

УДК 615.322:582.746.11:543.544.32

ФЛАВОНОИДЫ В ТРАВЕ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ

П.Е. Худенко, С.Л. Морохина, Д.М. Попов, Н.С. Терешина

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
г. Москва*

FLAVONOIDS IN THE GRASS OF TRIBULUS TERRESTRIS L.

P.E. Khudenko, S.L. Morokhina, D.M. Popov, N.S. Tereshina

*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow
E-mail: pavel_khudenki@mail.ru*

В данной статье представлено сырье якорцев стелющихся как перспективный образец для изучения. Приведен пример обнаружения флавоноидов методом ультраэффективной жидкостной хроматографии / МС на хроматографе Waters Acquility с тандемным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters).

Ключевые слова: ацетонитрил, якорцы стелющиеся – *Tribulus terrestris* L., МС-детектор TQD (Waters), анализ исследованного образца сырья, хроматограммы и спектры

The article presents active parts of *Tribulus terrestris* L. as a perspective sample for study. We have provided an example of flavonoids determination with high-performance liquid chromatography / MS at the Waters Acquility chromatographer with tandem quadrupolar MS-detector TQD (Waters).

Keywords: acetonitrile, *Tribulus terrestris* L., MS-detector TQD (Waters), analysis of the active parts sample under study, chromatograms and spectrums

Якорцы стелющиеся (*Tribulus terrestris* L.), семейства парнолистниковые (*Zygophyllaceae*) – однолетнее коротко опушенное травянистое растение. Стебли простерты по земле, от основания ветвистые, длиной 10-120 (300) см. Листья супротивные, парноперистосложные, длиной 3-8 см, с 6-8 парами мелких продолговатых листочков. Цветки правильные желтые, диаметром до 1,2 см, одиночные, расположены в пазухах листьев. Околоцветник пентамерный, тычинок 10, гинецей ценокарпный из 5 сросшихся плодолистиков. Плод – ценокарпий, распадающийся при созревании на 5 звездчато-расположенных угловатых «плодиков», несущих на спинке 4 длинных, твердых и острых шипа, а также многочисленные бугорки.

В южной части ареала якорцы цветут в апреле-мае, близ северной границы – в июне-июле. В благоприятных условиях

цветение продолжается все лето и в начале осени. Растение плодоносит с июня-июля до заморозков [1].

Якорцы стелющиеся произрастают обычно в сухих степях на юге европейской части России и стран СНГ (низовья Дона и Волги, Украина, Молдова), а также в полупустынях Средней Азии, в Казахстане, на Кавказе, Алтае, в Восточной Сибири (Даурия). Растения особенно часто встречаются в Сурхандарьинской, Самаркандской и Кашкадарьинской областях Узбекистана, Курган-Тюбинской и Кулябской областях Таджикистана, Чимкентской области Казахстана и в центральных районах республики Тува. В Туве, как и в других районах Сибири, а также в Дагестане якорцы растут в основном вдоль дорог и на сбитых выпасом песчаных почвах в пределах степного пояса. В Чимкентской обла-

сти и в других районах Южного Казахстана, а также в Узбекистане, Туркмении и Таджикистане якорцы стелющиеся растут преимущественно как сорное растение полевых культур (огурцов, бахчевых культур, помидоров, винограда, хлопчатника и др.). На неполивных землях они отмечены на стойбищах и как рудеральное растение. В высокогорных районах встречаются редко, но в Таджикистане иногда поднимаются до 2800 м над уровнем моря [1].

В траве якорцев стелющихся содержится около 2,8% стероидных сапонинов, таких как протодиосцин и гликозиды диосгенина, тигогенина, рускогенина. Одними из сопутствующих соединений травы якорцев стелющихся являются стерины: стигмастерин, кампестерин, р-ситостерин и стероиды диосгенин, тигогенин, неотиогенин, ямогенин и согласно исследованиям Tian-Shung Wu, Li-Shian Shi, Shang-Chu Ku (Китай) алкалоиды террестрибисамид, трибулустерин, обнаруженные методом масс-спектрометрии [5]. Известно, что в траве якорцев стелющихся также имеются вещества флавоноидной структуры. Для определения данной группы БАВ используют методы ТСХ анализа [4], а также методы УФ-, ПМР-, С-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии [3].

Объектом исследования являлась трава якорцев стелющихся, собранная в различных районах Болгарии, в период плодоношения. Сырье представляет собой смесь бороздчатых стеблей с продолговатыми отдельными листочками сложного парноперистого листа с беловатым опушением, плодов 5-звездчатой формы, с морщинистой оболочкой и острыми твердыми шипами; реже встречаются отдельные сложные плоды с 2 и 4 шипами, цвет стеблей зеленовато-желтый, плодов светло-зеленый, листьев зеленый, запах сырья слабый, специфический.

Около 2 грамм сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 60 мл 70% спирта этилового, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на ки-

пящей водяной бане в течение 45 минут. После охлаждения до комнатной температуры фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы сырье не попало на фильтр, фильтр промывали 10 мл 70% спиртом этиловым и доводили объем раствора в колбе тем же растворителем до метки.

Для предварительного обнаружения флавоноидов к спиртовому извлечению в пробирку добавляли спиртовый раствор алюминия хлорида и отмечали, что раствор окрашивался в зеленовато-желтый цвет.

Флавоноиды в траве якорцев стелющихся определяли методом ультраэффективной жидкостной хроматографии / МС на хроматографе Waters Acquility с tandemным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters).

Подвижная фаза А (ПФ А). Смесь вода – ацетонитрил (95:5) с муравьиной кислотой.

Подвижная фаза В (ПФ В). Ацетонитрил с муравьиной кислотой.

Хроматографировали испытуемый раствор и растворы стандартов в следующих условиях:

- объем пробы 5 мкл;
- колонок 0,21 × 15,0 см Acquility UPLC VEN C18 (1,7 мкм);
- температура колонки 35 °С;
- скорость потока 0,3 мл/мин;
- градиентный режим хроматографирования формируется путем смешивания подвижных фаз А и В по следующей схеме:

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	95	5
30	50	50
32	0	100
33	95	5
36	95	5

УФ-детектирование проводили в диапазоне 220-500 нм.

Масс-спектрометрическую детекцию (МС) проводили в двух режимах:

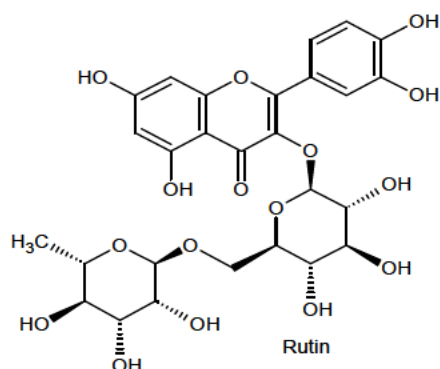
- МС детекция в режиме позитивных ионов (параметры детектора: напряжение на капилляре – +3 кВ; напряжение на конусе – 50 В; температура капилляра 450°С;

температура источника 120°C; скорость потока осушающего газа 800 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.);

–МС детекция в режиме негативных ионов (параметры детектора: напряжение на капилляре – -3 кВ; напряжение на конусе – -30 В; температура капилляра 350°C; температура источника 120°C; скорость потока осушающего газа 500 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.).

В результате анализа исследуемых образцов экстракта якорцев стелющихся получены следующие результаты.

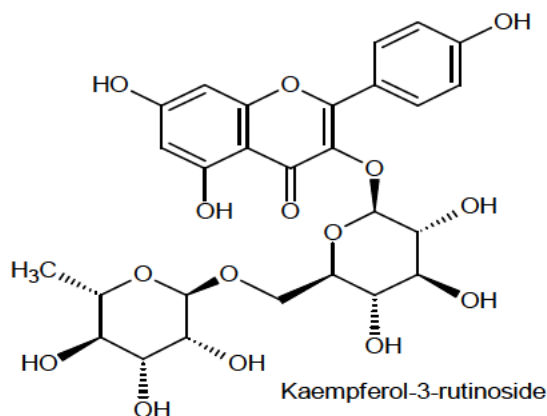
На хроматограмме при 360 нм наблюдаются только 3 достаточно интенсивных пика с массами молекулярных ионов в режиме регистрации позитивных ионов, равными 611, 595 и 625, в режиме регистрации негативных ионов – 609, 593 и 623 и с временами удерживания 7,4, 8,8 и 9,1 мин. Пик с временем удерживания 7,4 мин массой 610 является рутином,



(1)

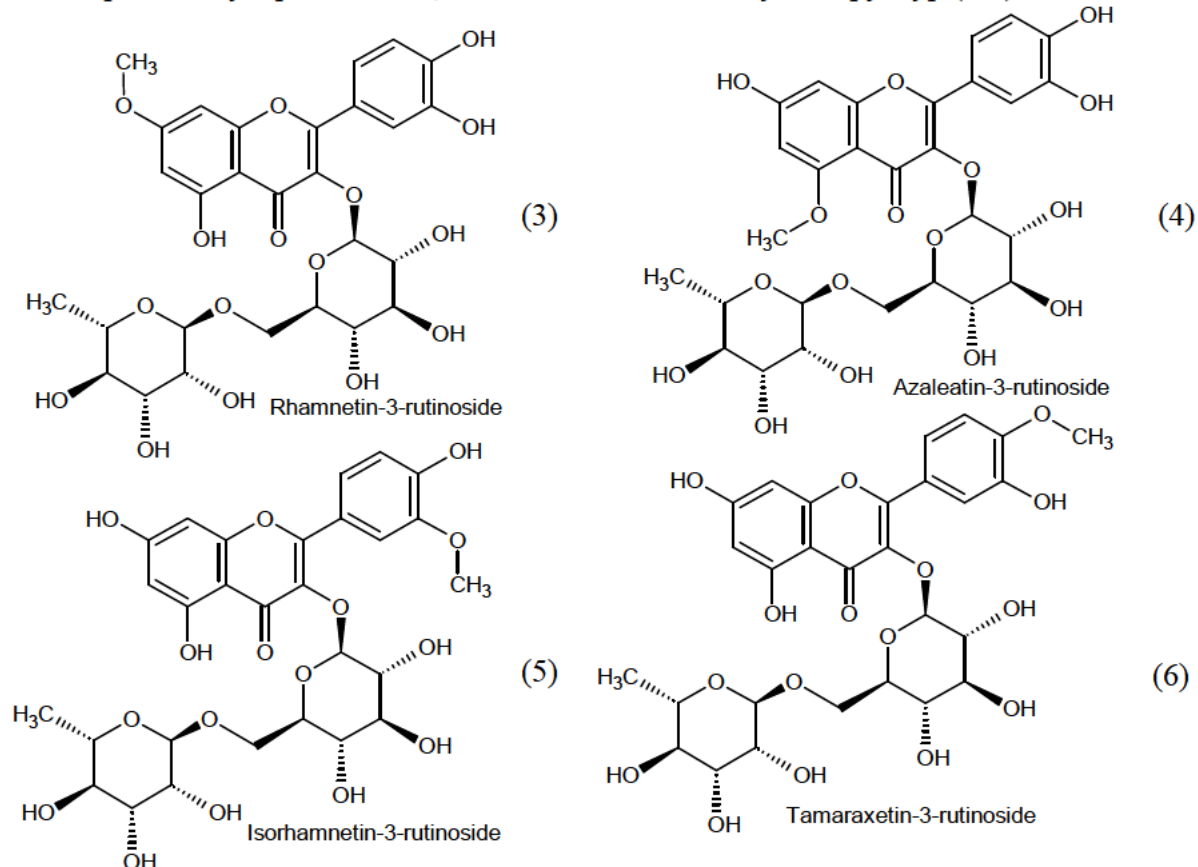
так как совпадает по спектрам и времени удерживания со стандартом. Пик с временем удерживания 8,8 мин имеет предположительно структуру кемпферол-3-рутинозида, так как в спектре в режиме ре-

гистрации позитивных ионов имеет фрагменты с 287 (Кемпферол) и 449, с потерей масс 148 и 162, аналогичных фрагментации рутина (611 до 303 и 465).



(2)

Пик с временем удерживания 9,1 мин может иметь одну из структур (3-6):



Молекулярный ион 625 фрагментируется на 479 и 317 (кверцетин, метилированный в одно из 4-х положений):

рамнетин, изорамнетин, тамараксетин или азалеатин), что также аналогично фрагментации рутина.

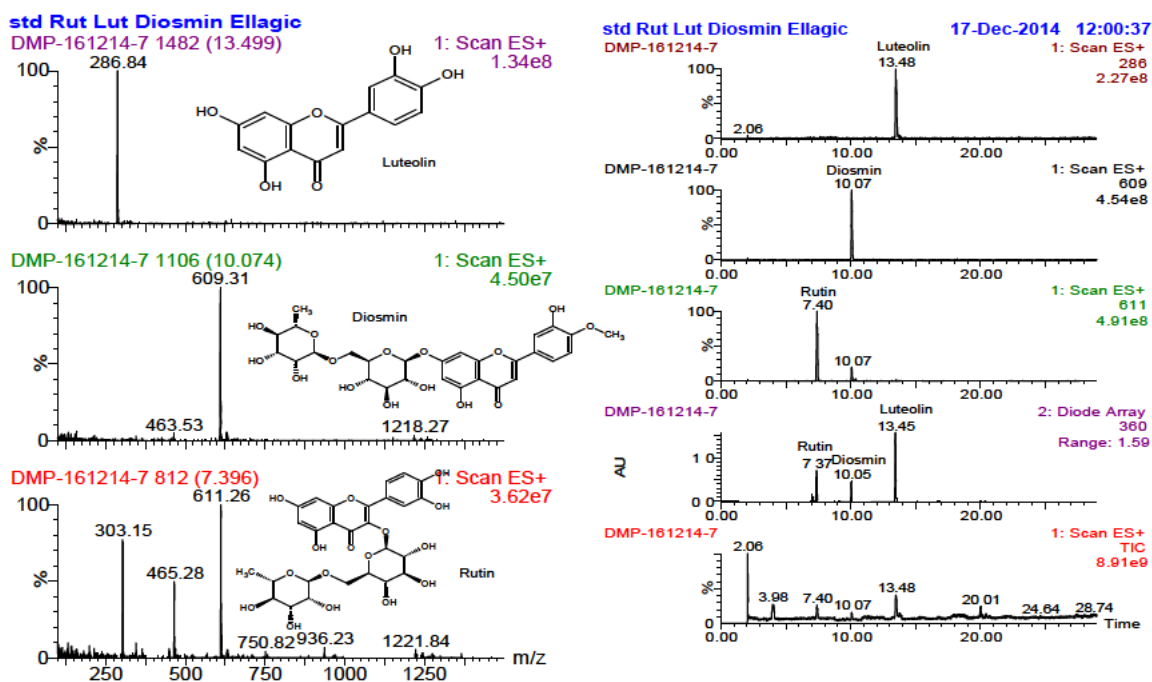


Рисунок 1 – Хромотограммы и спектры смеси стандартов в режиме регистрации позитивных ионов

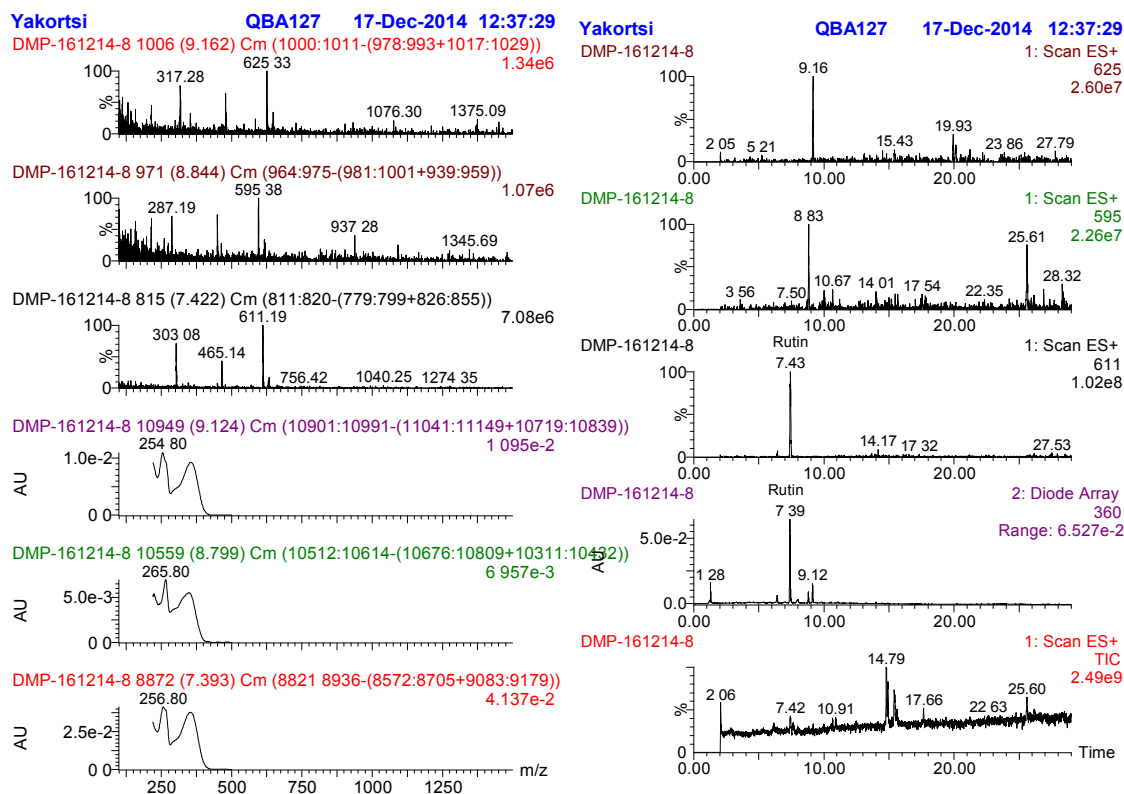


Рисунок 2 – Хроматограммы и спектры экстракта якорцев стелющихся в режиме регистрации позитивных ионов

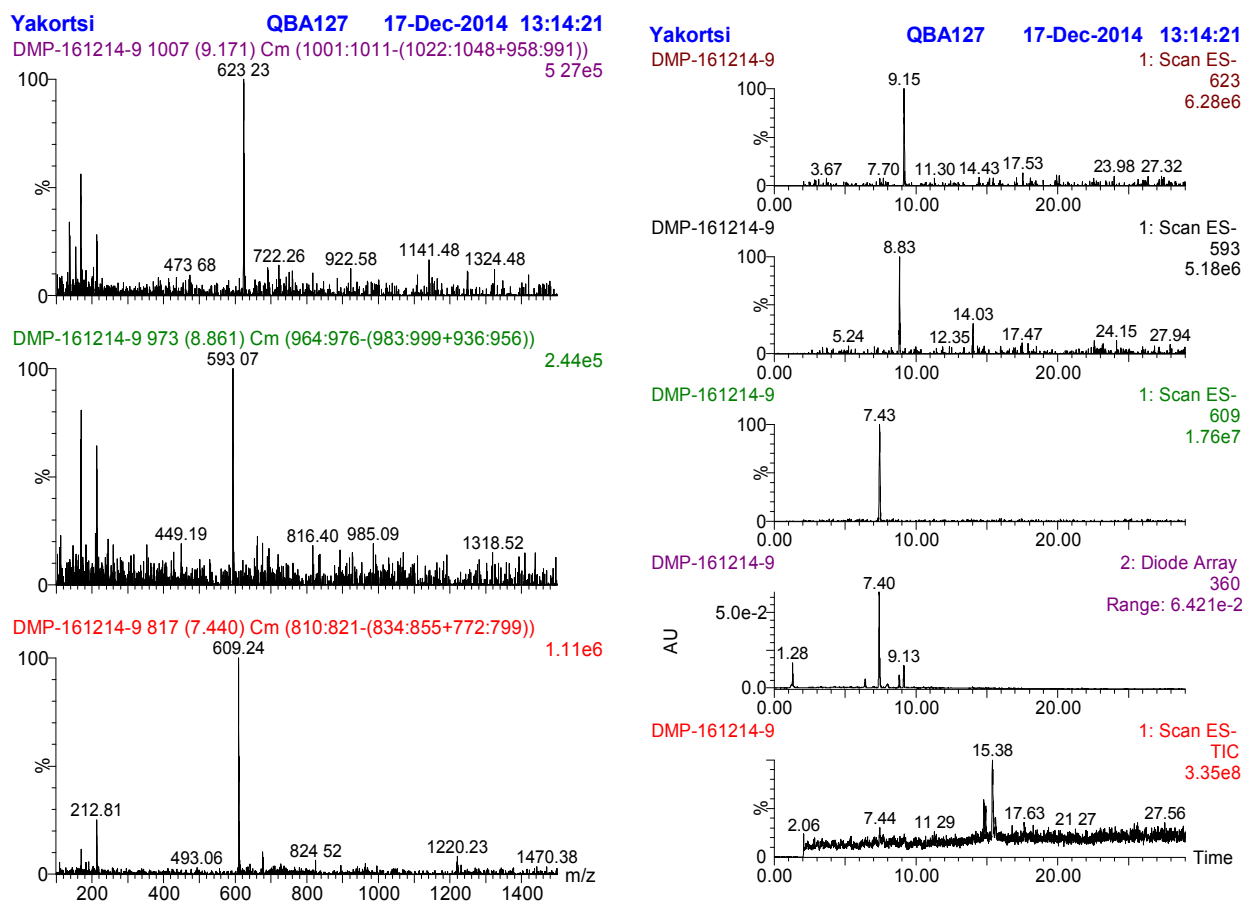


Рисунок 3 – Хроматограммы и спектры экстракта якорцев стелющихся в режиме регистрации негативных ионов

Вывод

Якорцы стелющиеся – перспективное лекарственное растение, для определения доброкачественности лекарственного растительного сырья которого разработана методика определения флавоноидов. Оптимальным условием экстракции флавоноидов из травы якорцев стелющихся является 70% спирт этиловый с соотношением сырья и экстрагента 1:50, измельченность сырья – 2 мм, температурный режим – кипящая водяная баня с обратным холодильником и временем экстракции 45 минут. Флавоноиды в траве якорцев стелющихся определяли и идентифицировали их структуру методом ультраэффективной жидкостной хроматографии / МС на хроматографе Waters Acquity. Установили, что трава якорцев стелющихся содержит флавоноиды: кемпферол, кверцетин, рамнетин, изорамнетин, амараксетин, азалеатин.

Библиографический список

1. Худенко П.Е. Сравнительный анализ нормативной документации на сырье якорцев стелющихся / П.Е. Худенко, С.Л. Морохина // Медицинская Весна: материалы итоговой Всерос. науч. конф. с междунар. уч. 30 апреля 2014 г. М., 2014. С. 217
2. Наумов, А.В. Количественное определение флавоноидов в траве звездчатки средней / А.В. Наумов, Д.М. Попов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. №4. С. 132-137.
3. Тожибоев, М.М. Ксантоны и флавоноиды *Gentiana Algida* Pall / М.М. Тожибоев, Э.Х. Ботиров, Г.А. Усманова // Химия растит. сырья. 2010. №3. С. 129-133.
4. Флавоноиды травы эхинацеи пурпурной / В.А. Куркин, А.С. Акушская, Е.В. Авдеева [и др.] // Химия растит. сырья. – 2010. – №4. – С.87-89.
5. Tian-Shung Wu, Li-Shian Shi, Shan-Chu Kuo. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris* // *Phytochemistry*. 1999. Vol. 50. P. 1411-1415.

* * *

Худенко Павел Евгеньевич – студент Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Область научных интересов: исследования по разработке методов получения и стандартизации лекарственных растительных средств; изучение состава и стандартизация лекарственного растительного сырья. E-mail: pavel_khudenki@mail.ru.

Морохина Светлана Львовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Область научных интересов: исследования по разработке методов получения и стандартизации лекарственных растительных средств; изучение состава и стандартизация лекарственного растительного сырья. E-mail: morohinas@mail.ru.

Попов Дмитрий Матвеевич – главный научный сотрудник, доктор фармацевтических наук Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Область научных интересов: исследования по развитию современных физико-химических методов анализа действующих веществ в растительном сырье и фитопрепаратах. E-mail: Popovdm-niif@mail.ru.

Терешина Наталья Сергеевна – доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Область научных интересов: исследования по разработке методов получения и стандартизации гомеопатических лекарственных средств; изучение состава и стандартизация лекарственного растительного сырья. E-mail: tereshinan@mail.ru.