

УДК 543.54:547.56:615.451.16:634.18

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© Н.В. Исайкина¹, Н.Э. Коломиец^{1*}, Н.Ю. Абрамец¹, Р.А. Бондарчук²

¹Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Московский тракт, 2, Томск, 634004 (Россия), e-mail: borkol47@mail.ru

²Кировский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. К. Маркса, 112, Киров, 610027 (Россия)

В сообщении представлены результаты изучения фенольного комплекса водного, 40 и 95% подкисленного водно-спиртового экстрактов из плодов рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L., семейство *Rosaceae*). Плоды рябины обыкновенной были собраны авторами в естественных местах произрастания вида в конце августа – начале сентября 2014 г. на территории Томского района Томской области; Ангарского района Иркутской области, также в исследовании использовали образцы сырья ОАО «Красногорсклексредства». Из плодов рябины с помощью 40 и 95% этанола получали экстракты, которые затем разделяли на фракции бутанолом, этилацетатом, хлороформом. Исследовали как сами фракции, так и фракции, очищенные методом колоночной хроматографии. Исследование проведено методами хроматографии на бумаге (БХ), в тонком слое сорбента (ТСХ), методом ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС. ВЭЖХ проведено на хроматографе «Dionex Ultimate 3000», с УФ-детектором в диапазоне волн от 254 до 330 нм. Разделение проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом Restek Pinnacle ПС18 (150×4,6 мм, размер частиц 5 мкм), скорость подачи подвижной фазы – 1 мл/мин; температура – 20 °С, подвижная фаза 50 мл ацетонитрила, 50 мл 0,1% трифторуксусной кислоты. ВЭЖХ-МС проведено на хроматографе с диодно-матричным УФ- и масс-селективным детекторами «Agilent Technologies 1100 Series LS/MSD». В качестве неподвижной фазы использовали колонку с обращенной фазой «Zorbax XDB-C8 Rx-C18» (4,6×150 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 80 Å), 2,3% HCOOH-MeOH (градиент от 40 до 90% метанола с 5 до 10 мин), скорость подачи подвижной фазы – 1 мл/мин.

Проведенное исследование позволяет с определенной степенью достоверности предполагать присутствие в экстрактах рябины обыкновенной: цианидина хлорида, рутина, кверцетина, изокверцитрина, байкалина, апигенина, кемпферола, скутелярина, хлорогеновой, ванилиновой, кофейной, кумаровой, феруловой, коричной и салициловой кислот. Впервые в плодах рябины обыкновенной идентифицирован байкалин, байкалеин и скутелярин. Установлено различие в качественном составе и количественном содержании фенольных соединений в экстрактах рябины, полученных разными экстрагентами.

Ключевые слова: *Sorbus aucuparia* L., рябина обыкновенная, фенольные соединения, антоцианы, флавоноиды, фенолокислоты, БХ, ТСХ, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, байкалин, байкалеин и скутелярин.

Исайкина Надежда Валентиновна – доцент кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, кандидат фармацевтических наук, e-mail: isaikina74@mail.ru

Коломиец Наталья Эдуардовна – профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, доктор фармацевтических наук, доцент, тел. (3822) 90-11-01, e-mail: borkol47@mail.ru

Абрамец Наталья Юрьевна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, e-mail: abrameznu@mail.ru

Бондарчук Руслан Анатольевич – ассистент кафедры фармакологии, кандидат фармацевтических наук, e-mail: medika43@yandex.ru

Введение

Плоды рябины обыкновенной – фармакопейный вид лекарственного растительного сырья, известный в медицине как поливитаминное средство, содержащее комплекс биологически активных веществ: каротиноидов (до 20 мг %), аскорбиновой кислоты (до 200 мг %), органических кислот (2,5%), антоцианов, дубильных и пектиновых веществ (по 0,5%), аминокислот, макро- и микроэлементов (калий, кальций, магний, натрий), флавоноидов, горьких гликозидов. Наряду

* Автор, с которым следует вести переписку.

с использованием в медицине плоды рябины широко используют в производстве спиртосодержащих напитков и пищевой промышленности [1–8].

В последние несколько лет зарубежными и отечественными учеными была показана перспективность рябины не только в качестве поливитаминного средства. Экспериментальные исследования на мышцах показали, что 40% этанольный экстракт плодов рябины и выделенный из него полифенольный комплекс способствуют восстановлению подавленной активности иммунной системы. Полифенольный комплекс 40% экстракта рябины, оказывая стимулирующее влияние на гуморальный, клеточный иммунный ответ и неспецифическую резистентность организма, стимулирует образование антител, фагоцитарную и бактерицидную активность иммунокомпетентных клеток. Данное свойство исследователи обосновывают наличием в плодах комплекса фенольных соединений, прежде всего, проантоцианидинов, обладающих антиоксидантным, иммуностропным, противовоспалительным и капилляроукрепляющим действием [4, 6, 10–12]. Ранее нами в эксперименте было установлено, что экстракт плодов рябины обыкновенной, полученный с использованием 95% подкисленного этанола, обладает выраженным противовоспалительным и иммуностропным действием [5]. В настоящее время нами совместно с ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» проведено экспериментальное изучение экстрактов плодов рябины на 40 и 95% подкисленном этаноле на развитие карциномы легких Льюис и противоопухолевой активности циклофосфана, о чем будет сообщено в одной из наших следующих публикаций.

Таким образом, рябина обыкновенная является перспективным источником для получения препаратов различного фармакологического действия. Из данных литературы и наших исследований следует, что экстракты на 40 и 95% этаноле наряду с общими фармакологическими свойствами обладают и особенностями действия. В связи с этим представляет интерес изучить особенности химического состава данных экстрактов с целью объяснения различий в фармакологическом действии. Кроме того, выявление основной действующей / доминирующей группы БАВ позволит избирательно подойти к вопросам стандартизации препаратов, полученных разными способами.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали образцы, собранные лично авторами статьи в естественных местах произрастания рябины в конце августа – начале сентября 2014 г. на территории Томской области в окрестностях Томска; окрестностях п. Китой Ангарского района Иркутской области, а также промышленные образцы сырья ОАО «Красногорсклексредства» (серия 20313). Установление подлинности образцов проведено на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Сибирского государственного медицинского университета.

Для получения экстрактов из плодов рябины использовали лабораторный реактор с паровой рубашкой (Radleys, Германия), подключенный к погруженному циркуляционному блоку регулирования температуры «МО1» (Термэкс, Россия), верхнеприводной мешалке RZR 2020 (Heidolph, Германия) и шариковому холодильнику. Сырье измельчали до размера частиц 0,3–0,5 см. Навеску сырья (450 г) помещали в реактор, прибавляли этиловый спирт в соотношении 1 : 30. Экстрагирование проводили при температуре 80 °С в течение 60 мин. Готовые экстракты отстаивали при температуре не выше 10 °С до получения прозрачной жидкости не менее 2 суток, фильтровали и хранили в прохладном, защищенном от света месте. Для проведения хроматографического исследования экстракты сгущали под вакуумом.

Для детального изучения качественного состава фенольных соединений из полученных 40 и 95% экстрактов были выделены фракции последовательной экстракцией растворителями разной полярности: хлороформная (22,18 и 16,29 г; 4,93 и 3,62% от массы воздушно-сухого сырья), этилацетатная (5,98 и 4,59 г; 1,33 и 1,02%), бутанольная (26,86 и 18,81 г; 5,97 и 4,18 %). Доля водного остатка составила 129,60 и 51,75 г (28,80 и 11,5%). Общий выход экстрактивных веществ составил 41 и 20% от массы воздушно-сухого сырья.

Для хроматографии на бумаге (БХ) использовали хроматографическую бумагу FN-6 (Sartorius AG, Germany). Для тонкослойной хроматографии использовали пластины на алюминиевой подложке со слоем силикагеля Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Germany).

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле (L, 100/250 Lachema) и полиамиде (Woelm) в соотношении образец – сорбент 1 : 10 – 1 : 12. Разделение хлороформной фракции проводили на силикагеле, в системе хлороформ – метанол (с возрастающей концентрацией последнего). Этилацетатную фракцию разделяли на колонке с полиамидом, используя в качестве элюента этанол, водный раствор этанола возрастающей концентрации. Бутанольную фракцию разделяли на колонке с полиамидом смесью хлороформ – метанол (с возрастающей концентрацией последнего).

В качестве веществ сравнения использовали известные вещества: рутин (Sigma-Aldrich 84082), кверцетин (Sigma-Aldrich 83370), кверцетин-3-галактозид (гиперозид) (Sigma 83388), лютеолин 7-глюкозид (цинарозид) (Sigma 49968), цианидин хлорид (Sigma-Aldrich 79457), феруловую кислоту (Fluka 46280-F); хлорогеновую кислоту (Sigma C3878); коричную кислоту (Aldrich C80857); салициловую кислоту (Sigma-Aldrich 84210), изохлорогеновую кислоту (SMB00131 Sigma); галловую кислоту (Sigma G7384); кофейную кислоту (C0625 Sigma); п-кумаровую кислоту (C9008 Sigma); ванилиновую кислоту (94770 Sigma).

На хроматограммы исследуемые экстракты в объеме 4–6 мкл наносили микропипеткой на линию старта в виде полосы длиной 0,8 см; 0,1% растворы рабочих стандартных образцов (PCO) веществ сравнения наносили также в виде полосы 0,8 см, но в объеме 3 мкл. Детектирование веществ проводили в видимом и УФ-свете при длинах волн 365 и 254 нм.

Для хроматографирования использовали системы растворителей: *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2); 2 и 15% растворы уксусной кислоты.

Исследование методом обращенно-фазовой ВЭЖХ проводили на хроматографе «Dionex Ultimate 3000», с последующей обработкой полученных данных с использованием программного обеспечения Chromeleon и Microsoft Office 10. Детектирование веществ проводили с помощью УФ-детектора в диапазоне длин волн от 254 до 330 нм. В качестве неподвижной фазы использовали колонку из нержавеющей стали с обращенно-фазовым сорбентом Restek Pinnacle II C 18 (150x4,6 мм, с размером частиц 5 мкм), скорость подачи подвижной фазы – 1 мл/мин; температура – 20 °С. Подвижная фаза 50 мл ацетонитрила и 50 мл 0,1% трифторуксусной кислоты.

ВЭЖХ-МС методом химической ионизации реализован на жидкостном хроматографе с диодно-матричным УФ- и масс-селективным детекторами «Agilent Technologies 1100 Series LS/MSD». Детектирование веществ проведено с помощью диодно-матричного детектора «G 1315B» в диапазоне 230–500 нм при ширине полос 40 нм и контрольной длине волны 560 нм, ширина 100 нм; масс-селективный детектор «G1946C» позволил определить молекулярный вес компонентов с точностью 0,1 а.е. В качестве неподвижной фазы использовали колонку с обращенной фазой «Zorbax XDB-C8 Rx-C18» (4,6x150мм), наполнитель с размером частиц 5 мкм, размером пор 80 Å, 2,3% HCOOH-MeOH (градиент от 40 до 90% метанола с 5 до 10 мин), скорость подачи подвижной фазы – 1 мл/мин. Колонку термостатировали при 30 °С. Масс-селективный детектор использовали в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI), сканирование проводилось для отрицательных и положительных ионов в диапазоне *m/z* от 100 до 1000. Сочетание масс-селективного детектора в двух режимах (APCI, Pos. Scan. и APCI Neg. Scan.) с УФ-детектором позволяет получить наиболее полную информацию о компонентах. Напряжение на фрагментаторе для положительных ионов 40 вольт, для отрицательных – 70 вольт. Поток газа – осушителя (азота) – 7 л/мин, его температура – 340 °С, давление на распылителе 60 psi (фунтов на квадратный дюйм), температура испарителя 400 °С.

ИК-спектры снимали на «Specord UR-20» с призмами LiF и NaCl в таблетках KBr высотой 1 мм при соотношении вещества и наполнителя 1 : 400 и в пленке.

Спектры ¹H и ¹³C записывали на «Gemini-200» (Varian), «BS-567A» (Tesla).

Подкисленный этиловый спирт готовили из расчета 6,49 г концентрированной хлористоводородной кислоты на 200 мл 95% этилового спирта.

Определение биологически активных веществ проводили с использованием известных фармакопейных методов, адаптированных для плодов и экстрактов рябины обыкновенной. Сумму дубильных веществ определяли титриметрическим методом в пересчете на таннин [13]; сумму антоцианов – спектрофотометрическим методом в пересчете на цианидин хлорид [7]; флавоноидов – спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с 5% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида в пересчете на рутин [14]; фенолокислот – спектрофотометрическим методом в пересчете на хлорогеновую кислоту [15].

Определение экстрактивных веществ проводили по методике, изложенной в Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания [16].

Обсуждение результатов

Проведенный анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что наибольшее значение для рябины обыкновенной имеют фенольные соединения. Данный класс соединений представлен в рябине антоцианами, лейкоантоцианами, флавоноидами, фенолокислотами и катехинами [2–4, 6, 7, 9, 10, 11, 17]. Кроме того, как было указано выше, разные авторы именно с этими группами БАВ связывают некоторые виды фармакологической активности рябины обыкновенной. В связи с чем наше внимание было сосредоточено на этих группах БАВ.

Предварительный анализ УФ-спектров водного, 40% этанольного и 95% подкисленного этанольного экстрактов показал наличие основных максимумов поглощения, характерных для фенолкарбоновых кислот (галловая, ванилиновая и др. – 216–273 и 290–310 нм), оксикоричных кислот (кофейная, коричная, хлорогеновая, феруловая и др. – 230–240 и 290–330 нм), флавоноидов (250–270, 350–390 нм). Это позволило предположить, что основными компонентами экстрактов могут являться производные этих классов соединений.

На следующем этапе для изучения качественного состава фенольного комплекса экстрактов плодов рябины нами было проведено его хроматографическое исследование общепринятыми классическими для данного класса БАВ методами хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента, с использованием классических систем растворителей [18].

Исследование экстрактов проведено методом ТСХ в системе растворителей – *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2). В качестве известных веществ при хроматографировании использовали флавоноиды: рутин, кверцетин, гиперозид, цинарозид, цианидин хлорид, фенолокислоты: хлорогеновую, изохлаорогеновую, феруловую и галловую. Детектирование хроматограмм до и после проявления 5% спиртовым раствором хлорида алюминия (III) проводили в видимом и УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.

Результаты показали присутствие на хроматограмме 40% этанольного экстракта доминирующих зон адсорбции, соответствующих по хроматографическому поведению известным веществам: рутину, хлорогеновой и галловой кислоте. При детектировании хроматограммы 95% подкисленного этанольного экстракта были обнаружены зоны адсорбции, соответствующие кверцетину, цианидин хлориду и хлорогеновой кислоте. Несколько зон адсорбции нами идентифицированы не были.

Качественный состав фенолокислот изучали в хлороформной, этилацетатной и бутанольной фракциях экстрактов, методом хроматографии на бумаге (FN-6), в системах растворителей – 2 и 15% уксусной кислоты восходящим способом. Детектирование хроматограмм в УФ-свете при длине волны 365 нм показало наличие зон адсорбции с голубой, синей и фиолетовой флуоресценцией, которые при сравнении с известными веществами, нанесенными на хроматограммы были идентифицированы как кофейная, феруловая, *p*-кумаровая и ванилиновая кислоты. На хроматограммах также присутствовали и другие, не идентифицированные зоны адсорбции.

Для уточнения качественного состава фенольных соединений 40% и 95% подкисленного этанольного экстракта использовали метод ВЭЖХ. Идентификацию веществ проводили по времени удерживания компонентов на хроматограммах в сравнении с известными веществами.

Результаты ВЭЖХ-анализа позволяют с определенной степенью достоверности предполагать присутствие в исследуемых экстрактах флавоноидов и фенолокислот, представленных в таблице 1.

Для уточнения полученных предварительных данных о химическом составе экстрактов хлороформную, этилацетатную и бутанольную фракции очищали методом колоночной хроматографии. В процессе очистки было получено 63 фракции с различным качественным и количественным содержанием компонентов. В дальнейшем из них для исследования методом ВЭЖХ-МС и препаративного выделения индивидуальных веществ было отобрано 13 фракций 3 (F11), 6 (F13), 10 (F15), 12 (F16), 18 (F20), 28 (F25), 30 (F26), 31 (F27), 35 (F28), 39 (F29), 50 (F30) и 57 (F31). Критерием отбора фракций являлась максимальная концентрация индивидуальных компонентов по данным ТСХ при минимальном содержании примесей. Отобранные фракции были подвергнуты первичному аналитическому скринингу методом ВЭЖХ. На основании максимальной информативности полученных хроматограмм для дальнейшего анализа было отобрано 9 фракций (F11, F13, F15, F16, F20, F25, F27, F29 и F31) с высоким содержанием основного компонента.

Таблица 1. Результаты ВЭЖХ анализа водно-спиртовых экстрактов плодов рябины обыкновенной

Наименование вещества	Время удерживания, мин		
	PCO стандартных веществ	40% экстракт	95% экстракт
Рутин	13,67	13,83	13,77
Кверцетин	21,61	–	21,61
Изокверцетин	14,37	14,51	–
Апигенин	24,58	–	24,59
Байкалин	19,79	–	19,62
Кемпферол	23,49	–	23,65
Скутелярин	18,83	–	18,77
Хлорогеновая кислота	9,06	9,06	9,06
Феруловая кислота	14,33	14,33	14,22
Коричная кислота	23,38	–	23,38
Салициловая кислота	20,03	–	20,02

Критериями при расшифровке ВЭЖХ-хроматограмм, масс-спектров пиков и выборе предполагаемой структуры веществ являлись данные о времени удерживания, УФ- и масс-спектрах соответствующих пиков в сравнении с аналогичными данными стандартных образцов, имеющихся в нашем распоряжении, и данными литературы.

В результате проведенного ВЭЖХ-МС-анализа с максимально возможной для данного метода достоверностью было сделано заключение о присутствии в экстрактах 15 основных компонентов, характеристики которых представлены в таблице 2.

Следует отметить, что указанным методом получены дополнительные данные о возможном присутствии в составе экстрактов веществ, не установленных методами БХ, ТСХ и ВЭЖХ: цинарозид, гиперозид и галловая кислота.

Следующим этапом работы явилось препаративное выделение индивидуальных веществ из отобранных фракций. Индивидуальность выделенных соединений определяли методами двумерной хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента. Структуру выделенных индивидуальных соединений устанавливали по физико-химическим свойствам: температуре плавления, величинам батохромных сдвигов УФ-спектров при добавлении ионизирующих реагентов, данным ВЭЖХ-МС, ИК-, ПМР-, ЯМР-спектроскопии. В результате были выделены и установлены структуры 13 индивидуальных веществ (6 фенолокислот: хлорогеновая, феруловая, коричная, кофейная, *p*-кумаровая и ванилиновая; 7 флавоноидов: рутин, кверцетин, апигенин, кемпферол, гиперозид, байкалин, цинарозид), на присутствие которых указывали результаты методов БХ, ТСХ, ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС.

Кроме того, препаративно из этилацетатной фракции 95% подкисленного этанольного экстракта впервые было выделено вещество ф-5, присутствие которого не было определено другими методами. Из очищенных фракций 40% экстракта было выделено вещество ф-8, которое методом ВЭЖХ-МС в данном экстракте обнаружено не было.

Таблица 2. Результаты идентификации фенольных соединений методом ВЭЖХ-МС

Предполагаемая структура вещества	Время удерживания, мин	УФ, нм	m/z	40% экстракт	95% экстракт
Рутин	4.191	256, 355	610,3	+	-
Кверцетин	9.293	255, 370	302,0	+	+
Апигенин	11.871	224, 249, 325	270,2	-	+
Кемпферол	11.423	267, 362	286,1	-	+
Цинарозид	5.821	257, 266, 352	448,1	+	-
Гиперозид	5.280	257, 362	464,0	+	-
Хлорогеновая кислота	10.313	240, 323	354,1	+	+
Галловая кислота	3,620	216, 273	170,1	+	+
Феруловая кислота	20.13-20.31	234, 298, 322	194,0	+	+
Коричная кислота	9.747-9.820	265	148,0	-	+
Салициловая кислота	6,401	231, 295, 8	138,0	-	+
Кофейная кислота	13.35-13.49	244, 297, 324	180,1	+	+
<i>n</i> -кумаровая кислота	18.53	228, 310	164,0	+	+
Ванилиновая кислота	12.089	259, 292	168,0	-	+

Вещество ф-5 в виде светло-желтых призматических кристаллов, нерастворимых в воде, растворимых в этаноле, метаноле, этилацетате, умеренно растворимых в хлороформе. Т. пл. 262–265 °С. УФ-спектр вещества ф-5 имеет следующие максимумы поглощения; $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 247 нм, 274 нм, 323 нм; λ_{\max}^{NaOMe} 263, 366, 410 нм.; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ 247, 272, 284 нм., 375; $\lambda_{\max}^{AlCl_3/HCl}$ 255 нм, 282, 299 нм., 346; λ_{\max}^{NaOAc} 257, 306, 405 нм.; $\lambda_{\max}^{NaOAc/H_3BO_3}$ 262 нм., 277, 333. Данные УФ-спектров с ионизирующими и комплексообразующими реагентами (NaOMe, NaOAc, NaOAc / H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃ / HCl), показали, что вещество ф-5 является флавоном с 5,6,7- или 5,7,8-тригидроксизамещением в кольце А.

Полосы поглощения в ИК-спектре (KBr) в области: 3360 см⁻¹, характерные для валентных колебаний ОН-группы, 1640 см⁻¹, характерные для валентных колебаний С=О γ -пиронового кольца, 1605, 1585, 1525, 1300, 1220 см⁻¹, характерные для валентных колебаний ароматической С=C связи бензольных ядер.

В ПМР-спектре, снятом в DMSO-d₆ (м.д., J, Гц) наблюдали сигналы: при 6,62 (с, Н-8), 6,92 (с, Н-3), 7,570–7,52 (м, Н-3',4',5'), 8,05 (д, J=7,8, Н-2',6'), 8,81 (с, С7 –ОН), 10,57 (с, С6 –ОН), 12,65 (с, С5 –ОН).

¹³С-ЯМР (DMSO-d₆, 100 МГц) вещества ф-5: 182,9 (с, С-4), 164,3 (с, С-2), 153,8 (с, С-9), 149,8 (с, С-7), 146,6 (с, С-5), 131,6 (с, С-4'), 131,4 (с, С-1'), 129,4 (с, С-6), 128,9 (дд, С-3', С-5'), 126,0 (д, С-2', С-6'), 104,5 (с, С-10), 104,0 (с, С-3), 93,7 (д, С-8).

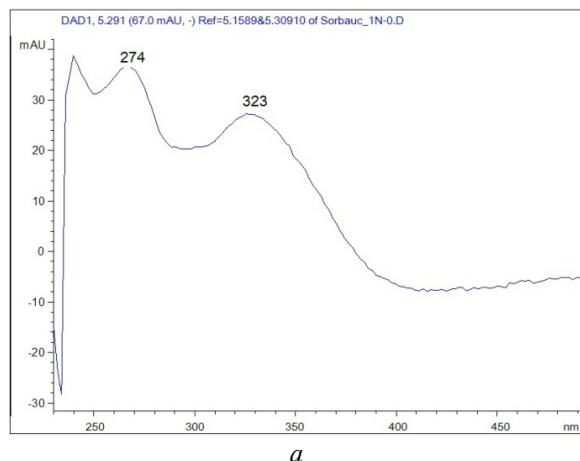
Таким образом, на основании совокупности физико-химических, хроматографических, спектральных данных и сравнения их с данными литературы вещество ф-5 идентифицировано как 5,6,7-тригидроксифлавоон, или байкалеин.

Из 40% этанольного экстракта было выделено вещество ф-8, представляющее собой порошок желтовато-зеленого цвета. Т.пл. 202–206 °С. УФ-спектр вещества имеет следующие максимумы поглощения, нм: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 244, 278, 315; λ_{\max}^{NaOMe} 263, 286 нм., 357 нм.; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ 249 нм., 289, 344; $\lambda_{\max}^{AlCl_3/HCl}$ 248 нм, 290, 339; λ_{\max}^{NaOAc} 277, 306 нм., 395 нм.; $\lambda_{\max}^{NaOAc/H_3BO_3}$ 283, 317 нм. Данные УФ-спектров с ионизирующими и комплексообразующими реагентами (NaOMe, NaOAc, NaOAc / H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃ / HCl), показали, что вещество ф-8 является флавоном с дигидроксизамещением в положениях 5,6-, или 5,7-, или 6,7- в кольце А.

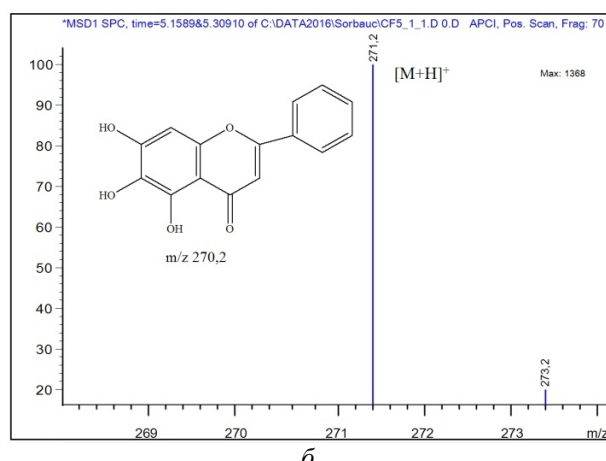
Полосы поглощения в ИК-спектре (KBr) в области: 3500–3100 см⁻¹, характерные для валентных колебаний ОН-группы, 1700 см⁻¹, характерные для валентных колебаний С=О γ -пиронового кольца, 1600, 1475, 1350, характерные для валентных колебаний ароматической С=C связи бензольных ядер, валентным колебаниям β -конфигурации гликозидной связи соответствует полоса поглощения в области 1075 см⁻¹.

В ПМР-спектре, снятом в DMSO-d₆ (м.д., J, Гц) наблюдали сигналы: при 6,98 (с, Н-8), 7,04 (с, Н-3), 7,59–7,50 (м, Н-3', 4', 5'), 8,04 (д, J=8,0, Н-2',6').

¹³С-ЯМР (DMSO-d₆, 100 МГц): 163,5 (с, С-2), 104,65 (с, С-3), 182,50 (с, С-4), 146,71 (с, С-5), 130,79 (с, С-6), 149,17 (с, С-7), 94,17 (д, С-8), 151,57 (с, С-9), 106,12 (с, С-10), 130,79 (с, С-1'), 126,33 (д, С-2', С-6'), 129,11 (дд, С-3', С-5'), 131,96 (с, С-4'), 100,59 (С-Гк), 72,91 (д, С-2''), 74,79 (д, С-3''), 71,81 (д, С-4''), 75,64 (д, С-5''), 171,74 (д, С-6'').



а



б

а – УФ-спектр пика на ВЭЖ-хроматограмме вещества ф-5 со временем удерживания 5,291 мин;

б – масс-спектр фрагментов молекулярного иона вещества ф-5 (m/z 270,2) в режиме ХИ APCI Pos.Scan

Таким образом, на основании совокупности физико-химических, хроматографических, спектральных данных и сравнения их с данными литературы вещество ф-8 было идентифицировано как 7-D-глюкуроновая кислота-5,6-дигидроксифлавоин, или, байкалеин 7-глюкуронид, или байкалин.

Также нами была проведена количественная оценка флавоноидов, антоцианов, фенолокислот и дубильных веществ в плодах рябины и ее экстрактах. Из представленных в таблице 3 данных следует, что плоды рябины и экстракты на ее основе значительно отличаются по содержанию исследованных групп БАВ. Это позволяет избирательно подойти к вопросам стандартизации плодов рябины обыкновенной и препаратов на ее основе, полученных разными способами. Например, качество плодов рябины, содержащих значительное количество антоцианов и дубильных веществ, можно оценивать по этим группам БАВ. Оценить качество экстрактов целесообразнее по содержанию антоцианов и фенолокислот.

Полученные результаты качественного и количественного содержания БАВ в плодах рябины обыкновенной и экстрактов на ее основе позволяют сделать заключение об имеющихся отличиях как по качественному составу, так и по количественному содержанию БАВ, чем, вероятно, могут быть связаны имеющиеся различия в их фармакологических свойствах.

Таблица 3. Результаты определения экстрактивных веществ, фенольных соединений в плодах и водно-спиртовых экстрактах рябины обыкновенной

Наименование объекта исследования	Плоды рябины обыкновенной (% на а.с.с.)	Экстракт 40% (% на сухой остаток экстракта)	Экстракт 95% (% на сухой остаток экстракта)
Экстрактивные вещества	49,23 ± 4,36	40,56 ± 3,58	19,60 ± 1,23
Флавоноиды	0,06 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Антоцианы	4,81 ± 0,24	0,72 ± 0,04	3,30 ± 0,20
Фенолокислоты	0,99 ± 0,05	2,59 ± 0,13	2,97 ± 0,15
Дубильные вещества	0,74 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,01

Выводы

В результате исследования экстрактов рябины обыкновенной методами БХ, ТСХ, ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС, а также установления структуры индивидуальных веществ, выделенных из фракций, в сравнении со стандартными веществами идентифицированы: цианидин хлорид, рутин, кверцетин, изокверцитрин, байкалин, байкалеин, апигенин, кемпферол, скутелярин, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, кумаровая, феруловая, коричная и салициловая кислоты. Впервые в плодах рябины обыкновенной установлено присутствие байкалина, байкалеина и скутелярина. Выявлено различие в качественном составе и количественном содержании фенольных соединений в экстрактах рябины, полученных разными экстрагентами, что позволяет избирательно подходить к выбору методов оценки их качества и объяснить различия в фармакологическом действии.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье: 11-е изд. М., 1989. 400 с.
2. Писарев Д.И., Новиков О.О., Сокоропудов В.Н. и др. Химическое изучение биологически активных полифенолов некоторых сортов рябины обыкновенной – *Sorbus aucuparia* // Научные ведомости БГУ. Сер. Медицина. Фармация. 2010. №12-2 (22). С. 123–128.
3. Галимова Д.Ф., Латыпова Г.М. Изучение полифенольных соединений рябины обыкновенной флоры Башкортостана // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13, №5(3). С. 33–35.
4. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгина В.Г., Другова Е.С., Момот Т.В. Химический состав и биологическое действие экстракта из плодов рябины // Химия растительного сырья. 2015. №2. С. 161–168.
5. Винницкая В.Ф. Адаптивный ассортимент рябины обыкновенной для производства лечебно-профилактических пищевых продуктов: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Мичуринск, 2003. 34 с.
6. Olszewska M.A., Nowak S., Michel P., Banaszczak P., Kicel A. Assessment of the Content of Phenolics and Antioxidant Action of Inflorescences and Leaves of Selected Species from the Genus *Sorbus* Sensu Stricto // Molecules. 2010. N15. С. 8769–8783.
7. Исайкина Н.В., Калинкина Г.И., Андреева В.Ю., Шерстобоев Е.Ю., Масная Н.В., Шилова А.Б. Рябина обыкновенная: определение антоцианов в плодах // Фармация. 2015. №1. С. 19–22.
8. Государственный реестр лекарственных средств: база данных. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.grls.rosminzdrav.ru>.

9. Becerra-Herrera M., Lazoi M. R., Sayago A., Beltrán R., Del Sole R., Vasapollo G. Extraction and Determination of Phenolic Compounds in the Berries of *Sorbus Americana* Marsh and *Lonicera oblongifolia* (Goldie) Hook // *Food Anal. Methods*. 2015. Vol. 8, iss.10. Pp. 2554-2559.
10. Борсук О.С., Масная Н.В., Шерстобоев Е.Ю. Сравнительная характеристика влияния полифенольных и полисахаридных соединений, выделенных из растений Сибири и Дальнего востока, на систему иммунитета // *Российский аллергологический журнал*. 2011. №4, вып. 1. С. 60–61.
11. Olszewska M.A., Presler A., Michel P. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Dry Extracts from the Selected *Sorbus* Species // *Molecules*. 2012. N17. Pp. 3093–3113.
12. Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Функции и свойства антоцианов растительного сырья // *Труды БГУ*. 2010. №2. С. 30–45.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т. 2. ОФС 1.5.3.0008.15 Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [Электронный ресурс]: база данных. Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#5/z
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том 3. ФС 2.5.0015.15 Зверобоя трава [Электронный ресурс]: база данных. Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#5/z
15. Коломиец Н.Э., Калинкина Г.И., Сапронова Н.Н. Стандартизация листьев крапивы двудомной // *Фармация*. 2011. №6. С. 22–24.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т. 2. ОФС 1.5.3.0006.15 Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [Электронный ресурс]: база данных. Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#5/z
17. Писарев Д.И., Новиков О.О., Сорокопудов В.Н. Химическое изучение биологически активных полифенолов некоторых сортов рябины обыкновенной – *Sorbus Aucuparia* // *Научные ведомости*. 2010. №22 (93), вып. 12/2. С. 123–128.
18. *The Flavonoids: Advances in Research* / Eds J.V.Harborne and T.J.Mabry. London; New York, 1982. 744 p.

Поступило в редакцию 26 января 2017 г.

После переработки 18 марта 2017 г.

*Isaykina N.V.*¹, *Kolomiets N.E.*^{1*}, *Abramets N.Y.*¹, *Bondarchuk R.A.*² STUDY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THE EXTRACTS OF BERRIES OF *SORBUS AUCUPARIA*

¹*Siberian State Medical University, Moskovskii trakt st., 2, Tomsk, 634004 (Russia), e-mail: borkol47@mail.ru*

²*Kirov Medical University, Kirov, K. Marksa, 112, 610027 (Russia)*

The report presents the results of the study of phenolic complex of water, 40 and 95% acidified aqueous-ethanolic extracts of berries of mountain ash (*Sorbus aucuparia* L., family *Rosaceae*). The berries of mountain ash were collected by the authors in the natural habitats of the species in late August – early September 2014 in the territory of the Tomsk district Tomsk region; Angara district of the Irkutsk region, as well as the samples of raw materials of «Krasnogorskleskredstva». Prepared from rowan fruit hydroalcoholic extracts which are then separated into fractions using butanol, ethyl acetate, chloroform. Investigated crude fraction and fraction purified by column chromatography. The studies was conducted using chromatography on paper (PC), a thin layer of adsorbent (TLC), HPLC, HPLC-MS. HPLC was conducted on a chromatograph «Dionex Ultimate 3000» with UV - detector in the wavelength range from 254 to 330 nm. Separation was performed by a column with reversed-phase sorbent «Restek Pinnacle IIC18» (150×4,6 mm, particle size 5 μm), flow rate of mobile phase is 1 ml/min; temperature is 20 °C, mobile phase (50 ml of acetonitrile, 50 ml of 0,1% trifluoroacetic acid). HPLC-MS conducted on a chromatograph «Agilent Technologies 1100 Series LS / MSD» with UV - and mass selective detector. The stationary phase was a column with reversed phase «Zorbax XDB-C8 Rx-C18» (150×4,6 mm, particle size 5 μm, pore size 80 Å), 2.3% of HCOOH-MeOH (gradient 40 to 90% methanol with 5 to 10 minute) flow rate of mobile phase 1 ml/min.

Using methods of PC, TLC HPL, HPLC-MS by comparison with authentic substances were identified: cyanidin chloride, rutin, quercetin, isoquercitrin, baicalin, baicalein, apigenin, kaempferol, skutellarin, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid and salicylic acid. In the berries of *Sorbus aucuparia* baicalin and scutellarin

* Corresponding author.

identified for the first time. The results obtained allowed us to substantiate the choice of flavonoids and anthocyanins for the procedure of standardization of raw material and to enable methods of their determination in the project pharmacopoeia monograph on the berries of *Sorbus aucuparia*.

Keywords: *Sorbus aucuparia* L., phenolic compounds, anthocyanins, flavonoids, phenolic acids, baicalin, baicalein standardization, PC, TLC, HPLC, HPLC-MS.

References

1. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e*. [State Pharmacopoeia of the USSR. Issue 2. General methods of analysis. Medicinal plant raw materials]. 11 ed. Moscow, 1989, 400 p. (in Russ.).
2. Pisarev D.I., Novikov O.O., Sokoropudov V.N. et al. *Nauchnye vedomosti BGU. Ser. Meditsina. Farmatsiia*, 2010, no. 12-2 (22), pp. 123–128. (in Russ.).
3. Galimova D.F., Latypova G.M. *Izvestiia Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2011, vol. 13, no. 5(3), pp. 33–35. (in Russ.).
4. Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sprygina V.G., Drugova E.S., Momot T.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2015, no. 2, pp. 161–168. (in Russ.).
5. Vinnitskaia V.F. *Adaptivnyi assortiment riabiny obyknovvennoi dlia proizvodstva lechebno-profilakticheskikh pishchevykh produktov: avtoref. dis. ... kand. s.-kh. nauk*. [Adaptive assortment of mountain ash ordinary for the production of therapeutic and prophylactic food products: the author's abstract of the dissertation is the candidate of agricultural sciences]. Michurinsk, 2003, 34 p. (in Russ.).
6. Olszewska M.A., Nowak S., Michel P., Banaszczak P., Kicel A. *Molecules*, 2010, no. 15, pp. 8769–8783. (in Russ.).
7. Isaikina N.V., Kalinkina G.I., Andreeva V.Iu., Sherstoboev E.Iu., Masnaia N.V., Shilova A.B. *Farmatsiia*, 2015, no. 1, pp. 19–22. (in Russ.).
8. *Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv*. [State register of medicines]: database. [Electronic resource]. URL: <https://www.grls.rosminzdrav.ru>. (in Russ.).
9. Becerra-Herrera M., Lazzoi M. R., Sayago A., Beltrán R., Del Sole R., Vasapollo G. *Food Anal. Methods.*, 2015, vol. 8, iss.10, pp. 2554–2559.
10. Borsuk O.S., Masnaia N.V., Sherstoboev E.Iu. *Rossiiskii allergologicheskii zhurnal*, 2011, no. 4, issue 1, pp. 60–61. (in Russ.).
11. Olszewska M.A., Presler A., Michel P. *Molecules*, 2012, no. 17, pp. 3093–3113.
12. Makarevich A.M., Shutova A.G., Spiridovich E.V., Reshetnikov V.N. *Trudy BGU*, 2010, no. 2, pp. 30–45. (in Russ.).
13. *Gosudarstvennaia farmakopeia Rossiiskoi Federatsii XIII izdanie. T. 2. OFS 1.5.3.0008.15 Opredelenie sodержaniia dubil'nykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition. Vol. 2. OFS 1.5.3.0008.15 Determination of the content of tannins in medicinal plant raw materials and medicinal herbal preparations.]: database. [Electronic resource]. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#5/z (in Russ.).
14. *Gosudarstvennaia farmakopeia Rossiiskoi Federatsii XIII izdanie. Tom 3. FS 2.5.0015.15 Zveroboia trava*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition. Volume 3. FS 2.5.0015.15 Wilderness of the grass]: database. [Electronic resource]. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#5/z (in Russ.).
15. Kolomiets N.E., Kalinkina G.I., Sapronova N.N. *Farmatsiia*, 2011, no. №6, pp. 22–24. (in Russ.).
16. *Gosudarstvennaia farmakopeia Rossiiskoi Federatsii XIII izdanie. T. 2. OFS 1.5.3.0006.15 Opredelenie sodержaniia ekstraktivnykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition. Volume 2. OFS 1.5.3.0006.15 Determination of the content of extractive substances in medicinal plant raw materials and herbal preparations]: database. [Electronic resource]. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#5/z (in Russ.).
17. Pisarev D.I., Novikov O.O., Sorokopudov V.N. *Nauchnye vedomosti*, 2010, no. 22(93), issue 12/2, pp. 123–128. (in Russ.).
18. *The Flavonoids: Advances in Research* / Eds J.B. Harborne and T.J. Mabry. London; New York, 1982. 744 p.

Received January 26, 2017

Revised March 18, 2017

