

УДК 615.322:582.099:543.544

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАВЫ АЛЬФРЕДИИ ПОНИКШЕЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ

© А.А. Бакибаев¹, Р.Н. Мустафин^{1*}, А.В. Пустовойтов¹, Е.В. Дорожко¹, А.Ю. Тамурко¹,
Е.В. Петрова¹, В.П. Амельченко²

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
пр. Ленина, 30, Томск, 634050, (Россия), e-mail: rustamustaf@sibmail.com

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Сибирский ботанический сад, пр. Ленина, 36, Томск, 634050 (Россия)

Целью работы является фитохимический анализ травы альфредии поникшей на присутствующие в растении флавоноиды, с использованием метода ВЭЖХ и УФ-спектроскопии. Сравнение хроматограмм и УФ-спектров компонентов спиртового извлечения и стандартных образцов рутина и кверцетина показало, что метод ВЭЖХ может быть использован для определения подлинности травы альфредии поникшей по флавоноидному компоненту (ругину). Методика идентификации и установленные параметры могут быть включены в комплекс нормативов для травы альфредии как один из идентификационных тестов.

Ключевые слова: альфредии поникшей трава, флавоноиды, ВЭЖХ, УФ-спектроскопия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» Министерства образования и науки ГК №14.В37.21.0566.

Введение

Ранее были определены фармакогностические показатели сырья для травы альфредии поникшей (*Alfredia cernua* (L.) Cass, семейство *Asteraceae*) и разработан проект ФС «Альфредии поникшей трава» [1].

Бакибаев Абдигали Абдиманопович – заведующий кафедрой физической и аналитической химии, доктор химических наук, профессор, e-mail: bakibaev@mail.ru

Мустафин Рустам Ниязович – аспирант кафедры физической и аналитической химии, e-mail: rustamustaf@sibmail.com

Пустовойтов Андрей Владимирович – инженер кафедры физической и аналитической химии, e-mail: andrius_222@mail.ru

Дорожко Елена Владимировна – ассистент кафедры физической и аналитической химии, кандидат химических наук, elena-dorozhko.@yandex.ru

Тамурко Анастасия Юрьевна – магистрант кафедры физической и аналитической химии, e-mail: tamurko_a@sibmail.com

Петрова Екатерина Викторовна – аспирант кафедры физической и аналитической химии, evr_89@mail.ru

Амельченко Валентина Павловна – заведующий лабораторией биоморфологии и цитогенетики редких и исчезающих растений, кандидат биологических наук, e-mail: vamel@sibmail.com

7].

В качестве метода для качественного обнаружения флавоноидов в траве альфредии использовали хроматографию в тонком слое силикагеля (ТСХ). Наряду с такими достоинствами, как доступность и простота выполнения, метод ТСХ имеет существенные недостатки, как, например, малая производительность и использование токсичных и летучих веществ в качестве растворителя. Поэтому сейчас широко распространены и актуальны методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), превосходящие по экспрессности и надежности ТСХ.

Целью работы явился фитохимический анализ травы альфредии поникшей на присутствие в аналитическом образце растении флавоноидов с использованием метода ВЭЖХ; флавоноиды выбраны как вещества с наиболее широким спектром активности из биологически активных компонентов растения [2–

* Автор, с которым следует вести переписку.

Экспериментальная часть

В работе использовали надземную часть альфредии поникшей, собранной на экспериментальном участке Сибирского ботанического сада при Томском государственном университете в июле 2012 г. Высушенное воздушным способом сырье измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 0,63 мм.

Аналитическую пробу получали экстрагированием измельченного сырья 95% этанолом в течение 60 мин. В качестве стандартов при хроматографическом определении использовали стандартные образцы веществ-свидетелей (СОВС) рутина и кверцетина.

Исследование сводилось к разработке способа идентификации травы альфредии поникшей с использованием ВЭЖХ и УФ-спектроскопии. С этой целью применяли двухканальный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» со спектрофотометрическим детектором (190–360 нм) и программным обеспечением «Мультихром» АО «Амперсенд». Сорбент – ProntoSIL 120-5-C18 AQ с размером частиц 5 мкм; колонка размером 15×2 мм.

Обсуждение результатов

Первоочередной задачей для достижения поставленной цели являлось определение условий хроматографического разделения этанольного извлечения альфредии поникшей на компоненты. Природу их можно установить с помощью различных физико-химических методов: ИК-Фурье, ЯМР ^{13}C , ^1H , масс-спектрометрии и др. [8–13], среди которых метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием и регистрацией спектров в остановленном потоке является предпочтительным ввиду широкой распространенности, высокой чувствительности УФ-детекторов к различным соединениям, стабильности, нечувствительности к изменению температуры и скорости потока, широким линейным диапазоном и пределом обнаружения в несколько наногرامмов [14].

Для решения указанной задачи экстракт альфредии на 95% этаноле подвергли обращеннофазному разделению на хроматографе в различных вариантах. Выбор остановили на следующих параметрах: компоненты подвижной фазы – 3,5% уксусная кислота (канал А) и ацетонитрил (MeCN, канал Б). Программа градиента подвижной фазы: 0–3 мин – 0% MeCN; 3 мин – 15% MeCN; 25 мин – 25% MeCN; 25 мин – 70%; 42 мин – 100% MeCN; расход элюента – 100 мкл/мин; длина волны – 350 нм; температура колонки – 35 °С; объем вводимой пробы – 5 мкл.

При выбранных условиях достигали достаточно полного разделения на компоненты.

Методику определения подлинности травы альфредии с помощью ВЭЖХ выполняли следующим образом: около 0,5 г измельченной и просеянной травы альфредии поникшей помещали в стеклянный флакон на 10 мл, заливали 10 мл 95% этилового спирта, закрывали флакон капроновой крышкой и оставляли на 1 ч в темном месте при комнатной температуре. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в приемник (стеклянный флакон). На выходе получили 6 мл аналитической пробы (потеря объема за счет поглощения экстрагента сырьем).

После этого микровиалу с извлечением помещали в автосамплер хроматографа. Градиентное разделение осуществляли по программе, представленной в таблице 1, и вышеуказанных параметрах хроматографической системы.

В ходе хроматографирования извлечения были получены данные о времени удерживания пиков компонентов.

Таблица 1. Программа градиента состава подвижной фазы

Шаг	Время, мин	Б (MeCN), %
0	0	0
1	3	0
2	3	15
3	25	25
4	25	60
5	33	80

Далее повторно хроматографировали такую же аликвоту извлечения, регистрируя УФ-спектры вблизи апексов пиков компонентов в диапазоне 190–360 нм. В результате получили УФ-спектры 12 соединений.

Сравнивая спектры компонентов извлечения с литературными данными [15], мы пришли к выводу, что спектры двух соединений могут принадлежать ароматическим гидрокси- или метоксилированным спиртами кислотам. Некоторые

другие компоненты с большей вероятностью могли относиться к соединениям группы флавоноидов.

Однако для стандартизации необходима более точная идентификация. Поэтому в целях конкретизации решения задачи провели сравнение хроматограмм и УФ-спектров аналитической пробы и СОВС рутина и кверцетина. СОВС хроматографировали при тех же условиях, что и аналитическую пробу. Результаты представлены на рисунках 1, 2.

На хроматограмме (рис. 1) видно, что пики СОВС рутина и аналитической пробы имеют одинаковое время удерживания $t_R = 14,5-14,6$.

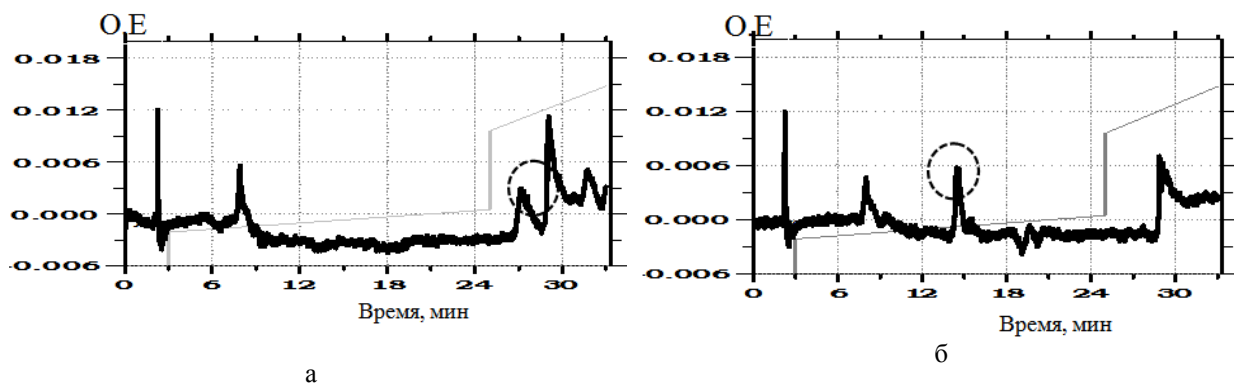


Рис. 1. Хроматограммы аналитической пробы травы альфредии поникшей и стандартных образцов веществ-свидетелей. По оси абсцисс – время хроматографирования, мин, по оси ординат – оптическая плотность, ОЕ;

а) СОВС кверцетина; б) СОВС рутина; в) спиртовое извлечение из альфредии поникшей

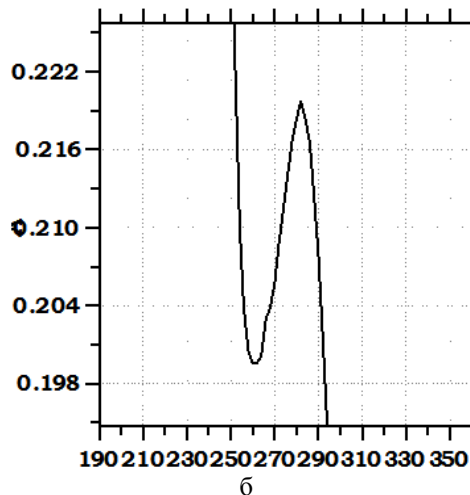
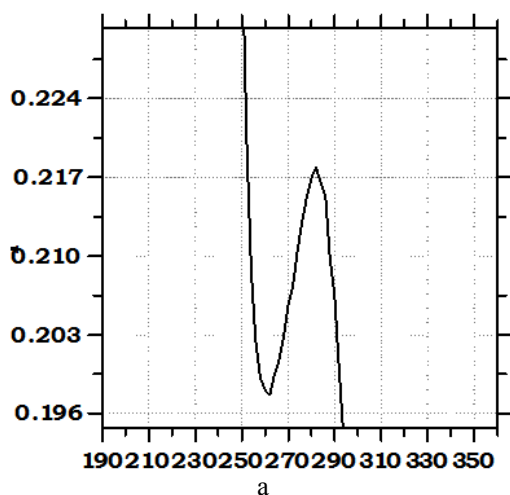
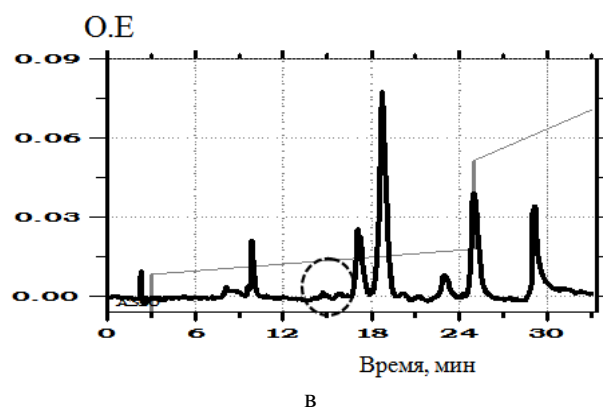


Рис. 2. УФ-спектры пиков удерживания при $t_R = 14,5$ СОВС рутина и аналитической пробы. По оси абсцисс – длина волны, нм, по оси ординат – интенсивность поглощения; а – СОВС Рутин, $R_t = 14,5$, $\lambda_m = 282$ нм; б – спиртовое извлечение, $R_t = 14,5$, $\lambda_m = 282$ нм

УФ-спектры СОВС рутина и пика, предположительно соответствующего ему на хроматограмме аналитической пробы, имеют при длине волны 282 нм практически идентичную интенсивность поглощения ($\epsilon_{\max}=218-220$). Полуширина полос поглощения СОВС и пробы ($\delta=8,3$ нм), а также соотношение между длинами волн при ϵ_{\max} и ϵ_{\min} тоже были тождественны. Следовательно, выделенный на рисунке 1в пик может принадлежать рутину. Поиск соответствия с хроматограммой кверцетина не дал положительного результата: заметного пика на хроматограмме извлечения не наблюдали. Это связано с двумя причинами. Во-первых, кверцетин в растении находится преимущественно в связанном состоянии – в виде гликозидов. Вторым фактором является малая навеска образца. Поэтому свободного кверцетина в аналитической навеске образца оказалось недостаточно для обнаружения.

Выводы

Таким образом, метод ВЭЖХ с УФ-детекцией может быть использован в фитохимическом анализе травы альфредии поникшей для установления подлинности (идентификации и обнаружения фальсификации) по флавоноидному компоненту (рутину). Данный параметр может быть включен в комплекс нормативов, применяемых для идентификации травы альфредии и использоваться вкуче с прочими тестами.

Показателями, используемыми для и идентификации, являются:

- 1) время удерживания соединения на хроматограмме при заданных условиях = 14,5–14,6 мин;
- 2) соотношение интенсивности поглощения при длинах волн $\epsilon_{\max}=282$ нм, $\epsilon_{\min}=262$ нм;

Параметры хроматографической системы:

- а) система растворителей – 3,5% уксусная кислота – ацетонитрил;
- б) температура системы – 35 °С, расход элюента – 100 мкл/мин;
- в) программа градиента смены компонентов элюента:

Т, мин	0	3	3	25	25	33
% ацетонитрила	0	0	15	25	60	80

При этом, вероятно, нет необходимости в полном получасовом снятии хроматограммы, так как интересующие нас вещество-идентификатор удерживается в первые 15 мин.

Список литературы

1. Кувачева Н.В. Фармакогностическая характеристика альфредии поникшей (*Alfredia cernua* (L.) Cass) и разработка на её основе лекарственного средства: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пенза, 2010. 25 с.
2. Coneac G., Gafițanu E., Hădărugă D.I., Hădărugă N.G., Pînzaru I.A., Bandur G., Ursica L., Păunescu V., Gruia A. Flavonoid contents of propolis from the west side of Romania and correlation with the antioxidant activity // Chemical bulletin of «politechnica» university of Timisoara. 2008. Vol. 53(67), N1-2. Pp. 56–60.
3. Meiers S., Kemeny M., Weyand U., Gastpar R., Von Angerer E., Marko D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor // Journal of agricultural and food chemistry. 2001. Vol. 49 (2). Pp. 958–962.
4. Shaik Y.B., Castellani M.L., Perrella A., Conti F., Salini V., Tete S., Madhappan B., Vecchiet J., De Lutiis M.A., Caraffa A., Cerulli G. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation // Journal of biological regulators & homeostatic agents. 2006. Vol. 20(3-4). Pp. 47–52.
5. Steinmetz K.A., Potter J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review // Journal of the american dietetic association. 1996. Vol. 96 (10). Pp. 1027–1039.
6. Williams R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? // Free radical biology and medicine. 2004. Vol. 36 (7). Pp. 838–849.
7. Shmidt-Shillig S., Schaffer S., Weber C.C., Eckert G.P., Muller W.E. Flavonoids and the aging brain // Journal of physiology pharmacology. 2005. Vol. 56, suppl. 1. Pp. 23–36.
8. Moço S.I. Metabolomics Technologies applied to the identification of compounds in plants. PhD thesis. Wageningen, 2007. 222 p.
9. Zhaolin L., Dong J., Zhang B. Rapid identification and detection of flavonoid compounds from bamboo leaves by LC-(ESI)-IT-TOF/MS // Bioresources. 2011. №7(2). Pp. 1405–1418.
10. Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C. Flavonoid composition of citrus juices // Molecules. 2007. N12. Pp. 1641–1673.
11. Gratzfeld-Husgen A., Schuster R. HPLC for food analysis: Primer. Germany, 2001. 134 p.
12. Rajendran A. Isolation, characterization, pharmacological and corrosion inhibition studies of flavonoids obtained from nerium oleander and tecoma stans // International Journal of PharmTech Research. 2011. Vol. 3, N2. Pp 1005–1013.
13. Meena M.C., Patni V. Isolation and identification of flavonoid «quercetin» from citrullus colocynthis (Linn.) Schrad. // Asian Journal of Experimental Sciences. 2008. Vol. 22, N1. Pp. 137–142.

14. Краснов Е.А., Блиникова А.А. Современные хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ) в фармацевтическом анализе: Учебное пособие. Томск, 2007. 152 с.
15. Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г. Изучение состава и антиоксидантной активности растительных экстрактов методом ВЭЖХ с УФ- и амперометрическим детектированием // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42, №9. С. 43–48.

Поступило в редакцию 12 марта 2013 г.

После переработки 14 марта 2014 г.

Bakibaev A.A.¹, Mustafin R.N.^{1*}, Pustovoytov A.V.¹, Dorozhko E.V.¹, Tamurko A.Yu.¹, Petrova E.V.¹, Amelchenko V.P.²
PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF HERB ALFREDIA CERNUA BY HPLC

¹National Research Tomsk Polytechnic University, Lenina av., 30, Tomsk, 634050, (Russia),
e-mail: rustamustaf@sibmail.com

²National Research Tomsk Polytechnic University, Siberian Botanical Garden, Lenina av., 36, Tomsk, 634050, (Russia)

The objective work is phytochemical analysis of herb *Alfredia cernua* by flavonoids, which are present in the plant, using HPLC. Comparison of chromatograms and UV-spectra of the herb's ethanolic extract and standard samples of rutin and quercetin shows that HPLC method with UV detection can be used in phytochemical analysis for authentication of herb *Alfredia cernua* by rutin. This parameter may be included in the complex regulations for herb *Alfredia cernua* and used for identification.

Keywords: herb *Alfredia cernua*, flavonoids, HPLC, UV-detection.

References

1. Kuvacheva N.V. *Farmakognosticheskaia kharakteristika al'fredii ponikshei (Alfredia cernua (L.) Cass) i razrabotka na ee osnove lekarstvennogo sredstva: avtoref. dis. ... kand. farm. nauk.* [Farmakognostichesky characteristic Alfredia cernua (L.) Cass) and development on its basis the drug: the dissertation of Pharmaceutical Sciences.] Pyatigorsk, 2010, 25 p. (in Russ.).
2. Coneac G., Gafițanu E., Hădăruță D.I., Hădăruță N.G., Pînzaru I.A., Bandur G., Ursica L., Păunescu V., Gruia A. *Chemical bulletin of «politechnica» university of Timisoara*, 2008, vol. 53(67), no. 1-2, pp. 56–60.
3. Meiers S., Kemeny M., Weyand U., Gastpar R., Von Angerer E., Marko D. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, vol. 49 (2), pp. 958–962.
4. Shaik Y.B., Castellani M.L., Perrella A., Conti F., Salini V., Tete S., Madhappan B., Vecchiet J., De Lutiis M.A., Caraffa A., Cerulli G. *Journal of biological regulators & homeostatic agents*, 2006, vol. 20(3-4), pp. 47–52.
5. Steinmetz K.A., Potter J.D. *Journal of the american dietetic association*, 1996, vol. 96 (10), pp. 1027–1039.
6. Williams R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans C. *Free radical biology and medicine*, 2004, vol. 36 (7), pp. 838–849.
7. Shmidt-Shillig S., Schaffer S., Weber C.C., Eckert G.P., Muller W.E. *Journal of physiology pharmacology*, 2005, vol. 56, suppl. 1, pp. 23–36.
8. Moço S.I. *Metabolomics Technologies applied to the identification of compounds in plants*. PhD thesis. Wageningen, 2007. 222 p.
9. Zhaolin L., Dong J., Zhang B. *BioResources*, 2011, no. 7(2), pp. 1405–1418.
10. Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C. *Molecules*, 2007, no. 12, pp. 1641–1673.
11. Gratzfeld-Husgen A., Schuster R. *HPLC for food analysis: Primer*. Germany, 2001. 134 p.
12. Rajendran A. *International Journal of PharmTech Research*, 2011, vol. 3, no. 2, pp 1005–1013.
13. Meena M.C., Patni V. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 2008, vol. 22, no. 1, pp. 137–142.
14. Krasnov E.A., Blinnikova A.A. *Sovremennye khromatograficheskie metody (GZhKh, VEZhKh) v farmatsevticheskom analize*. [Modern chromatography techniques (GLC, HPLC) analysis in the pharmaceutical]. Tomsk, 2007, 152 p. (in Russ.).
15. Semenistaia E.N., Larionov O.G. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurna*, 2008, vol. 42, no. 9, pp. 43–48. (in Russ.).

Received March 12, 2013

Revised March 14, 2014

* Corresponding author.

