

УДК 615.322.074 : 547.586.5 : 582.933

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ЛИСТЬЯХ ПОДОРОЖНИКОВ БОЛЬШОГО (*PLANTAGO MAJOR L.*) И СРЕДНЕГО (*PLANTAGO MEDIA L.*)

© Т.В. Хортецкая, Г.П. Смойловская*, А.В. Мазулин, Г.В. Мазулин

Запорожский государственный медицинский университет, пр. Маяковского, 26,
Запорожье, 69035 (Украина), e-mail: smoilovskaj@ukr.net

Методом тонкослойной хроматографии установлен качественный состав гидроксикоричных кислот в листьях подорожника большого и подорожника среднего. Проведено сравнительное спектрофотометрическое определение суммы орто-дигидрокоричной кислоты и хлорогеновой кислоты в исследуемых видах.

Ключевые слова: виды рода подорожник, гидроксикоричные кислоты, актеозид, хлорогеновая кислота.

Введение

Крупнейшим родом семейства *Plantaginaceae Juss.* является род *Plantago L.*, который включает около 275 видов однолетних и многолетних трав и полукустарников, распространенных во всем мире [1, 2].

Широкое использование в традиционной и народной медицине видов рода *Plantago L.* обусловлено наличием разнообразных целебных свойств: кровоостанавливающих, противомикробных, отхаркивающих, вяжущих, мочегонных и успокаивающих. Кроме того, исследования последних лет подтверждают, что некоторые виды подорожника проявляют противовоспалительное, иммунорегулирующее, антиоксидантное, цитотоксическое действие [2, 3].

Проведенные исследования указывают на высокую перспективность растений для применения в медицине в качестве источника биологически активных соединений. Однако большинство из представителей рода *Plantago L.* не описаны с точки зрения фитохимического состава и биологической активности. Важным остается и вопрос об определении маркеров, характеризующих фармакологическую активность растений и препаратов на его основе.

Исследования, проведенные I.N. Beaga с соавт., подтверждают наличие высокой антиоксидантной, противовоспалительной и цитотоксической активности *Plantago altissima L.* и *Plantago lanceolata L.* Доказано наличие связи между фармакологической активностью и содержанием в растительном сырье фенольных соединений, в том числе гидроксикоричных кислот [3].

Хортецкая Тая Владимировна – ассистент кафедры фармакогнозии, фармацевтической химии и технологии лекарств, тел.: +380 612 34-23-31

Смойловская Галина Павловна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии, фармацевтической химии и технологии лекарств, тел.: +380 612 34-23-31, e-mail: smoilovskaj@ukr.net

Мазулин Александр Владленович – заведующий кафедрой фармакогнозии, фармацевтической химии и технологии лекарств, доктор фармацевтических наук, профессор, тел.: +380 612 34-23-31

Мазулин Георгий Владленович – ассистент кафедры фармакогнозии, фармакологии и ботаники, тел.: +380 612 34-23-31

N. Rønsted с соавт. предлагают использование в качестве маркеров рода подорожник иридоидов и гидроксикоричных кислот (caffeoyl phenylethanoid glycosides) как основных действующих компонентов [4].

В отечественной и зарубежной нормативной документации содержание гидроксикоричных кислот стандартизируется в лекарственном сырье артишока, крапивы двудомной, мелиссы лекарственной и др. [5]. Государственная фармакопея Украины 1-го издания в статье «Подорожника большого листья» регламентирует определение содержания суммы производных орто-дигидрокоричных кислот в перерасчете на актеозид [6].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Гидроксикоричные кислоты являются наиболее распространенными полифенольными кислотами высших растений, которые проявляют в экспериментах антиоксидантные, антирадикальные свойства, обладают иммуностимулирующей, противовирусной и противовоспалительной активностью [4, 7–9].

Цель нашей работы – изучение содержания гидроксикоричных кислот в листьях фармакопейного вида подорожника большого (*Plantago major L.*) и филогенетически близкого к нему вида подорожника среднего (*Plantago media L.*).

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали листья подорожника (п.) большого (*Plantago major L.*), п. среднего (*Plantago media L.*), собранные в различных регионах Украины в период интенсивного цветения в июне – июле 2010–2011 гг.

Сбор сырья проводился по общепринятым методикам. Сушка листьев осуществлялась в сушильном шкафу при температуре 50 °С.

Для качественного определения гидроксикоричных кислот использовали реакцию с 3% раствором хлорида железа (III) на 50% спиртовой экстракт воздушно-сухого сырья (1 : 5), измельченного до диаметра 1–2 мм.

При идентификации гидроксикоричных кислот полученный экстракт сгущали и подвергали хроматографическому разделению на пластинках Sorbfil АФ-А. В качестве системы растворителей использовали этилацетат – этиловый спирт (95 : 5) и уксусную кислоту 15%. Детектирование веществ на хроматограммах проводили по флуоресценции в УФ-свете до и после обработки парами гидроксида аммония и диазореактива, а также по сравнительным значениям R_f со стандартными образцами.

Количественное содержание суммы орто-дигидроксикоричных кислот в сырье определяли спектрофотометрическим методом. Для этого 1,0 г сырья (точную навеску) измельчали до диаметра 1 мм, помещали в колбу и добавляли 100 мл 50% этилового спирта, нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. После охлаждения фильтровали в мерную колбу на 100 мл, доводили до метки спиртом (раствор 1).

1 мл раствора 1 помещали в мерную колбу на 10 мл и добавляли 2 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, 2 мл раствора 2 и 2 мл раствора гидроксида натрия. Полученный раствор доводили очищенной водой до метки. Обязательным условием являлось перемешивание после каждого добавления реагентов. Раствор 2 готовили разведением 10 мл нитрита натрия и 10 г натрия молибденовокислого в 100 мл очищенной воды.

В качестве компенсационного использовали раствор, содержащий 1 мл раствора 1, 2 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, 2 мл раствора гидроксида, доведенный водой очищенной до метки.

Оптическую плотность определяли сразу после приготовления исследуемого и компенсационного раствора при длине волны 525 нм на спектрофотометре Specord-200 Analytic Jena UV–vis. Расчет содержания проводили по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 10000}{185 \cdot m},$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 525 нм; m – масса навески сырья, г; 185 – удельный показатель поглощения стандартного образца актеозиды при длине волны 525 нм.

Количественное содержание хлорогеновой кислоты проводили по разработанной нами методике с использованием полученного ранее раствора 1. 1 мл данного раствора помещали в мерную колбу на 10 мл, доводили до метки 50% этиловым спиртом. Оптическую плотность определяли при длине волны 327 нм.

В качестве стандартного образца использовали 50% спиртовой раствор стандарта хлорогеновой кислоты фирмы Aldrich Lot SLBF3987V (содержание >95 %).

Результаты и их обсуждение

При проведении химических реакций на гидроксикоричные кислоты, во всех растворах появлялось сине-зеленое окрашивание раствора различной интенсивности, свидетельствующее о присутствии в исследуемых образцах данных веществ.

При проведении тонкослойной хроматографии детектирование в УФ-свете до и после обработки парами аммония гидроксида и диазореактива показало наличие 4 веществ, которые в УФ-свете имели светлоголубую или голубую флуоресценцию, а после обработки парами аммония гидроксида свечение менялось на зеленое и желто-зеленое, что является характерным для класса гидроксикоричных кислот. После обработки хроматограмм диазореактивом пятна приобретали окраску от желто-коричневой до коричневой.

По характерному свечению в УФ-свете, величине Rf, окраске пятен после проявления парами аммония гидроксида и диазореактива, а также при сравнении с образцами кислоты хлорогеновой (фирма Aldrich Lot SLBF3987V, содержание >95%), неохлорогеновой (фирма Sigma Lot BCBK2340V, содержание >98%) и литературными данными в исследуемых образцах достоверно обнаружено присутствие хлорогеновой и неохлорогеновой кислот; предположительно – актеозида, плантамайозида.

При спектрофотометрическом определении суммы производных орто-дигидроксикоричных кислот расчет содержания производился в пересчете на актеозид при длине волны 525 согласно методике Государственной фармакопеи Украины 1-го издания [6].

Анализ УФ-спектров показывает присутствие на всех хроматограммах максимума поглощения при длине волны 510 нм и плеча при 525 нм (рис. 1), что позволяет предположить присутствие в изученном лекарственном сырье помимо актеозида других гидроксикоричных кислот.

Так как при проведении предварительных исследований с помощью ТСХ достоверно идентифицирована хлорогеновая кислота, нами разработана методика ее спектрофотометрического определения с использованием стандартного образца (рис. 2).

Полученные данные определения суммы орто-дигидроксикоричных кислот и хлорогеновой кислоты в листьях п. большого и п. среднего представлены в таблице.

Установлено большее содержание суммы орто-дигидроксикоричных кислот в листьях п. большого (до $1,616 \pm 0,035\%$). Меньшее количество гидроксикоричных кислот характерно для листьев п. среднего (до $1,518 \pm 0,028\%$). Полученные данные коррелируются с накоплением в исследуемом сырье хлорогеновой кислоты. Концентрация данной гидроксикоричной кислоты в листьях п. большого колеблется от $0,101 \pm 0,012$ до $0,129 \pm 0,010\%$, в п. среднем – от $0,095 \pm 0,004$ до $0,109 \pm 0,009\%$.

Анализ полученных данных свидетельствует о возможности использования данных методик для определения содержания гидроксикоричных кислот в лекарственном сырье видов рода подорожник.

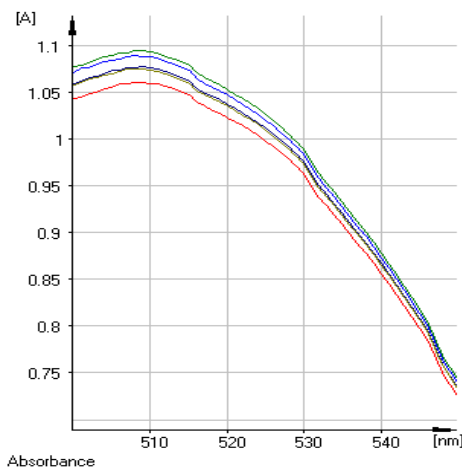


Рис. 1. УФ-спектр 50% спиртового экстракта листьев подорожника большого (1 : 100)

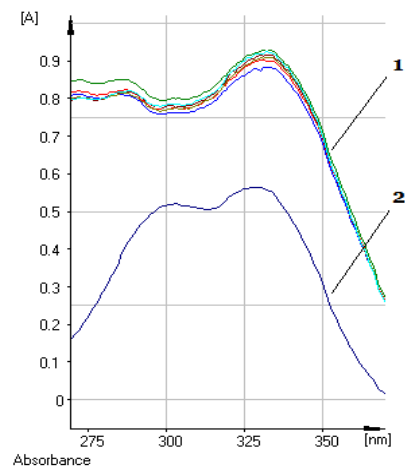


Рис. 2. УФ-спектр 50% спиртового экстракта листьев подорожника большого (1 : 100) – I; раствор стандартного образца хлорогеновой кислоты (фирма Aldrich Lot SLBF3987V) (10 мкг/мл) – II

Количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях *Plantago major L.* и *Plantago media L.* флоры Украины ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x} \%$), $\mu = 6$

№	Место заготовки	Содержание	
		сумма о-дигидрокси-коричных кислот	хлорогеновая кислота
1	П. большой, Симферополь АР Крым, 05.07.2011	$1,551 \pm 0,069$	$0,110 \pm 0,012$
2	П. большой, г. Орехов, Запорожская обл., 01.07.2010	$1,593 \pm 0,042$	$0,120 \pm 0,013$
3	П. большой, г. Новотроицкое, Херсонская обл., 05.07.2011	$1,616 \pm 0,035$	$0,129 \pm 0,010$
4	П. средний, г. Васильевка, Запорожская обл., 02.08.2010	$1,176 \pm 0,039$	$0,095 \pm 0,004$
5	П. средний, п.г.т. Кушугум, Запорожская обл., 03.08.11	$1,253 \pm 0,027$	$0,101 \pm 0,010$
6	П. средний, г. Дружковка, Донецкая обл., 01.07.10	$1,518 \pm 0,028$	$0,109 \pm 0,009$

Выводы

В результате проведенных исследований методом ТСХ достоверно идентифицированы хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты. Методом спектрофотометрии определены сумма *o*-дигидроксикоричных кислот, а также содержание хлорогеновой кислоты в подорожнике большом и п. среднем. Результаты качественного и количественного определения подтвердили систематическую близость между п. большим и п. средним. Полученные данные показывают возможность использования п. среднего в качестве дополнительного источника лекарственного растительного сырья к официальному виду подорожника большого и перспективность их использования в фармацевтической промышленности.

Список литературы

1. Rønsted N., Franzyk H., Mølgaard P., Jaroszewski J.W., Jensen S.R. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. // *Plant Syst. Evol.* 2003. Vol. 242. Pp. 63–82.
2. Olennikov D.N., Samuelsen A.V., Tankhaeva L.M. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2007, no. 2, pp. 37–50. (in Russ.).
3. Beara I.N., Lesjak M.M., Orčić D.Z., Simin N.Đ., Četojević-Simin D.D., Božin B.N., Mimica-Dukić N.M. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related *Plantain* species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. // *LWT - Food Science and Technology*. 2012. Vol. 47. Pp. 64–70.
4. Rønsted N., Göbel E., Franzyk H., Jensen S.R., Olsen C.E. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides // *Phytochemistry*. 2000. N55. Pp. 337–348.
5. Медведьев Ю.В., Передеряев О.И., Арзамасцев А.П., Эллер К.И., Прокофьева В.И. Определение гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье и объектах растительного происхождения // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010. №3. С. 25–31.
6. Державна Фармакопея України. Доповнення 3. Харків, 2009. С. 202–205.
7. Брыкалов А.В., Головкина Е.М., Белик Е.В., Бостанова Ф.А. Исследование физиологически активных соединений в препарате из эхинацеи пурпурной // *Химия растительного сырья*. 2008. №3. С. 89–91.
8. Мельник О.А., Унгуриян Л.М. Пошук лікарських засобів на основі рослинної сировини, що містять кислоту хлорогенову // *Фармацевтичний часопис*. 2011. №1. С. 90–94.
9. Левицкий А.П., Вертикова Е.К., Селиванская И.А. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология // *Мікробіологія і біотехнологія*. 2010. №2. С. 6–20.

Поступило в редакцию 28 мая 2013 г.

Khortetskaya T.V., Smoylovskaya G.P., Mazulin A.V., Mazulin G.V. DETERMINATION OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS IN LEAVES OF PLANTAIN *PLANTAGO MAJOR* L. AND *PLANTAGO MEDIA* L.

Zaporozhye State Medical University, Maiakovskogo ave., 26, Zaporozhye, 69035 (Ukraine), e-mail: smoilovskaj@ukr.net

By the method of thin layer chromatography is set the qualitative composition of hydroxycinnamic acids in the leaves of plantain *Plantago major* L. and *Plantago media* L. A comparative spectrophotometric determination of ortodihydrocennamic acid and chlorogenic acid amount has carried out in studied species.

Keywords: species of the genus of plantain, hydroxycinnamic acids, akteozid, chlorogenic acid.

References

1. Rønsted N., Franzyk H., Mølgaard P., Jaroszewski J.W., Jensen S.R. *Plant Syst. Evol.*, 2003, vol. 242, pp. 63–82.
2. Olennikov D.N., Samuelsen A.V., Tankhaeva L.M. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2007, no. 2, pp. 37–50. (in Russ.).
3. Beara I.N., Lesjak M.M., Orčić D.Z., Simin N.Đ., Četojević-Simin D.D., Božin B.N., Mimica-Dukić N.M. *LWT - Food Science and Technology*, 2012, vol. 47, pp. 64–70.
4. Rønsted N., Göbel E., Franzyk H., Jensen S.R., Olsen C.E. *Phytochemistry*, 2000, no. 55, pp. 337–348.
5. Medvedev Iu.V., Perederiaev O.I., Arzamastsev A.P., Eller K.I., Prokof'eva V.I. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*, 2010, no. 3, pp. 25–31. (in Russ.).
6. *Derzhavna Farmakopeja Ukrainy. Dopovnennja 3*. [Pharmacopoeia of Ukraine]. Kharkiv, 2009, pp. 202–205. (in Ukr.).
7. Brykalov A.V., Golovkina E.M., Belik E.V., Bostanova F.A. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2008, no. 3, pp. 89–91. (in Russ.).
8. Mel'nyk O.A., Ungurjan L.M. *Farmacevtychnyj chasopys*, 2011, no. 1, pp. 90–94. (in Ukr.).
9. Levitskii A.P., Vertikova E.K., Selivanskaia I.A. *Mikrobiologija i biotehnologija*, 2010, no. 2, pp. 6–20. (in Russ.).

Received May 28, 2013

* Corresponding author.