

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *COLURIA GEOIDES* (ROSACEAE)

М.А. Мяделец¹, С.В. Дутова²

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: MarinaMyadelets@yandex.ru

²Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, кафедра фундаментальной медицины и гигиены,
655017, Абакан, ул. Ленина, 90, e-mail: coluria@mail.ru

Приведены результаты исследования фенольных соединений *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. методами бумажной, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено 15 соединений фенольной природы, которые представлены флавоноидами, кумаринами и фенолкарбоновыми кислотами. Идентифицированы галловая, протокатеховая и эллаговая кислоты, кумарин, агликоны кверцетин и кемпферол, гликозиды кверцетина и кемпферола. Фенольные соединения в этом растении идентифицированы впервые.

Ключевые слова: *Rosaceae*, *Coluria geoides*, фенольные соединения, БХ, ТСХ, ВЭЖХ.

CHROMATOGRAPHIC STUDY OF THE PHENOLIC COMPOUNDS OF *COLURIA GEOIDES* (ROSACEAE)

M.A. Myadelets¹, S.V. Dutova²

¹The Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolynskaya str., 101, e-mail: MarinaMyadelets@yandex.ru

²Khakas State University, Faculty of fundamental medicine and hygiene,
655017, Abakan, Lenina str., 90, e-mail: coluria@mail.ru

Researches of phenolic compounds *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. by methods PC, TLC and HPLC chromatographies. Contents of 15 compounds of the phenolic nature which are presented of flavonoids, coumarins and phenolcarboic acids was established. The gallic, protocatechuic and ellagic acids, coumarin, aglycons quercetin, kaempferol, glycosides of quercetin and kaempferol was identified. Phenolic compounds in this plant are identified for the first time.

Key words: *Rosaceae*, *Coluria geoides*, phenolic compounds, PC, TLC, HPLC.

ВВЕДЕНИЕ

Coluria geoides (Pall.) Ldb. (колюрия гравилатовидная) – многолетнее короткокорневищное травянистое растение сем. *Rosaceae*, гемизндемик Южной Сибири (Флора Сибири, 1988). Известно как пряно-ароматическое и лекарственное растение. Это ценный эфирнонос – заменитель гвоздичного дерева (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), в корнях и корневищах растения накапливается эфирное масло, содержащее 96 % эвгенола (эвгенол включен в отечественную фармакопею). Колюрия гравилатовидная широко используется в народной медицине для лечения воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (Крылов, 1992; Дикорастущие... растения..., 2001). Эфирное масло и водное извлечение из сырья (надземная и подземная части) *C. geoides* проявили выраженную антимикробную активность в отношении золотистого стафилококка и синегнойной палочки (Водолазова и др., 2011). В связи с перспективностью использования *C. geoides* введена в культуру на территории Хакасии М.К. Ворониной

(2002) и в ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) Г.П. Семеновой (2007) (Лекарственные растения..., 2011). Урожайность подземных органов с двухлетней плантации составляет 2–3 т/га (сырой массы), семян – 25 кг/га (Новосибирская обл.). При двухлетней культуре можно получить 15 кг/га эвгенола (Растительные ресурсы..., 1987).

Химический состав этого вида изучен недостаточно. Из биологически активных веществ (БАВ) обнаружены кумарины, дубильные вещества, полисахариды, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, незначительное количество сесквитерпеновых лактонов и полиацетиленовых соединений (Лекарственные растения..., 2011), а также эфирное масло, компонентный состав которого установлен (Горяев, 1952; Водолазова, Ткачев, 2006).

Цель настоящей работы – исследовать в сырье *C. geoides* содержание и состав фенольных соединений, так как это одна из самых значимых групп БАВ лекарственных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали сырье *Coluria geoides* L. (надземная и подземная части), собранное в фазе цветения на территории Республики Хакасия (Аскизский район, окр. оз. Баланкуль, караганово-злаково-осоковая луговая степь). Для хроматографического исследования брали извлечения, полученные из воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц 1 мм. Проводили исчерпывающую экстракцию 70- и 40%-м этанолом (Высочина, 2004). Полученные извлечения концентрировали выпариванием растворителя на водяной бане (до уменьшения объема в 2 раза). Хроматографировали на бумаге FN-5 в системах растворителей изопропиловый спирт–муравьиная кислота–вода (2:5:5) (первое направление) и *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (40:12:28) (второе направление), наиболее эффективных для разделения фенольных соединений растительного происхождения (Хроматография..., 1962; Запрометов, 1974; Высочина, 2004). Хроматограммы просматривали в видимом и УФ-свете до и после обработки парами аммиака и раствором алюминия хлорида. Идентификацию веществ выполняли по флюоресценции в УФ-свете и сравнивали со стандартными веществами (рутином, кверцетином, миррицетином, кемпферолом, лютеолином, кофейной, галловой, хлорогеновой кислотами).

Анализ веществ кумариновой природы проводили в извлечениях из подземных органов, так как именно в них чаще всего локализуются соединения этой группы. Выделение суммы кумаринов проводили 10%-м этанолом с последующей очисткой и извлечением хлороформом. Качественный состав кумаринов изучали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках "Silufol" в хлороформе с использованием качественных реакций для определения веществ кумариновой природы (Химический анализ..., 1983).

Для более детального изучения качественного состава применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) как один из самых надежных для определения индивидуальных фенольных соединений (Верниковская, 2011). Для идентификации фенольных соединений использовали экстракты, приготовленные как и в случае бумажной хроматографии (БХ), и стандартные образцы фенолокислот, кумаринов и флавоноидов. Критериями для идентификации компонентов были времена удерживания исследуемых веществ, УФ-спектры, базы данных и обзорные статьи по основным спектральным характеристикам природных соединений.

Для определения содержания флавонолгликозидов в образцах проводили анализ агликонов, образу-

ющихся после кислотного гидролиза соответствующих гликозидов. Для кислотного гидролиза к 0.5 мл водно-этанольного растительного экстракта прибавляли 0.5 мл HCl (2 н) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения гидролизат разбавляли бидистиллированной водой до объема 5 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (ЗАО "БиоХимМак") для освобождения от примесей гидрофильной природы, затем агликоны смывали 96%-м этанолом.

Анализ проб выполняли на аналитической ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа "Agilent 1200" с диодно-матричным детектором и системы для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. Диодно-матричный детектор позволил осуществить детектирование и запись спектров поглощения в диапазоне длин волн 255–370 нм. Разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C18 размером 4.6 × 150 мм с диаметром частиц 5 мкм при градиентном режиме элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0.1 %) изменялось от 50 до 52 % за 18 мин. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл. Температура колонки – 26 °С. Детектирование – при λ 360 (агликоны), 370 нм (гликозиды). Перед использованием подвижную фазу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Для приготовления подвижных фаз использовали метанол, ортофосфорную кислоту, бидистиллированную деионизированную воду. Стандартные растворы готовили в концентрации 10 мкг/мл.

Количественное определение неидентифицированных соединений проводилось в пересчете на государственный стандартный образец (ГСО) кверцетина.

Определение индивидуальных компонентов проводили по методу внешнего стандарта как наиболее оптимальному для хроматографического анализа многокомпонентных смесей. Содержание индивидуальных компонентов (C_x) вычисляли по формуле (%) (Храмова, Комаревцева, 2008)

$$C_x = C_{ст} \times S_1 \times V_1 \times V_2 \times 100 / S_2 \times M \times (100 - B),$$

где $C_{ст}$ – концентрация соответствующего раствора ГСО, мкг/мл; S_1 – площадь пика компонента в анализируемой пробе; S_2 – площадь пика ГСО; V_1 – объем элюата после вымывания фенольных соединений с концентрирующего патрона, мл; V_2 – общий объем экстракта, мл; M – масса навески, мг; B – влажность сырья, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом двумерной хроматографии в сырье *Coluria geoides* (надземная и подземная части) обнаружили не менее 17 веществ фенольной природы (рис. 1).

В УФ-свете большинство зон адсорбции имели желтую и светло-желтую окраску, характерную для

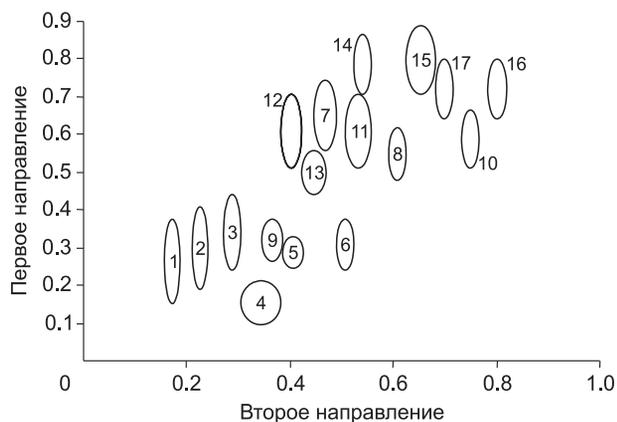
флавонолов и их 7-гликозидов (табл. 1). Одно вещество имело желто-коричневую окраску, что свойственно для флавонов, флавонол-3-гликозидов, флаванонов и халконов. Пять веществ проявились в виде зон адсорбции с голубой, фиолетовой, сине-фиолето-

Таблица 2

Хроматографическая характеристика веществ кумариновой природы подземных органов *C. geoides*

Но- мер пятна	Rf	Окраска в видимом свете	Свечение в УФ		Окраска после обработки диазоре- активом
			до прояв- ления	после прояв- ления	
1	0.07	Желто- коричневая	–*	Желтое	Коричневая
2	0.09	Бледно- желтая	–	–	Оранжево-красная
3	0.13	»	–	Желтое	Коричневая
4	0.21	–	–	–	Бледно-коричневая
5	0.32	Желто- коричневая	Желтая	Ярко- желтая	Коричневая
6	0.64	–	–	–	Бледно-коричневая
7	0.82	Светло- красная	–	–	Вишневая

* Прочерк – отсутствие свечения.

Рис. 1. Схема хроматограммы фенольных соединений *C. geoides*:I направление – система изопропанол–муравьиная кислота–вода (2:5:5); II направление – система *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (40:12:28). 1–17 – номера пятен.

вой, бирюзовой флуоресценцией. Подобную окраску могут давать кумарины, фенолкарбоновые кислоты и некоторые флавоноиды (изофлавоны, флавоон-5-гликозиды).

Таблица 1

Хроматографическая характеристика веществ фенольной природы *C. geoides*

Номер пятна	Rf ₁	Rf ₂	Свечение в УФ		
			до прояв- ления	после обработ- ки NH ₄ OH	после обработ- ки 5%-м спир- товым раство- ром AlCl ₃
1	0.25	0.17	Желтое	Желтое	Усиление окраски
2	0.28	0.22	То же	»	»
3	0.33	0.29	»	Фиолетовое	Желтое
4	0.15	0.34	Фиолетовое	Усиление окраски	Фиолетовое
5	0.28	0.50	Желтое	Желтое	Усиление окраски
6	0.35	0.53	То же	»	»
7	0.63	0.47	»	Желто- коричневое	Желто- коричневое
8	0.54	0.61	»	»	Желтое
9	0.30	0.40	Светло- желтое	Желтое	Усиление окраски
10	0.56	0.75	То же	Светло- фиолетовое	Фиолетовое
11	0.60	0.53	»	Желтое	Усиление окраски
12	0.60	0.40	Желто- коричневое	»	»
13	0.51	0.45	Голубое	Фиолетовое	Желтое
14	0.77	0.54	Фиолетовое	Желто- коричневое	Желто- коричневое
15	0.81	0.66	Сине- фиолетовое	Голубое	Фиолетовое
16	0.72	0.80	»	Фиолетовое	Голубое
17	0.71	0.70	Бирюзовое	Синее	Усиление окраски

Таблица 3

Характеристика и содержание фенольных соединений, обнаруженных в сырье *C. geoides*

Соединение	Время удержи- вания (t _R), мин	Спект- ральные данные (λ _{max}), нм	Количественное со- держание, % от мас- сы абс.-сух. сырья	
			Надзем- ная часть	Подзем- ная часть
<i>Экстракты до кислотного гидролиза</i>				
1. Галловая кислота	1.86	220, 280	10.13	0.15
2. Соединение I	4.47	250, 330	0.56	0.66
3. Соединение II	5.26	250, 320	0.29	0.18
4. Кумарин	13.52	215, 275	0.74	–*
5. Соединение III	18.52	215, 275	1.14	2.69
6. Соединение IV	22.26	220, 275	1.56	–
7. Соединение V	32.61	–	1.43	–
8. Соединение VI	35.85	–	0.91	0.11
9. Кверцетин	40.57	–	0.49	–
10. Соединение VII	43.99	–	0.12	0.17
11. Кемпферол	47.63	–	0.23	0.03
<i>Экстракты после кислотного гидролиза</i>				
12. Соединение VIII	1.37	220, 280	9.39	0.87
13. Протокатеховая кислота	1.75	210, 240, 280	1.51	1.22
14. Соединение IX	2.48	210, 250, 295	0.25	0.61
15. Эллаговая кислота	3.86	255, 370	5.26	1.01
16. Кверцетин	5.85	256, 370	0.42	0.24
17. Кемпферол	11.08	–	0.39	0.07

* Прочерк означает отсутствие соединения в исследуемом образце либо спектральные данные соединения не получены.

Методом ВЭЖХ в выбранных условиях хроматографического разделения в сырье *C. geoides* установлено не менее 15 соединений фенольной природы (табл. 3), 6 из которых (соединения VIII, IX, протокатеховая, эллаговая кислоты, агликоны кверцетин и кемпферол) были обнаружены в экстрактах после кислотного гидролиза. В экстрактах, не подвергавшихся кислотному гидролизу, отмечено 11 соединений. В подземных органах *C. geoides* выявлено только 7.

По времени удерживания стандартных веществ и по УФ-спектрам четыре соединения идентифицированы как гликозиды кверцетина, кемпферола, кумарин и галловая кислота, наличие которой подтверждено методом внутреннего стандарта (рис. 2, 3).

Неидентифицированные компоненты (соединения I–VII) были зарегистрированы на длине волны 360, 370 нм, что позволяет отнести их к группе феноль-

ных соединений. Соединения I, II имеют УФ-спектры, характерные для флавонов, флавонолов и веществ кумариновой природы (Клышев и др., 1978). Возможность определения других хроматографических пиков фенольных соединений образцов *C. geoides* была ограничена имеющимся набором индивидуальных фенольных соединений в качестве образцов сравнения.

Далее анализировались экстракты *C. geoides* после кислотного гидролиза. В результате выявлено еще четыре соединения. Из них идентифицированы протокатеховая и эллаговая кислоты. Неидентифицированные соединения VIII, IX можно отнести к фенолкарбоновым кислотам, так как их максимумы поглощения были зарегистрированы на длине волны 270 нм (рис. 4), а на 360, 370 нм пики этих соединений были отрицательными (рис. 5, 6). Принадлежность к фенолкарбоновым кислотам подтверждают и полученные

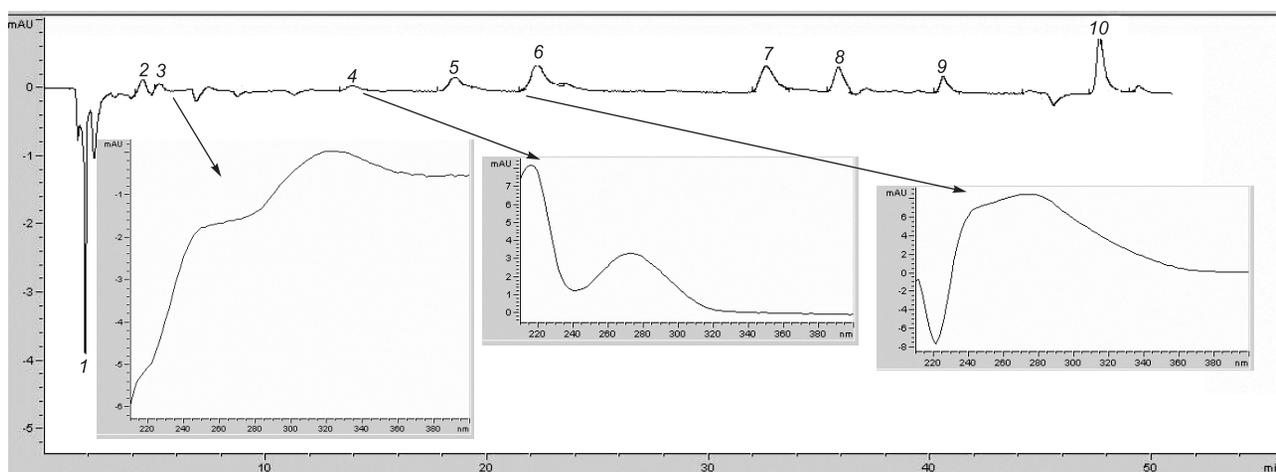


Рис. 2. Хроматограмма извлечения *C. geoides* (надземная часть) при 360 нм:

1 – галловая кислота ($t_R = 1.86$); 2 – соединение I ($t_R = 4.47$); 3 – соединение II ($t_R = 5.26$); 4 – кумарин ($t_R = 13.52$); 5 – соединение III ($t_R = 18.52$); 6 – соединение IV ($t_R = 22.26$); 7 – соединение V ($t_R = 32.61$); 8 – соединение VI ($t_R = 35.85$); 9 – кверцетин ($t_R = 0.58$); 10 – кемпферол ($t_R = 47.63$). Здесь и далее t_R в мин.

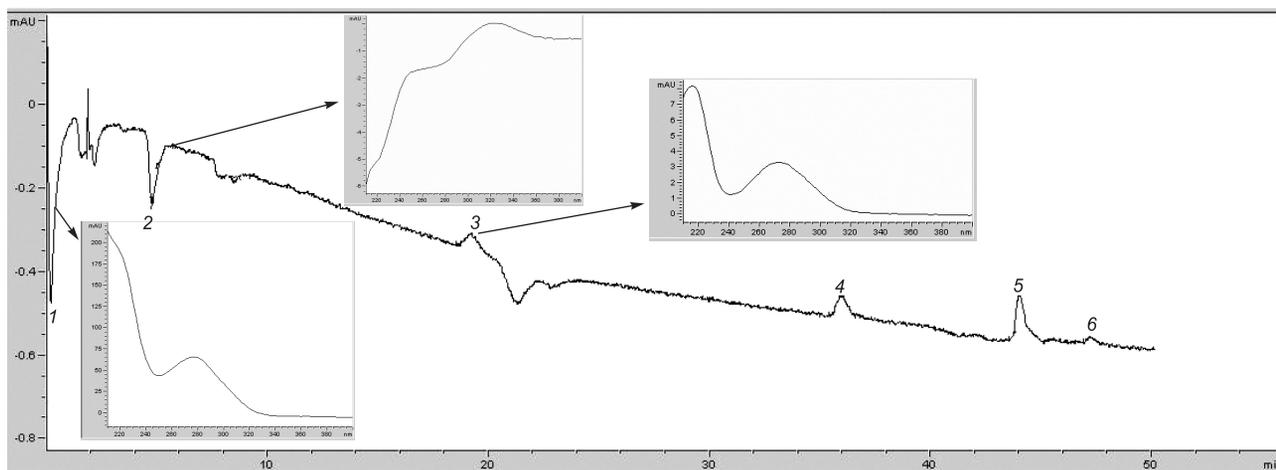


Рис. 3. Хроматограмма извлечения *C. geoides* (подземная часть) при 360 нм:

1 – галловая кислота ($t_R = 1.87$); 2 – соединение I ($t_R = 4.75$); 3 – соединение III ($t_R = 19.24$); 4 – соединение VI ($t_R = 35.93$); 5 – соединение VII ($t_R = 43.99$); 6 – кемпферол ($t_R = 47.18$).

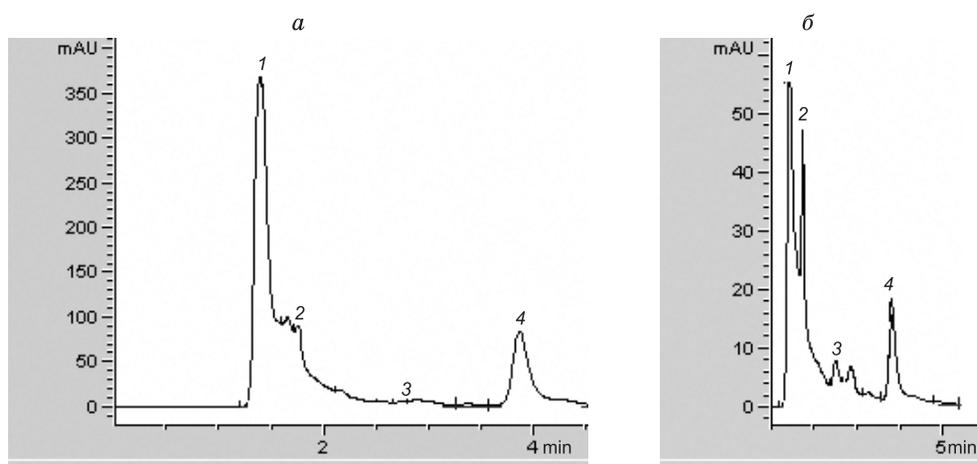


Рис. 4. Фрагменты хроматограмм извлечений *C. geoides* при 270 нм:
a – надземная часть; *б* – подземная часть. 1 – соединение VIII; 2 – протокатеховая кислота; 3 – соединение IX; 4 – эллаговая кислота.

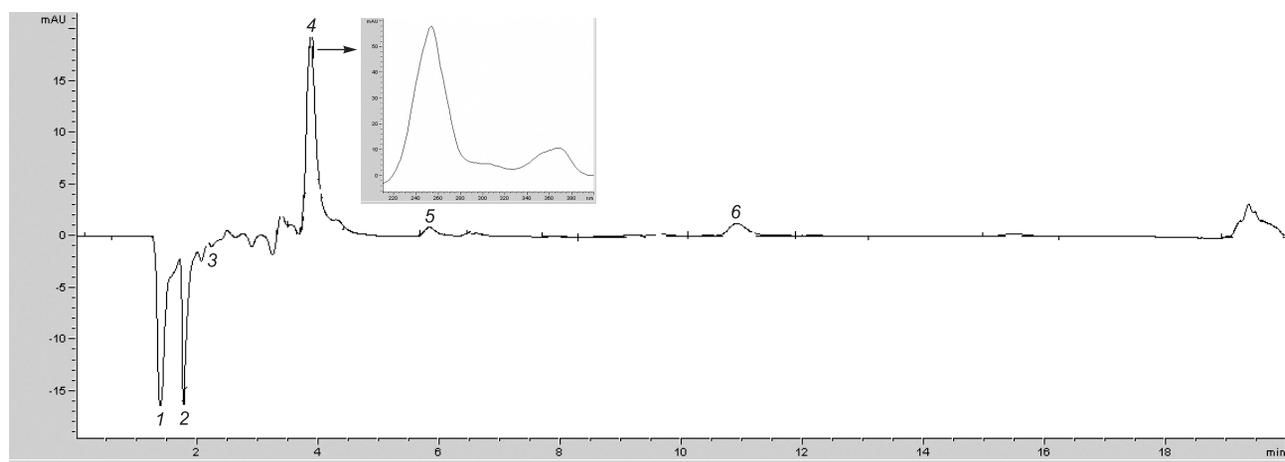


Рис. 5. Хроматограмма извлечения *C. geoides* (надземная часть) при 370 нм:
 1 – соединение VIII ($t_R = 1.38$); 2 – протокатеховая кислота ($t_R = 1.75$); 3 – соединение IX ($t_R = 2.40$); 4 – эллаговая кислота ($t_R = 3.86$);
 5 – кверцетин ($t_R = 5.83$); 6 – кемферол ($t_R = 10.91$).

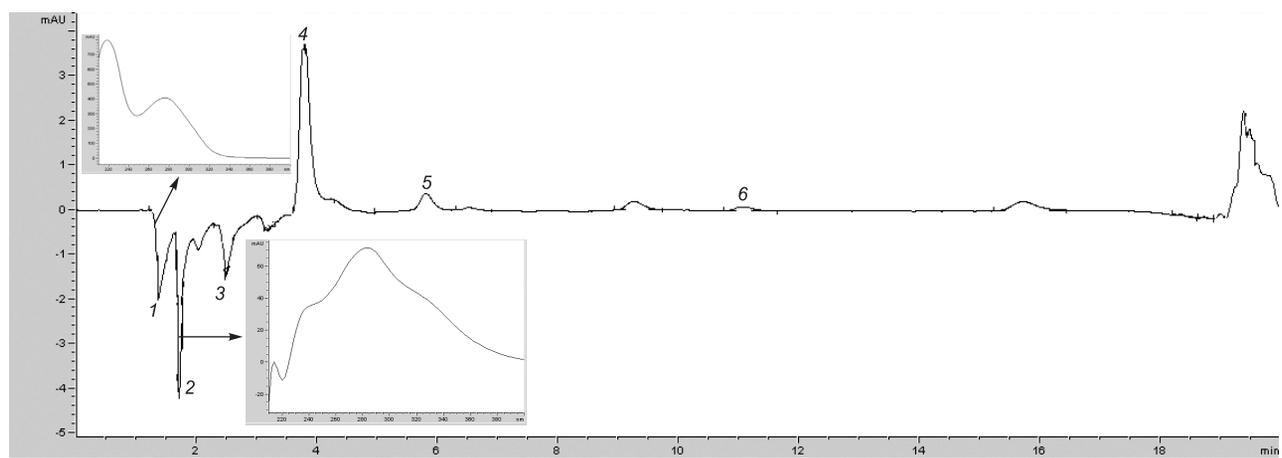


Рис. 6. Хроматограмма извлечения *C. geoides* (подземная часть) при 370 нм:
 1 – соединение VIII ($t_R = 1.40$); 2 – протокатеховая кислота ($t_R = 1.71$); 3 – соединение IX ($t_R = 2.49$); 4 – эллаговая кислота ($t_R = 3.83$);
 5 – кверцетин ($t_R = 5.85$); 6 – кемферол ($t_R = 11.08$).

УФ-спектры. Кроме того, по времени удерживания и спектральным характеристикам соединение IX сходно с ГСО ванилиновой кислоты.

Сравнивая процентное содержание кверцетина и кемпферола и их гликозидов, следует отметить, что кверцетин в экстрактах *C. geoides* практически весь находится в связанном виде, а кемпферол – большей частью в виде агликона.

Анализ состава фенольных соединений показал некоторые отличия в компонентном составе над-

земной и подземной частей *C. geoides*. Так, в надземной части обнаружено 15 фенольных соединений, из которых только 12 встречаются в подземных органах. Сравнивая процентное содержание общих для них фенольных соединений, следует отметить, что в большем количестве они содержатся в надземной части *C. geoides*. Особенно четко это прослеживается на количественном содержании галловой и эллаговой кислот, кверцетина, кемпферола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом БХ в сырье *C. geoides* удалось выявить 17 веществ фенольной природы. Методом ТСХ суммы кумаринов из подземных органов *C. geoides* было обнаружено 7 веществ кумариновой

природы. С применением метода ВЭЖХ установлено наличие не менее 15 фенольных соединений, представленных фенолкарбоновыми кислотами, флавоноидами, веществами кумариновой природы.

ЛИТЕРАТУРА

- Верниковская Н.А.** Хроматографическое определение фенольных соединений и флавоноидов: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Краснодар, 2011. 24 с.
- Водолазова С.В., Ткачев А.В.** Антимикробные свойства и химический состав эфирного масла *Coluria geoides* (Pall.) Ldb. // Материалы I(IX) Междунар. конф. мол. ботаников в Санкт-Петербурге. СПб., 2006. С. 141.
- Водолазова С.В., Мяделец М.А., Карпова М.Р., Саранчина Ю.В.** Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии // Сиб. мед. журн. 2011. Т. 26, № 2, вып. 2. С. 54–58.
- Воронина М.К.** Мониторинг и интродукция редких видов флоры Хакасии в ботаническом саду Абакана // Бюл. Гл. бот. сада РАН. 2002. Вып. 184. С. 90–98.
- Высочина Г.И.** Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск, 2004. 240 с.
- Горяев М.И.** Эфирные масла флоры СССР. Алма-Ата, 1952. 280 с.
- Дикорастущие** полезные растения России / Отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесновская. СПб., 2001. 663 с.
- Запроматов М.Н.** Основы биохимии фенольных соединений. М., 1974. 248 с.
- Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С.** Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования). Алма-Ата, 1978. 220 с.
- Крылов Г.В.** Травы жизни и их искатели. Томск, 1992. 390 с.
- Лекарственные** растения Хакасии / Под ред. С.В. Водолазовой. Абакан, 2011. 164 с.
- Растительные ресурсы СССР:** Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Hydrangeaceae–Haloragaceae*. Л., 1987. 326 с.
- Семенова Г.П.** Редкие и исчезающие виды флоры Сибири: биология, охрана. Новосибирск, 2007. 408 с.
- Флора** Сибири. *Rosaceae*. Т. 8. Новосибирск, 1988. 200 с.
- Химический анализ** лекарственных растений: Учеб. пособие для фармац. вузов / Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова и др.; под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. М., 1983. 176 с.
- Храмова Е.П., Комаревцева Е.К.** Изменчивость флавоноидного состава листьев *Potentilla fruticosa* (*Rosaceae*) разных возрастных состояний в условиях Горного Алтая // Раст. ресурсы. 2008. Т. 44, № 3. С. 96–102.
- Хроматография** на бумаге / Под ред. И.М. Хайса, К. Мацэка. М., 1962. 871 с.