

УДК 543.42:615.074:547.97:547.972:582.951.6

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОМПОЗИЦИИ ИЗ ЦВЕТКОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (*HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) MOENCH.)

© В.С. Гринёв¹, А.А. Широков¹, Н.А. Наволокин^{2*}, Н.В. Полуконова², М.Н. Курчатова², Н.А. Дурнова²,
А.Б. Бучарская², Г.Н. Маслякова²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
пр. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049 (Россия), e-mail: alex@ibppm.ru

²Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского Минздрава РФ, ул. Б. Казачья, 112, Саратов, 410012
(Россия), e-mail: nik-navolokin@yandex.ru

Исследован химический состав новой биоактивной композиции бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.). Среди флавоноидов были обнаружены нарингин и его растворимый агрегат, прунин, кверцетин, апигенин и нарингенин, а также 5-О-глюкозид апигенина и изосалипурпозид. Показано, что явление существования димеров, тримеров или более сложных агрегатов, описанное в литературе ранее, имеет место в изучаемом экстракте бессмертника песчаного. При этом у них близкие спектральные, но существенно различающиеся хроматографические характеристики, что можно использовать при их идентификации, имея соответствующие данные о гликозилированных по разным положениям и/или различными по сложности углеводами флавоноидах, которые также характеризуются близкими спектрами поглощения и различными временами удерживания. Методом молекулярной абсорбционной спектроскопии установлено, что исследуемый экстракт содержит 73,48 мг флавоноидов в пересчете на рутин или 17,94 мг в пересчете на кверцетин на 1 г сухой массы экстракта, что составляет 20,99 и 5,13% соответственно. Экстракт бессмертника, полученный предлагаемым способом, обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемой саркомы 45 и благоприятно влияет на организм животных в целом.

Ключевые слова: цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.), химический состав, флавоноиды, ВЭЖХ.

Введение

Флавоноиды – группа полифенольных соединений, обладающих широким спектром фармакологического (антимикробного, желчегонного и гепатопротекторного и другого) действия [1, 2]. Одним из перспективных источников флавоноидов является растительное сырье, полученное из лекарственных растений, в частности, цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.), многолетнего травянистого растения семейства Asteraceae [3–7]. В настоящее время цветки бессмертника используются в медицине как спазмолитическое, желчегонное, бактерицидное и противовоспалительное средство. Экстракт бессмертника обладает желчегонным и гепатопротекторным действием [7]. Указанные свойства экстракта бессмертника связывают с наличием в нем полифенольных соединений, в частности, флавоноидов,

Гринёв Вячеслав Сергеевич – научный сотрудник,
кандидат химических наук, e-mail: alex@ibppm.ru

Широков Александр Александрович – руководитель
центра коллективного пользования, кандидат
биологических наук, e-mail: alex@ibppm.ru

Наволокин Никита Александрович – аспирант кафедры
патологической анатомии, научный сотрудник
лаборатории клеточных биотехнологий,
e-mail: nik-navolokin@yandex.ru

общее содержание которых в соцветиях варьирует в пределах $6,18 \pm 0,43$ и $6,46 \pm 0,65\%$ в зависимости от места обитания исследованных ценопопуляций *H. arenarium* [8]. Установлено, что в экстрактах цветков бессмертника песчаного содержатся как гликозилированные, так и негликозилированные флавоноиды, при этом вопрос относительно доминирующего флавоноида остается открытым [9–12].

Окончание на с. 178

* Автор, с которым следует вести переписку.

Различные способы экстракции, применяемые к одному и тому же растительному сырью, могут приводить к получению биологически активных композиций (БАК) с разными химическим составом и свойствами [13]. Ранее было показано, что метод извлечения биологически активных веществ с помощью 96%-ного этилового спирта с последующим упариванием при температуре до 55–60 °С и растворением экстракта в воде, а также дополнительной очисткой от гидрофобных компонентов смеси (хлорофилла, эфирных масел и дубильных веществ) хлороформом [14], с одной стороны, повышает биологическую активность водных растворов сухих экстрактов, а с другой – значительно снижает их токсичность [15–18]. Увеличение биологической активности экстрактов, полученных таким способом на примере аврана лекарственного [17, 18], связывают с увеличением выхода флавоноидов, поэтому представляется актуальным получение описанным способом экстрактов и из других лекарственных растений и исследование их биологической активности, в первую очередь – из цветков бессмертника песчаного. Уже установлено, что экстракт бессмертника, полученный описанным в данной статье способом, обладает противоопухолевой активностью в отношении переносимой саркомы 45 и благоприятно влияет на организм животных в целом [18].

Цель исследования – провести анализ компонентов новой биологически активной композиции из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.) методами электронной спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Экспериментальная часть

Сбор материала. Материалом служило сырье бессмертника песчаного (цветки), собранное в Лысогорском районе Саратовской области в окрестностях с. Атаевка в июле 2013 г. Высушенные листья и цветки бессмертника песчаного предварительно измельчали для более полной экстракции.

Экстракция. Навеску 10 г измельченного сухого материала помещали в круглодонную колбу, добавляли 100 мл 96%-ного этилового спирта и кипятили на водяной бане 15 мин. Спиртовой экстракт упаривали досуха в термостате при температуре не выше 55–60 °С. К упаренному экстракту добавляли 8 мл (4/5 части от общего объема) теплой дистиллированной воды (40–50 °С), тщательно перемешивали, затем прибавляли 2 мл хлороформа (1/5 части от общего объема), встряхивали до образования однородной эмульсии, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали со скоростью 1500 об./мин для получения наиболее полного разделения на водную фракцию целевых продуктов и хлороформную фракцию, содержащую неполярные примеси. Водную фракцию отделяли, снова высушивали в чашке Петри, что позволило получить сухой остаток целевых продуктов и в дальнейшем рассчитывать точную дозировку для экспериментов *in vitro* и *in vivo*, а также длительно хранить экстракт.

Абсорбционная дифференциальная спектрофотометрия. Исследования проводили на спектрофотометре UV-1700 («Shimadzu», Япония) в Центре коллективного пользования на базе Института химии СГУ им. Н.Г. Чернышевского (ЦКП Института химии СГУ, Саратов). Для измерений использовали кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см. Для построения градуировочных зависимостей готовили рабочие растворы комплексов кверцетина и рутина с 5%-ным раствором хлорида алюминия в 96%-ном этиловом спирте из растворов флавоноидов с концентрацией 1 мг/мл. Отбирали соответствующее количество раствора, приливали 1 мл 5%-ного $AlCl_3$ и доводили до объема 5 мл этанолом. Через 30 мин измеряли

спектры поглощения растворов на спектрофотометре в диапазоне 250–600 нм. Раствор сравнения – 5%-ный хлорид алюминия в 96%-ном этаноле.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для анализа экстрактов полифенольных соединений использовалась ВЭЖХ система Dionex Ultimate 3000 («Thermo Scientific», США), оснащенная колонкой Luna 5u C18(2), 150 × 4,60 мм («Phenomenex», США) и диодно-матричным детектором. ВЭЖХ анализ проводился в Центре коллективного пользования (ЦКП) научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Федерального государст-

Полуконова Наталья Владимировна – профессор кафедры общей биологии фармакогнозии и ботаники, профессор, доктор биологических наук, e-mail: polukonovanv@yandex.ru

Курчатова Мария Николаевна – аспирант кафедры общей биологии фармакогнозии и ботаники, e-mail: kurchatova.marya@yandex.ru

Дурнова Наталья Анатольевна – заведующая кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники, профессор, доктор биологических наук, e-mail: ndurnova@mail.ru

Бучарская Алла Борисовна – руководитель Центра коллективного пользования, e-mail: allaalla_72@mail.ru

Маслякова Галина Никифоровна – заведующая кафедрой патологической анатомии, доктор медицинских наук, профессор, e-mail: allaalla_72@mail.ru

венного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

Высушенный экстракт растворяли в 0,5 мл смеси (1 : 1) ацетонитрила и воды квалификации MilliQ с добавлением раствора 50%-ного H_3PO_4 (до pH 2,5). Экстракты хроматографировали в условиях градиентного элюирования: состав подвижной фазы (компонент А – 100% MeCN, компонент В – вода квалификации MilliQ с добавлением раствора 50%-ного H_3PO_4 до pH 2,5) изменялся следующим образом: 0–10 мин – 15% А, 85% В; 10–19 мин – 15→70% А, 85→30% В; 19–20 мин – 70% А, 30% В; 20–22 мин – 70→15% А, 30→85% В; 22–25 мин – 15% А, 85% В.

Скорость потока – 1 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; температура термостата колонки – 30 °С. Детектирование осуществлялось в интервале длин волн 200–600 нм, интегрирование – на длине волны 342 нм.

С помощью ВЭЖХ были получены хроматограммы, а также спектры поглощения в УФ и видимой области каждого из компонентов смеси.

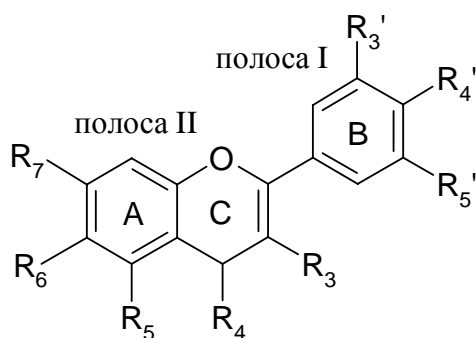
В качестве стандартных образцов флавоноидов использовали рутин в виде гидрата ($\geq 94\%$, «Sigma-Aldrich», США), кверцетин в виде дигидрата (97%, «Alfa Aesar», Великобритания), нарингин ($\geq 95\%$, «Sigma-Aldrich», США), апигенин ($\geq 97\%$, «Sigma-Aldrich», США), нарингенин ($\geq 95\%$, «Sigma-Aldrich», США), а также прунин, полученный в результате частичного кислотного гидролиза нарингина.

Результаты и обсуждение

Для экстракции цветков бессмертника песчаного *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. был использован разработанный нами способ, обеспечивающий высокий выход флавоноидов, что было показано на примере аврана лекарственного. Данный способ позволяет помимо повышения выхода флавоноидов также снизить токсичность экстракта для экспериментов *in vitro* и *in vivo* [17, 18]. Более высокое содержание спирта в экстрагенте по сравнению с применяемыми ранее методиками позволяет, кроме прочего, уменьшить температуру при экстракции.

Поскольку растительное сырье содержит помимо водорастворимых также гидрофобные компоненты смеси (например, хлорофилл, эфирные масла и дубильные вещества), для их извлечения применялась дополнительная стадия экстракции хлороформом.

Полифенольные соединения в экстрактах цветков бессмертника песчаного представлены как гликозилированными (изосалипурпозид, салипурпозид, существующий в виде двух изомеров А и В хелихризин, – прунин и 5-О-глюкозид апигенина), так и негликозилированными формами (агликоны) флавоноидов (апигенин, кемпферол и нарингенин). Известно, что гликозиды флавоноидов лучше извлекаются 70–80%-ным этанолом, в то время как агликоны – 90–96%-ным. При обработке водной фракции хлороформом с последующим отделением органического слоя следует ожидать некоторого снижения содержания агликонов. Однако, как было показано нами сравнением хроматограмм экстрактов, полученных разными способами – включающим обработку хлороформом и без таковой, – полного извлечения негликозилированных флавоноидов хлороформом добиться в предложенных нами условиях нельзя. Более того, количество апигенина после обработки хлороформом осталось прежним.



R = H, OH, OMe, OGlyc,

Известно, что фенольные соединения способны образовывать характерно окрашенные комплексы с хлоридами железа и алюминия. При взаимодействии фенольных соединений с хлоридом алюминия изменяется положение максимума поглощения в электронном спектре. Поскольку для реакции достаточно одной фенольной гидроксильной группы (известная качественная реакция на фенольный гидроксил с хлоридом железа (III)), состав получаемых комплексов может быть достаточно сложен, так как при координации могут быть задействованы как одна гидроксильная группа молекулы флавоноида, так и две, в случае их благоприятного стерического расположения. Кроме

того, флавоноиды, имеющие карбонильный фрагмент в кольце С, также могут его задействовать при координации [20, 21]. Данная реакция активно применяется при спектрофотометрическом суммарном определении полифенольных соединений в растительных экстрактах.

Метод молекулярной абсорбционной дифференциальной спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра позволяет определять суммарное содержание флавоноидов в исследуемых объектах [22, 23]. Однако следует помнить и об ограничениях данного метода. Они связаны, прежде всего, с невозможностью выбрать «универсальный» стандарт, который бы имел такое же точно поглощение, как и исследуемый растительный экстракт. Поскольку последний содержит, как правило, несколько флавоноидов различных классов – халконы, флавоны, флавонолы и т.д., – которые имеют отличные положения максимумов в спектре, а также их интенсивности (определяемые структурой молекул, в частности, наличием тех или иных цепей сопряжения, заместителей), суперпозиция спектров поглощения этих соединений дает в итоге сложную картину. Частично снять это ограничение может применение такого стандарта для построения калибровочной кривой, который бы соответствовал по структуре наиболее представительному по своему поглощению при данной длине волны (которое не обязательно коррелирует с его массовым содержанием) флавоноиду или классу флавоноидов для отдельно взятого растительного экстракта. Но и в этом случае к получаемым значениям следует относиться с известной долей осторожности.

Сравнивая спектры поглощения комплексов кверцетина и его гликозилированного производного – рутина, можно отметить, что образование комплекса вызывает батохромный сдвиг более длинноволновой полосы поглощения I, отвечающей хромофору кольца В. Можно также отметить, что негликозилированный кверцетин при одинаковой концентрации имеет приблизительно вчетверо более интенсивное поглощение по сравнению с его гликозидом рутином при длине волны наиболее длинноволнового максимума.

Дифференциальные спектры поглощения комплексов флавоноидов рутина и изосалипурпозиды с хлоридом алюминия, согласно [24], в области ~ 370–450 нм содержат широкую полосу поглощения с максимумом у рутина 410–412 нм и салипурпозиды 418 нм соответственно. Несмотря на близость положений максимумов, интенсивность поглощения при этом у комплекса изосалипурпозиды приблизительно в 5 раз выше. К сожалению, авторы вышеуказанной работы не приводят концентрации, при которых были записаны спектры, однако если принять, что они были равны, то при использовании в качестве стандарта в суммарном определении флавоноидов экстракта бессмертника песчаного, где преобладают флавоноиды халконовой природы, следует ожидать заниженного приблизительно в 5 раз значения. В то же время, согласно нашим данным, поглощение комплекса кверцетина с хлоридом алюминия при одной и той же длине волны приблизительно в 3–4 раза выше по сравнению с аналогичным комплексом рутина.

Нами данный метод был использован для оценки суммарного содержания флавоноидов в пересчете на кверцетин и рутин. В диапазоне концентраций от 5 до 100 мкг/мл для комплекса рутина и от 3 до 25 мкг/мл для комплекса кверцетина наблюдались линейные зависимости с коэффициентами корреляции, соответственно, 0,9995 и 0,9980.

Результаты, полученные методом дифференциальной спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра, представлены на рисунках 1–3. В экстракте цветков бессмертника дифференциальным спектрофотометрическим методом – 73,48 мг флавоноидов в пересчете на рутин или 17,94 мг – в пересчете на кверцетин на 1 г сухой массы экстракта, что составляет 20,99 и 5,13% соответственно.

Поскольку растительный экстракт представляет собой сложную смесь соединений различной природы, для определения компонентного состава традиционно применяется метод ВЭЖХ с детектированием в УФ и видимой области. Использованный нами градиентный метод позволяет элюировать сначала гидрофильные компоненты (например, органические кислоты, в частности наиболее часто в растительных экстрактах присутствует галловая кислота, гликозилированные флавоноиды), а затем – более гидрофобные, к которым относятся, в частности, негликозилированные флавоноиды при относительно небольших временных затратах (общее время анализа – 25 мин). Очевидно, что с увеличением длины углеводной цепи флавоноида увеличивается его гидрофильность. Так, моногликозиды флавоноидов (флавоноиды, гликозилированные моносахаридом) более гидрофильны, чем агликоны, а дигликозиды (которые в некоторых источниках также называются дисахаридными моногликозидами), в свою очередь, более гидрофильны, чем моногликозилированные флавоноиды, так как для отдельно взятого флавоноида в указанных условиях времени удерживания для дигликозилированного, моногликозилированного флавоноида и агликона увеличивается. При этом на время удерживания влияет как строение агликона флавоноида, так и, по-видимому,

положение гликозилирования. Это хорошо видно, например, при сравнении времен удерживания кверцетина, нарингенина и их моно- и дигликозидов. Так, дигликозид кверцетина – рутин, – являющийся кверцетин-3-О-рамногликозидом, имеет время удерживания, равное 1,84 мин, а кверцетин – 16,83 мин соответственно. Менее гидрофильный по сравнению с кверцетином нарингенин, у которого имеется насыщенное кольцо С и отсутствуют заместители в положении 3, что создает, по-видимому, своего рода гидрофобный сайт в молекуле, имеет время удерживания 17,84 мин, в то время как моногликозид нарингенина – нарингенин-7-О-гликозид (прунин), – и дигликозид – нарингенин-7-О-рамногликозид (нарингин), – по времени удерживания отличаются между собой не столь значительно (15,00 и 14,80 мин соответственно). Положением гликозилирования 7 можно объяснить незначительное отличие в гидрофобности данных молекул, поскольку у всех них гидрофобный участок молекулы не экранируется гидрофильными фрагментами углеводов, как в случае 3-О-гликозидов кверцетина.

С помощью ВЭЖХ нами были обнаружены 18 основных компонентов в экстракте бессмертника песчаного (табл. 1, рис. 4). Для некоторых из них удалось сделать отнесение, в частности, компонентами 6, 7, 14, 17, 18 со временами удерживания 14,85, 15,00, 16,83, 17,76 и 17,97 мин оказались, соответственно, нарингин, прунин, кверцетин, апигенин и нарингенин. Методом добавок было доказано соответствие найденных компонентов имеющимся стандартам. УФ-спектры обнаруженных компонентов и стандартов полностью совпали. Следует отметить, что УФ-спектр компонента 5 очень близок к таковому компонента 6, нарингина, хотя имеет несколько меньшую интенсивность. Как известно [25], агрегированная форма нарингина может оставаться в растворе и имеет при этом такое же поглощение или близкое таковому молекулярной мономерной формы. Некоторое количество растворимой агрегированной формы нарингина наблюдается и в хроматограмме стандарта данного флавоноида. Таким образом, мы считаем, что компонент 5 является растворимым агрегатом нарингина.

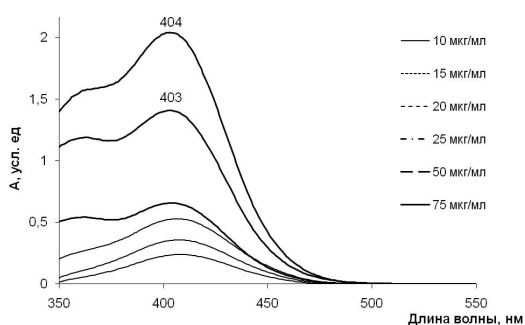


Рис. 1. Спектры поглощения в диапазоне 350–550 нм растворов комплекса рутина с хлоридом алюминия различной концентрации. Максимум поглощения комплексов – 404–406 нм. Время реакции – 30 мин

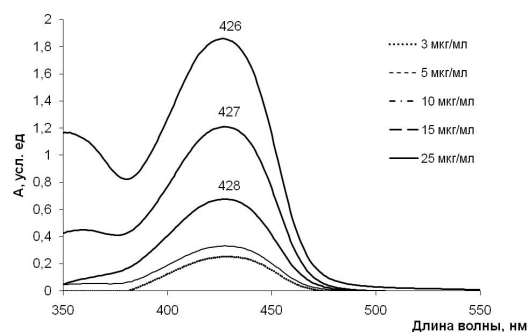
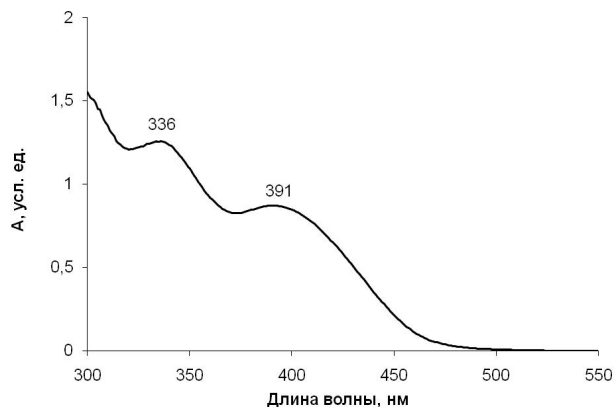
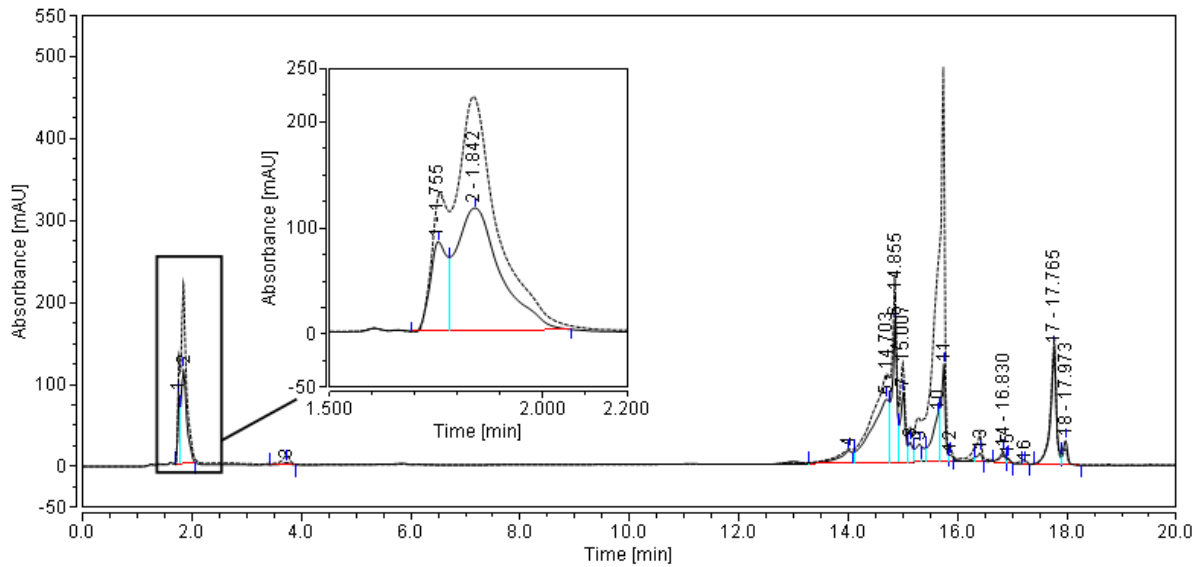


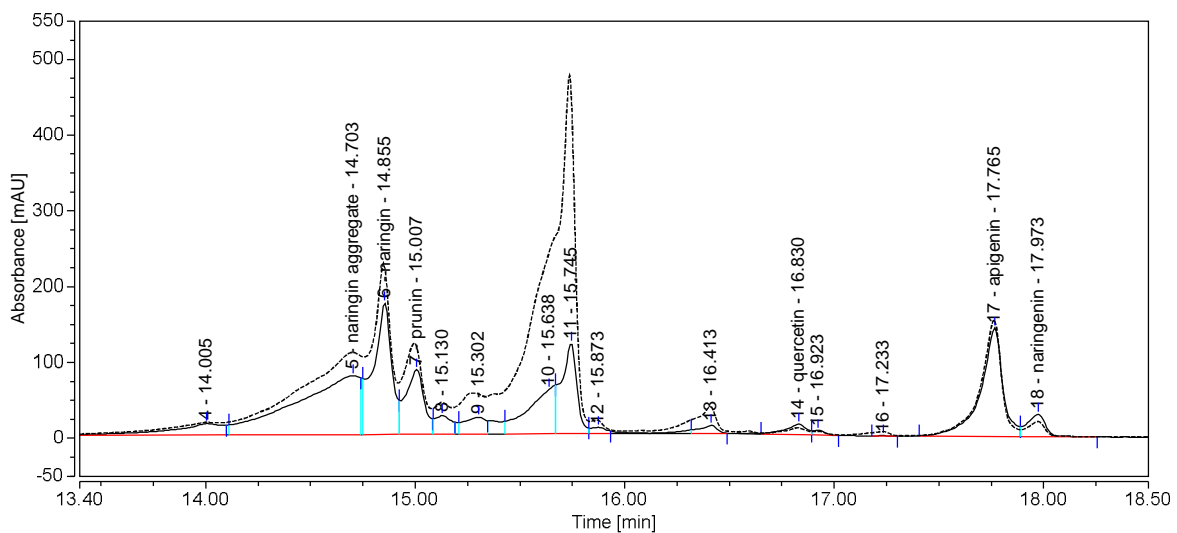
Рис. 2. Спектры поглощения в диапазоне 350–550 нм растворов комплекса кверцетина с хлоридом алюминия различной концентрации. Максимум поглощения комплексов – 426–428 нм. Время реакции – 30 мин

Рис. 3. Спектр поглощения в диапазоне 300–550 нм экстракта бессмертника, обработанного хлоридом алюминия. Максимумы поглощения комплексов – в области 336 и 391 нм. Время реакции – 30 мин





а



б

Рис. 4. Полная хроматограмма экстрактов бессмертника песчаного (а) и фрагмент хроматограммы с 13,50 по 18,50 мин (б). Сплошная линия соответствует экстракту, полученному с обработкой хлороформом, пунктирная линия – экстракту, полученному без обработки хлороформом

Время удерживания компонента 2 совпало с таковыми у стандарта рутина (1,84 мин), однако стандарт и данный компонент экстракта имеют несколько отличные по положениям максимумов поглощения УФ-спектры, что не позволяет отнести компонент 2 к рутину. Пик 1 имеет очень близкий УФ-спектр с пиком 2, но несколько меньшую интенсивность, что позволяет сделать вывод об агрегатной природе компонента 1, аналогично нарингину.

Поскольку гликозилирование практически не влияет на положение максимумов поглощения, из близости УФ-спектров компонента 8 и апигенина можно утверждать, что компонент 8 со временем удерживания 15,13 мин, по-видимому, является гликозидом апигенина предположительно 5-О-глюкозидом.

Компонент 11 характеризуется наибольшей площадью и имеет один из наиболее длинноволновых максимумов поглощения пика I (~368 нм), и согласно литературным данным, его следует отнести к изосалипурпозиду (372 нм [9]). Компонент 10, таким образом, вероятно, является агрегатом данного флавоноида, так как УФ-спектры компонентов 10 и 11 отличаются лишь интенсивностью поглощения.

Хроматографические характеристики экстрактов, обработанных и необработанных хлороформом

Компонент смеси	Без обработки хлороформом			С обработкой хлороформом		
	время удерживания, мин	площадь, тау × мин	относительное содержание*, %	время удерживания, мин	площадь, тау × мин	относительное содержание*, %
1 (агрегат компонента 2)	1,758	6,0749	2,54	1,755	3,8802	3,03
2	1,838	24,4143	10,22	1,842	13,7556	10,74
3	3,727	1,7440	0,73	3,728	0,3926	0,31
4	14,005	6,4077	2,68	14,005	4,5930	3,59
5 (агрегат нарингина)	14,702	38,5065	16,11	14,703	27,3803	21,39
6 (нарингин)	14,850	23,9304	10,01	14,855	17,8020	13,91
7 (прунин)	14,997	13,5123	5,65	15,007	8,5991	6,72
8 (5-О-глюкозид апигенина)	15,128	3,9334	1,65	15,130	2,1801	1,70
9	15,260	7,8981	3,31	15,302	2,6109	2,04
10 (агрегат изосалипурпозид)	15,585	35,1308	14,70	15,638	8,9906	7,02
11 (изосалипурпозид)	15,737	40,4213	16,92	15,745	10,1033	7,89
12	15,872	2,0501	0,86	15,873	0,6945	0,54
13	16,408	5,1092	2,14	16,413	0,9723	0,76
14 (кверцетин)	16,827	1,6096	0,67	16,830	1,6495	1,29
15	16,917	0,5472	0,23	16,923	0,4174	0,33
16	17,232	0,7867	0,33	17,233	0,0257	0,02
17 (апигенин)	17,763	18,3570	7,68	17,765	17,4382	13,62
18 (нарингенин)	17,972	1,8171	0,76	17,973	2,9560	2,31

* Относительное содержание компонента смеси, вычисленное как отношение его площади к сумме площадей всех компонентов и выраженное в процентах.

Как следует из рисунка 4 и таблицы, после обработки экстракта хлороформом значительно уменьшилось абсолютное содержание нарингина и его растворимая агрегированная форма, а также изосалипурпозид и, соответственно, его агрегированной формы. Если для последних относительное содержание, вычисленное по площадям пиков, уменьшилось приблизительно вдвое, то для нарингина и его растворимого агрегата оно даже несколько увеличивается. Абсолютное содержание кверцетина и апигенина до и после обработки хлороформом практически не меняется, однако из-за уменьшения доли других компонентов их относительное содержание в экстракте после обработки хлороформом увеличивается почти вдвое.

Выводы

В полученной из бессмертника песчаного биологически активной композиции среди флавоноидов были обнаружены нарингин и его агрегированная форма, прунин, кверцетин, апигенин и нарингенин, а также 5-О-глюкозид апигенина и изосалипурпозид. Методом молекулярной абсорбционной спектроскопии найдено 73,48 мг флавоноидов в пересчете на рутин или 17,94 мг в пересчете на кверцетин в 350 мг высушенного экстракта. Таким образом, процентное содержание флавоноидов в зависимости от выбранного стандарта составляет 5,13–20,99%.

Полученный вышеописанным способом экстракт из сырья бессмертника песчаного может быть рекомендован для дальнейшего изучения его биологических свойств.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. Т. 2: Пособие для врачей. М., 2002. 608 с.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М., 1993. 270 с.
3. Терентьева Л.И., Илюшечкина Н.В., Жукова Л.А. Онтогенез цмина песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.) // Онтогенетический атлас лекарственных растений. Т. 2. Йошкар-Ола, 2000. С. 110–114.
4. Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. М., 1984. 304 с.
5. Цвелёв Н.Н. Цмин – *Helichrysum* Mill. // Флора европейской части СССР. СПб., 1994. Т. 7. С. 94–96.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов). Самара, 2007. 1239 с.
7. Куркина А.В. Разработка новых подходов к стандартизации сырья и препаратов бессмертника песчаного // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: матер. III Всеросс. конф. Барнаул, 2007. Кн. 2. С. 250–253.

8. Машурчак Н.В. Влияние условий произрастания на накопление флавоноидов в природных и экспериментальных популяциях Цмина песчаного (*Helichrysum genarium* (L.) Moench.) в Саратовской области: дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 2009. 170 с.
9. Куркина А.В., Рыжов В.М., Авдеева Е.В. Перспективы использования ВЭЖХ для стандартизации сырья и препаратов бессмертника песчаного // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. №1. С. 2015–2020.
10. Куркина А.В. Исследование компонентного состава цветков *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. // Химия растительного сырья. 2011. №2. С. 113–116.
11. Куркина А.В., Рыжов В.М. Содержание изосалипурпозидов в цветках бессмертника песчаного // Фармация. 2011. №1. С. 12–14.
12. Куркина А.В., Рыжов В.М., Авдеева Е.В. Определение содержания изосалипурпозидов в сырье и препаратах бессмертника песчаного // Химико-фармацевтический журнал. 2012. №3. С. 28–33.
13. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. М., 1976. 186 с.
14. Машурчак Н.В., Кашин А.С., Игнатов В.В. Зависимость состава флавоноидного комплекса *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. от условий произрастания в Саратовской области // Поволжский экологический журнал. 2009. №1. С. 54–61.
15. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal 2012. Vol. 1. N2. URL: <http://www.romj.org/2012-0203>
16. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени Рс-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, №2. С. 213–220.
17. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 165–173.
18. Патент №2482863 (РФ). Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью / Н.В. Полуконова, Н.А. Наволокин, Н.А. Дурнова, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская / 2013.
19. Скворцова В.В., Наволокин Н.А. Патоморфоз саркомы s45 при внутримышечном введении флавоноидсодержащего экстракта лабораторным крысам // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т. 3, №2. С. 258.
20. Kuznetsova I. Study of thermodynamics of complex formation of flavonoids of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2014. Vol. 2. N12(68). Pp. 47–50.
21. Malešev D., Kuntić V. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions // J. Serb. Chem. Soc. 2007. Vol. 72. N10. Pp. 921–939.
22. Алексеева Л.И., Тетерюк Л.В. Фенольные соединения *Thymus talijevii* Klok. et Schost // Химия растительного сырья. 2008. №4. С. 65–68.
23. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Петракова А.В., Барышева С.В. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения // Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 3. С. 8–11.
24. Куркина А.В. Современная стандартизация как методологическая основа рационального использования ресурсов лекарственных растений, содержащих флавоноиды // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. №1. С. 2253–2256.
25. Webb M.R., Ebeler S.E. Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity // Biochem. J. 2004. Vol. 384. Pp. 527–541.

Поступило в редакцию 24 июня 2014 г.

После переработки 2 июня 2015 г.

Grinev V.S.¹, Shirokov A.A.¹, Navolokin N.A.^{2*}, Polukonova N.V.², Kurchatova M.N.², Durnova N.A.², Bucharskaja A.B.², Maslyakova G.N.² POLYPHENOLIC COMPOUNDS OF A NEW BIOLOGICALLY ACTIVE EXTRACT FROM IMMORTELE SANDY [*HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) MOENCH.] FLOWERS

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Entuziastov av., 13, Saratov, 410049 (Russia), e-mail: alex@ibppm.ru

²Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, ul. Bolshaya Kazachia, 112, Saratov, 410012 (Russia), e-mail: nik-navolokin@yandex.ru

The chemical composition of a new bioactive extract from immortelle sandy [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.] was investigated. Among the flavonoids were found naringin, its presumably soluble aggregate, prunin, quercetin, apigenin, naringenin, apigenin-5-O-glucoside, and isosalipurposide.

It is shown that the phenomenon of existence of previously described in the literature dimers, trimers, or more complex units, we have studied of immortelle sandy extract, such as having similar spectral, but substantially different chromatographic characteristics that can be used to identify them with the corresponding data of glycosylated at different positions and/or by various complexity carbohydrates flavonoids, which are also characterized by similar absorption spectra and different retention times.

By molecular absorption spectroscopy, it was found that the immortelle extract contained 73,48 mg of flavonoids equivalent of rutin or 17,94 mg equivalent of quercetin per g of dry extract weight, which was 20,99 and 5,13%, respectively.

Immortelle extract obtained by the proposed method, has antitumor activity against the transplanted sarcoma 45 and a beneficial effect on animals in general.

Keywords: *Helichrysum arenarium* (L.) Moench., flavonoids, chemical composition, HPLC.

References

1. Mashkovskij M.D. *Lekarstvennye sredstva: Posobie dlja vrachej*. [Drugs. Manual for physicians], vol. 2, Moscow, 2002, 608 p. (in Russ.).
2. Zaprometov M.N. *Fenol'nye soedinenija*. [Phenolic compounds]. Moscow, 1993, 270 p. (in Russ.).
3. Terent'eva L.I., Iljuschekina N.V., Zhukova L.A. *Ontogeneticheskij atlas lekarstvennyh rastenij*. Joshkar-Ola, 2000, vol. 2, pp. 110–114. (in Russ.).
4. Turova A.D., Sapozhnikova Je.N. *Lekarstvennye rastenija SSSR i ih primenenie*. [Medicinal plants of the USSR and their use]. Moscow, 1984, 304 p. (in Russ.).
5. Cvel'jov N.N. *Flora evropejskoj chasti SSSR*. 1994, vol. 7, pp. 94–96. (in Russ.).
6. Kurkin V.A. *Farmakognozija: uchebnik dlja farmaceuticheskijh vuzov (fakul'tetov)*. [Pharmacognosy: a textbook for pharmaceutical universities (faculties)]. Samara, 2007, 1239 p. (in Russ.).
7. Kurkina A.V. *Novye dostizhenija v himii i himicheskoj tehnologii rastitel'nogo syr'ja: Mater. III Vserossijskoj konferencii* [Advances in chemistry and chemical technology of vegetable raw materials: materials of III All-Russian Conference], Barnaul, 2007, pp. 250–253. (in Russ.).
8. Mashurchak N.V. *Vlijanie uslovij proizrastanija na nakoplenie flavonoidov v prirodnyh i jeksperimental'nyh populacijah Cmina peschanogo (Helichrysum renarium (L.) Moench.) v Saratovskoj oblasti. Diss. ... kand. biol. nauk*. [Influence of growth conditions on the accumulation of flavonoids in natural and experimental populations of *H. arenarium* (*Helichrysum renarium* (L.) Moench.) in the Saratov region: diss. ... The candidate of Biological Sciences]. Saratov, 2009, 170 p. (in Russ.).
9. Kurkina A.V., Ryzhov V.M., Avdeeva E.V. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2011, vol. 13, no. 1, pp. 2015–2020. (in Russ.).
10. Kurkina A.V. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2011, no. 2, pp. 113–116. (in Russ.).
11. Kurkina A.V., Ryzhov V.M. *Farmacija*. 2011, no. 1, pp. 12–14. (in Russ.).
12. Kurkina A.V., Ryzhov V.M., Avdeeva E.V. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2012, no. 3, pp. 28–33. (in Russ.).
13. Ponomarev V.D. *Jekstragirovanie lekarstvennogo syr'ja*. [The extraction of medicinal raw materials]. Moscow, 1976, 186 p. (in Russ.).
14. Mashurchak N.V., Kashin A.S., Ignatov V.V. *Povolzhskij jekologicheskij zhurnal*. 2009, no. 1, pp. 54–61. (in Russ.).
15. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaja A.B., Durnova N.A. *Russian Open Medical Journal*, 2012, vol. 1, no. 2, URL: <http://www.romj.org/2012-0203>
16. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaja A.B., Durnova N.A. *Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal*, 2013, vol. 9, no. 2, pp. 213–220. (in Russ.).
17. Polukonova N.V., Durnova N.A., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Golikov A.G. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2013, no. 4, pp. 165–173. (in Russ.).
18. Patent 2482863 (RU). 2013. (in Russ.).
19. Skvorcova V.V., Navolokin N.A. *Bjulleten' medicinskih internet-konferencij*. 2013, vol. 3, no. 2, pp. 258. (in Russ.).
20. Kuznetsova I. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2014, vol. 2, no. 12(68), pp. 47–50.
21. Malešev D., Kuntić V. *J. Serb. Chem. Soc.* 2007, vol. 72, no. 10, pp. 921–939.
22. Alekseeva L.I., Teterjuk L.V. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2008, no. 4, pp. 65–68. (in Russ.).
23. Sorokina O.N., Sumina E.G., Petrakova A.V., Barysheva S.V. *Izvestija Saratovskogo universiteta. Novaja serija. Ser. Himija. Biologija. Jekologija*. 2013, vol. 13, no. 3, pp. 8–11. (in Russ.).
24. Kurkina A.V. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2012, vol. 14, no. 1, pp. 2253–2256. (in Russ.).
25. Webb M.R., Ebeler S.E. *Biochem. J.* 2004, vol. 384, pp. 527–541.

Received June 24, 2014

Revised June 2, 2015

* Corresponding author.

