раствором), а затем 2 мл 96% этанола. Объединенный элюат пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Анализ фенольных соединений, содержащихся в элюате, проводили на аналитической ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent 1200» с диодноматричным детектором и системой для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. Разделение проводили на колонке Zorbax SB-C18, размером 4,6×150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1 %) изменялось от 50 до 52% за 56 мин. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны  $\lambda = 360$  нм [8].

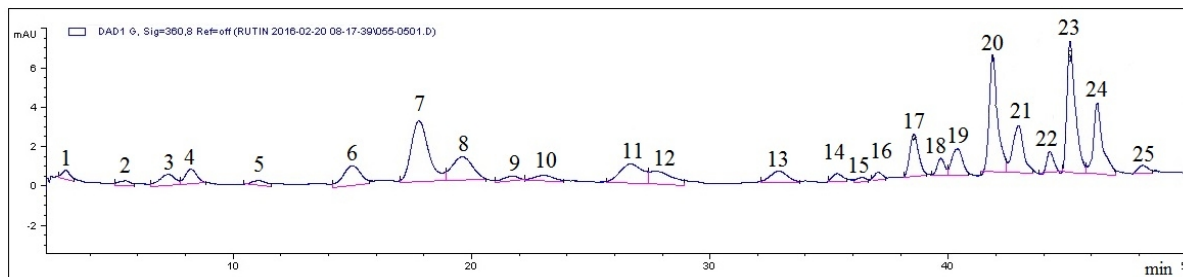
Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос.ч.), ортофосфорную кислоту (ос.ч.), бидистиллированную воду. Вещества идентифицировали методом сопоставления времени удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов с временами удерживания пиков стандартных образцов и УФ спектров. Для приготовления стандартных образцов использовали хлорогеновую, *n*-кумаровую кислоты, кверцетин, кемпферол («Sigma-Aldrich»), рутин гиперозид, авикулярин, астрагалин («Fluka») и дигидрокверцетин («Austrowaren»).

### Результаты и обсуждение

Согласно литературным данным в листьях *S. betulifolia* содержатся флавонолы – кемпферол, кверцетин, гликозиды кверцетина – рутин и гиперозид, гликозид кемпферола – астрагалин [7]. В результате исследования фенольных соединений, содержащихся в водном и водно-этанольных экстрактах из листьев *S. betulifolia*, обнаружено 25 соединений фенольной природы. Из них идентифицированы две фенолкарбоновые кислоты – хлорогеновая кислота и *n*-кумаровая, один флаванол – дигидрокверцетин и 6 флавонолов – агликоны кверцетин и кемпферол, гликозиды кверцетина рутин, гиперозид и гликозид кемпферола астрагалин (рис., табл.). Основными веществами в экстрактах листьев *S. betulifolia* являются гиперозид, рутин, авикулярин и неидентифицированные соединения № 6, 17, 20, 21, 23 и 24. Для них получены спектральные характеристики, кроме соединений № 21 и 24 (рис., табл.). В таблице приведены вещества, для которых нами получена спектральная характеристика. Согласно УФ-спектрам можно предположить, что соединения № 6, 17, 20 и 23 относятся к классу оксибензойных кислот, флавонов или флавонолов [10].

Основные вещества, содержащиеся в листьях *S. betulifolia*, можно обнаружить во всех исследованных экстрактах. Максимальное количество фенольных соединений, содержащихся в листьях *S. Betulifolia*, – 22 соединения – выявлено в водном экстракте, а также в экстрактах, полученных с использованием 20 и

40% водно-этанольных растворов. В экстрактах, полученных с использованием раствора этанола 50, 60 и 70%, обнаружено 18, в 80% – 15 и в 96% – 10 соединений. При концентрировании экстрактов в водном, водно-этанольных экстрактах (20 и 40%) было обнаружено еще три минорных компонента, в результате выявлено 25 соединений; при концентрировании экстрактов, полученных с использованием водно-этанольных растворов 50, 60 и 70% также установлено 25 веществ; в концентрированных экстрактах, полученных на этаноле 80 и 96%, состав фенольных соединений не изменился.



Хроматограмма концентрированного экстракта, полученного с использованием 40 % водно-этанольного раствора из листьев растений *S. betulifolia* при 360 нм. По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – оптическая плотность

Характеристика фенольных соединений, обнаруженных в экстрактах из листьев *Spiraea betulifolia*

№ пика	Соединение	Время удерживания ( $t_R$ ), мин	Спектральная характеристика $\lambda_{max}$ , нм
1	хлорогеновая кислота	3,2	244, 300 пл, 330
3	<i>n</i> -кумаровая кислота	7,9	226, 293 пл, 320
4	дигидрокверцетин	8,5	290
6	–	15,0	250, 265 пл, 355
7	гиперозид	18,0	255, 268 пл., 355
8	рутин	20,0	256, 358
11	авикулярин	28,4	260, 270 пл, 360
13	астрагалин	32,3	265, 300 пл., 350
17	–	38,4	265, 355
19	кверцетин	40,6	255, 372
20	–	42,1	255, 355
23	–	45,7	260, 350
25	кемпферол	47,9	225, 266, 370

Примечание. «–» – вещество не идентифицировано.

При изучении зависимости состава фенольных соединений в листьях *S. betulifolia* от массы навески использовали экстракты, полученные с использованием 40% водно-этанольного раствора. Наиболее полный состав соединений обнаружен в экстрактах с массой навески 0,5, 0,6, 0,8 и 1 г (25 соединений). С массой навески 0,1 г выявлено 16 соединений; 0,2 г – 20 соединений; 0,4 г – 23 соединения. При концентрировании экстрактов выявлено, что все анализируемые экстракты содержат 25 веществ фенольной природы.

Таким образом, подобраны оптимальные условия экстракции для проведения ВЭЖХ анализа, позволяющие извлечь максимальное количество фенольных соединений, содержащихся в листьях растений рода *Spiraea*. Таковыми являются предварительно концентрированные экстракты, полученные из навески 0,1–1 г с использованием 40–70% водно-этанольного раствора.

В листьях *S. betulifolia* методами ВЭЖХ определено 25 соединений фенольной природы, из которых идентифицированы хлорогеновая и *n*-кумаровая кислоты, дигидрокверцетин, кверцетин, кемпферол, рутин, гиперозид и астрагалин.

### Список литературы

1. Harborne J.V. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. New York, 1967. 383 p.
2. Высочина Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск, 2004. 240 с.
3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Hydraginaceae* – *Haloragaceae*. Л., 1987. С. 99–101.

4. Mughal U.R., Mehmood R., Malik A., Alia B., Tareen R.B. Flavonoid Constituents from *Spiraea brahuica* // *Helvetica Chimica Acta*. 2012. Vol. 95. Pp. 100–105.
5. Hiradate S., Morita S., Sugie H., Fuji Y., Harada J. Phytotoxic cis-cinnamoyl glucosides from *Spiraea thunbergii* // *Phytochem*. 2004. Vol. 65. Pp. 731–739.
6. Киселева Т.И., Чиндяева Л.Н., Цыбуля Н.В. Биологические особенности и антимикробные свойства видов рода *Spiraea* L. в Новосибирске // *Вестник Иркутской государственной сельскохозяйственной академии*. 2011. №44-1. С. 65–72.
7. Костикова В.А. Спирей (*Spiraea* L.) Дальнего Востока России: изменчивость, хемотаксономия, использование : автореф. дис. ... канд. биолог. наук. Новосибирск, 2013. 16 с.
8. Храмова Е.П., Комаревцева Е.К. Изменчивость флавоноидного состава листьев *Potentilla fruticosa* (Rosaceae) разных возрастных состояний в условиях Горного Алтая // *Растительные ресурсы*. 2008. №3. С. 96–102.
9. Минина С.А., Громова Н.А. Теория и аппаратное оформление процесса экстракции. Л., 1985. 40 с.
10. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений: учебное пособие. М., 1974. 213 с.

Поступило в редакцию 19 июля 2016 г.

После переработки 16 ноября 2016 г.

*Kostikova V.A.* DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITIONS OF EXTRACTION FOR INVESTIGATION OF COMPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS *SPIRAEA BETULIFOLIA* PALL. BY HPLC METHOD

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, ul. Zolotodolinskaya, 101, Novosibirsk 630090 (Russia),  
e-mail: serebryakova-va@yandex.ru

Studies on optimizing the conditions of extraction of phenolic compounds from the leaves of *Spiraea betulifolia* Pall. for further chemotaxonomic and phytochemical research by high performance liquid chromatography (HPLC) are conducted. Concentration of extraction agent (water and water – ethanol 20, 40, 50, 60, 70, 80 and 96% extraction) and the mass of raw sample (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 and 1 g) were selected as variable factors. Qualitative composition of phenolic compounds on HPLC – chromatograms served as indicator of efficiency of extraction. Studies have shown that concentrated 40–70% water-ethanol extracts with the mass of raw sample 0,1 – 1 g are more suitable for the detection of the whole of composition of phenolic compounds present in the leaves of *S. betulifolia* by HPLC method. Twenty five compounds found in the leaves of *S. betulifolia* by HPLC method. Nine substances were identified as chlorogenic and *n*-coumaric acid, dihydroquercetin, quercetin, kaempferol, rutin, giperozid, avikulyarin and astragaline.

*Keywords:* *Spiraea betulifolia*, extraction, phenolic compounds, HPLC.

### References

1. Harborne J.B. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, New York, 1967, 383 p.
2. Vysochina G.I. *Fenol'nye soedineniia v sistematike i filogenii semeistva grechishnykh*. [Phenolic compounds in systematics and phylogeny of the family Polygonaceae]. Novosibirsk, 2004, 240 p. (in Russ.).
3. *Rastitel'nye resursy SSSR: Tsvetkovye rasteniia, ikh khimicheskii sostav, ispol'zovanie; Semeistva Hydraginaceae – Haloragaceae*. [Plant resources of the USSR: Flowering plants, their chemical composition, the use of; Family Hydraginaceae - Haloragaceae]. Leningrad, 1987, pp. 99–101. (in Russ.).
4. Mughal U.R., Mehmood R., Malik A., Alia B., Tareen R.B. *Helvetica Chimica Acta*, 2012, vol. 95, pp. 100–105.
5. Hiradate S., Morita S., Sugie H., Fuji Y., Harada J. *Phytochem*, 2004, vol. 65, pp. 731–739.
6. Kiseleva T.I., Chindiaeva L.N., Tsybulia N.V. *Vestnik Irkutskoi gosudarstvennoi sel'skokhoziaistvennoi akademii*, 2011, no. 44-1, pp. 65–72. (in Russ.).
7. Kostikova V.A. *Spirei (Spiraea L.) Dal'nego Vostoka Rossii: izmenchivost', khemotaksonomiia, ispol'zovanie: avtoref. dis. ... kand. biolog. nauk*. [Spiraea (Spiraea L.) Far East Russia: variability chemotaxonomy, use: Abstract of Dis. ... Cand. biological Sciences]. Novosibirsk, 2013, 16 p. (in Russ.).
8. Khramova E.P., Komarevtseva E.K. *Rastitel'nye resursy*, 2008, no. 3, pp. 96–102. (in Russ.).
9. Minina S.A., Gromova H.A. *Teoriia i apparaturnoe oformlenie protsessia ekstrakttsii*. [Theory and hardware registration of extraction process]. Leningrad, 1985, 40 p. (in Russ.).
10. Zaprometov M.N. *Osnovy biokhimii fenol'nykh soedinenii: uchebnoe posobie dlia biol. spetsial'nykh universitetov*. [Fundamentals of Biochemistry of phenolic compounds: a manual for biol. special universities]. Moscow, 1974, 213 p. (in Russ.).

Received July 19, 2016

Revised November 16, 2016