

УДК: 581.192(571.1)

Шилова И.В., доктор фарм. наук, старший научный сотрудник  
НИИ фармакологии имени Е. Д. Гольдберга СО РАМН, Томск, Россия

## ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО ФЛОРЫ СИБИРИ

**Ключевые слова:** флавоноиды, фенолокислоты, стандартизация, жидкий и сухой экстракты, лабазник вязолистный

Лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., сем. *Rosaceae*) распространен повсеместно в лесной и лесостепной зонах, горно-лесном поясе Европейской Арктики, во всех районах европейской части России, кроме Нижне-Волжского, на Кавказе, в Западной и Восточной Сибири, Средней Азии, Западной Европе. Природные ресурсы растения значительны, особенно в подзонах южной тайги и подтайги европейской части России и Западной Сибири. По мощи природного ресурсного потенциала вид является одним из перспективных травянистых растений России [1-3].

В народной медицине лабазник вязолистный используют в качестве ранозаживляющего, противовоспалительного, вяжущего, антиспастического, гемостатического, сосудукрепляющего, потогонного, антимикробного и общеукрепляющего средства. Настой травы растения употребляют при нервных болезнях, эпилепсии, гипертонической болезни, водянке, ревматизме, подагре, болезнях почек, мочевыводящих путей и мочеполовых органов, простуде, как вяжущее, кровоостанавливающее и антигельминтное средство [1,4,5].

Цветки лабазника вязолистного являются фармакопейным сырьем (ВФС 42-1777-87) и разрешены к применению в официальной медицине в форме отваров и горячих настоев в качестве противовоспалительного, вяжущего и ранозаживляющего средства для лечения воспалительно-деструктивных заболеваний кожи и слизистых [2].

Экспериментальное изучение показало, что экстракты надземной части растения обладают антиэкссудативными, анальгетическими, ранозаживляющими, гастрозащитными, стресспротективными свойствами [4]. Отвар и экстракты цветков лабазника оказывают седативное, противосудорожное действие, улучшают гемореологические свойства крови, снижают сосудистую проницаемость [4], антикоагулянтные и фибринолитические [6], противодиабетические, иммуномодулирующие, антиканцерогенные и противоопухолевые свойства [7, 8].

Проведенные фармакологические испытания показали, что выраженной ноотропной, адаптогенной, антиоксидантной, гепатопротекторной и иммунотропной активностью обладает экстракт надземной части растения на 70 % этаноле [9-11].

Целью работы явилось изучение химического состава экстракта надземной части лабазника вязолистного на 70 % этаноле и разработка методики качественного и количественного анализа действующих веществ.

В работе использовали надземную часть лабазника вязолистного, собранную в июле 2005 года в фазу цветения в окрестностях п. Ольговка Томского района Томской области. Высушенное воздушным способом сырье измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 – 5 мм.

Экстракт получали обработкой измельченной надземной части растения (влажность 8,3 %) 70 % этанолом трижды на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин при температуре 80-85 °С и соотношении сырье-экстрагент 1:10. Полученные извлечения объединяли и упаривали под вакуумом при температуре 60 °С. Фракционирование водного раствора экстракта осуществляли исчерпывающей экстракцией хлороформом, этилацетатом и бутанолом–1 в делительной воронке. Полученные фракции упаривали под вакуумом при температуре не выше 60 °С.

Химический состав хлороформной и этилацетатной фракций достаточно изучен [9, 11]: салициловая кислота, галловая кислота и ее этиловый эфир, кверцетин, авикулярин, изокверцитрин и 4'-галактозид кверцетина. Предварительное исследование химического состава бутанольной фракции (выход 40,5 %) проводили с помощью качественных реакций, хроматографии в тонком слое и на бумаге.

Для разделения сложных смесей веществ использовали методы адсорбционной колоночной и флэш-хроматографии на полиамиде и силикагеле, противоточного распределения и дробной кристаллизации.

Температуру плавления определяли на столике Кофлера. УФ-спектры получали на спектрофотометре «UNIKON 943» Dable Beam UV/vis Spektrophotometer (Италия). ИК-спектры снимали на приборе «Nikolet 5700» (FT-IR) (США). Спектры ЯМР записывали на спектрометре «Bruker DRX-400» (Германия). Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  атомов, связанных с протонами, определены методом НМРС, для четвертичных атомов углерода – НМВС-корреляцией. Масс-спектры (ЭУ, 70 эВ) получали на приборе «Finnigan MAT 8200» (Германия).

Жидкий экстракт лабазника вязолистного (1:1) получали методом многоступенчатой противоточной экстракции на 70 % спирте этиловом. Сухой экстракт лабазника вязолистного получали упариванием спирта этилового в вакууме, водный остаток сушили методом контактной сушки. Для идентификации флавоноидов применяли хроматографию в тонком слое, количественного определения – метод дифференциальной спектрофотометрии.

Предварительное исследование химического состава бутанольной фракции экстракта лабазника вязолистного на 70 % этаноле с помощью качественных реакций, хроматографии в тонком слое и на бумаге выявило наличие следующих групп БАВ: флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, кумаринов (в следовых количествах), дубильных веществ и аминокислот.

В бутанольной фракции посредством двумерной хроматографии на бумаге марки «FN-2» в системах растворителей бутанол-1-уксусная кислота-вода (3:1:1) и 15 % уксусная кислота после детекции в УФ-свете, растворами  $\text{AlCl}_3$ , КОН и diazoреактивом установлено наличие 18 фенольных соединений, из которых 7 – флавоноиды.

Первоначальное разделение фракции осуществляли методом флэш-хроматографии на полиамиде «Woelm», элюируя хлороформом, смесью хлороформ-этанол (с возрастающим градиентом последнего) и этанолом. В результате получено 4 подфракции (А-D). Колоночному разделению на силикагеле подвергли доминирующие подфракции В и С.

Разделение подфракции В (выход 11 %), элюированной смесью хлороформ-этанол 8:2→6:4, производили методом колоночной хроматографии на силикагеле (L 40/100 Lachema) при соотношении образец – сорбент 1:13. Элюирование проводили системой гексан-ацетон (с градиентным увеличением количества последнего). В результате в индивидуальном состоянии получили вещество **1**. Также во фракциях, полученных системой гексан-ацетон 6:4→5:5 по хроматографической подвижности в сравнении с достоверным образом идентифицировали эскулетин.

Подфракцию С (выход 71,4 %), элюированную системой растворителей хлороформ-этанол 4:6→2:8, подвергали разделению с использованием колоночной хроматографии на силикагеле (L 40/100 Lachema) при соотношении образец – сорбент 1:13, элюент – этилацетат и смесь этилацетат-этанол с возрастанием градиента последнего. В результате выделили три индивидуальных вещества (**2** – **4**). Во фракции, полученной смесью этилацетат-этанол 95:5→93:7, хроматографически с достоверными образцами идентифицировали хлорогеновую и гентизиновую кислоты.

При рехроматографии фракции, элюированной этилацетатом, на силикагеле (L 100/250 Lachema) при соотношении образец – сорбент 1:20 и элюировании системой гексан-ацетон (с возрастающим градиентом гидрофильности) получили индивидуальное

вещество **5**. Также во фракции, полученной системой гексан-ацетон 9:1 по хроматографической подвижности в сравнении с достоверным образцом идентифицировали коричную кислоту. Во фракции, выделенной смесью гексан-ацетон 8:2, хроматографией в тонком слое с достоверным образцом обнаружили кемпферол. В подфракции D (выход 17 %), элюированной этанолом, используя качественные реакции, хроматографию в тонком слое и на бумаге с достоверными образцами выявили преобладание дубильных веществ гидролизуемой группы, а также установлено присутствие аминокислот (в т. ч. валина, гистидина и одной не идентифицированной). Вещество **1** – белые игольчатые кристаллы, т. пл. 238-240 °С (возгонка) (метанол-хлороформ 1:20). УФ-спектр (СН<sub>3</sub>ОН),  $\lambda_{\max}$ , нм: 220, 271. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 1543, 1615 (С<sub>6</sub>Н<sub>6</sub>), 1650 (аромат. С=О), 1680 (СООН), 3277, 3500 (ОН). Масс-спектр, *m/z*, ЭУ, 70 eV: 170 (M<sup>+</sup>). Выход составил 0,21 г. Вещество **1** идентифицировали как 3,4,5-тригидроксibenзойная кислота (галловая кислота).

Вещество **2** – ярко-желтый мелкокристаллический порошок, т. пл. 238-239 °С (этанол-ацетон 1:20) УФ-спектр (С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН),  $\lambda_{\max}$ , нм: 257, (303), 363. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 1019, 1059, 1080, 1088 (пиранозное кольцо), 1267 (С-О-С), 1503, 1566, 1606 (С<sub>6</sub>Н<sub>6</sub>), 1657 (аромат. С=О  $\gamma$ -пиранового цикла), 3346 (ОН). Выход 0,05 г. В продуктах кислотного гидролиза методом хроматографии в тонком слое и на бумаге обнаружили кверцетин и D-глюкозу. В спектре НМВС сигнал атома С3 (133,4 м. д.) имеет кросс-пик с аномерным протоном молекулы глюкозы (5,46 м.д.). Вещество **2** согласно физическим и физико-химическим характеристикам идентифицировали с 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозидом кверцетина (изокверцитрином).

Вещество **3** – светло-желтый мелкокристаллический порошок, т. пл. 228-230 °С (хлороформ-метанол-бутанол-1-вода (10:10:1:6) из верхней фазы). УФ-спектр (С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН),  $\lambda_{\max}$ , нм: 256, (266), 366. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 1011, 1022, 1047, 1090, 1138 (пиранозное кольцо), 1234, 1253 (С-О-С), 1507, 1517, 1558, 1599, 1618 (С<sub>6</sub>Н<sub>6</sub>), 1656 (аромат. С=О  $\gamma$ -пиранового цикла), 3354, 3523 (ОН). Выход 0,02 г. Результаты кислотного гидролиза свидетельствуют о наличии в качестве агликона кверцетина, моносахаридного остатка – D-глюкозы. В спектре НМВС сигнал аномерного протона молекулы глюкозы (4,85 м. д.) имеет кросс-пик с углеродным атомом С4' (146,8 м. д.). Вещество **3** – 4'-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид кверцетина (спиреозид).

Вещество **4** – светло-желтый мелкокристаллический порошок, т. пл. 198-200 °С (вода). УФ-спектр (С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН),  $\lambda_{\max}$ , нм: 257, (300), 361. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 1002, 1015, 1043, 1063, 1092, 1123, 1133 (пиранозное кольцо), 1235 (С-О-С), 1504, 1557, 1574, 1599 (С<sub>6</sub>Н<sub>6</sub>), 1656 (аромат. С=О  $\gamma$ -пиранового цикла), 3422 (ОН). Выход 0,031 г. Кислотный гидролиз показал наличие кверцетина, D-глюкозы и L-рамнозы. Химические сдвиги углеродных атомов <sup>13</sup>С совпадают с приведенными в литературе. Вещество **4** является 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -L-рамнопиранозидом кверцетина (рутином). Вещество **5** – лимонно-желтые кристаллы, т. пл. 312-313 °С (этанол-хлороформ 1:20). УФ-спектр (С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН),  $\lambda_{\max}$ , нм: 255, (295), (317), 372. Вещество **5** идентифицировали как 3', 4', 3, 5, 7-пентагидроксифлавоноид (кверцетин).

Таким образом, в результате химического исследования бутанольной фракции экстракта лабазника вязолистного на 70 % этаноле выделены флавоноиды (кверцетин, изокверцитрин, 4'-глюкозид кверцетина, рутин) и фенолкарбоновая кислота (галловая). Во фракции также идентифицировали флавоноиды (кемпферол), ароматические кислоты (коричная, хлорогеновая, кофейная, гентизиновая), кумарины (эскулетин), дубильные вещества гидролизуемой группы, аминокислоты (в т. ч. валин, гистидин).

Исследования показывают выраженную ноотропную и антиоксидантную активность флавоноидов (гликозидов кверцетина) [9, 11], выделенных из экстракта лабазника вязолистного. Полученные экспериментальные данные указывают на перспективность использования растения в качестве источника для получения

ефективного фитопрепарата ноотропного действия с гепатозащитным и иммуотропным эффектами и последующего внедрения его в медицинскую практику.

При разработке методик обнаружения и количественного определения действующих веществ учитывали принцип унификации в ряду: сырьё – субстанция – лекарственная форма [9]. Обнаружение флавонолов – гликозидов кверцетина (изокверцитрина, спиреозида, авикулярина) осуществляли методом хроматографии в тонком слое силикагеля в экспериментально подобранной системе растворителей хлороформ-этанол (8:2), детектируя 5 % раствором алюминия хлорида в 95 % спирте этиловом и УФ-светом (360 нм). В УФ-области (365±2 нм) имеется характерная для гликозидов кверцетина полоса поглощения.

Количественное определение флавоноидов предложено проводить методом дифференциальной спектрофотометрии, используя реакцию комплексообразования с раствором алюминия хлорида в кислой среде. Выраженной активностью обладает сумма гликозидов кверцетина, поэтому осуществляли кислотный гидролиз экстрактов лабазника. Условия проведения реакции отработывали на ГСО кверцетина (ФС 42-1290-79), т.к. спектры поглощения продуктов реакции с раствором хлорида алюминия этого соединения и флавоноидов лабазника вязолистного после гидролиза совпадают ( $\lambda_{\max}$  425 нм) [9, 11]. При этом объем жидкого экстракта для анализа составляет 1 мл, масса навески сухого экстракта – 0,1 г, что соответствует 1 г травы лабазника вязолистного (для унификации методик).

В результате проведенных исследований определено, что содержание флавоноидов в жидком экстракте лабазника вязолистного составляет 2,28±0,06 %. В сериях жидкого экстракта, полученных при обработке сырья, собранного в Томской, Кемеровской областях и Республики Алтай в 2005-2008 гг., количество флавоноидов варьирует от 2,19 до 4,27 %, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела данного показателя содержание не менее 1,5 %. Метрологические характеристики методики:  $f=10$ ;  $\bar{X}=2,28$ ;  $S^2=0,0034$ ;  $S=0,0583$ ;  $P=95$  %;  $t(P,f)=2,23$ ;  $\Delta x=0,06$ ;  $\varepsilon=2,69$  %. Метрологический анализ разработанной методики показал, что относительная ошибка не превышает 3 %.

Исследования показывают, что содержание флавоноидов в сухом экстракте лабазника вязолистного составляет 2,18±0,03 %. В сериях сухого экстракта, полученных при обработке сырья, заготовленного в разных местах сбора, их количество колеблется от 2,07 до 4,19 %, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела данного показателя содержание не менее 1,5 %. Метрологические характеристики методики:  $f=10$ ;  $\bar{X}=2,18$ ;  $S^2=0,0007$ ;  $S=0,0265$ ;  $P=95$  %;  $t(P,f)=2,23$ ;  $\Delta x=0,03$ ;  $\varepsilon=1,48$  %. Метрологический анализ разработанной методики показал, что относительная ошибка не превышает 2 %.

При осуществлении предложенной методики в опытах с добавками ГСО кверцетина непосредственно в спиртовые растворы жидкого и сухого экстракта лабазника вязолистного показано отсутствие систематической ошибки.

Таким образом, разработаны унифицированные методики качественного и количественного анализа флавоноидов в жидком и сухом экстрактах травы лабазника вязолистного с применением хроматографии в тонком слое силикагеля, спектроскопии в УФ- и видимой областях спектра.

#### **Библиография.**

1. Растительные ресурсы СССР : Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hydrangeaceae – Haloragaceae / отв. ред. А. А. Федоров. – Л. : Наука, 1987. – 326 с.
2. Энциклопедический словарь лекарственных средств и продуктов животного происхождения / под ред. Г. П. Яковлева, К. Ф. Блиновой. – СПб. : Специальная литература, 1999. – С. 170-171.
3. Буданцев, А. Л. Оценка сырьевой продуктивности *Filipendula ulmaria* (Rosaceae) в Ленинградской и Псковской областях и возможность ее эмпирического прогноза / А. Л. Буданцев, К. С. Покровская // Раст. ресурсы. – 2005. – Т. 41, вып. 2. – С. 85-96.

4. Фармакологические свойства галеновых препаратов из цветков *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim / О. Д. Барнаулов, И. Г. Болдина, В. В. Галушко и др. // Раст. ресурсы. – 1979. – Т. 15, вып. 3. – С. 399-407.
5. Минаева, В. Г. Лекарственные растения Сибири / В. Г. Минаева. – Новосибирск : Наука, 1991. – 428 с.
6. Антикоагулянт из таволги вязолистной, его антитромботический и тромболитический эффекты / Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина, В. М. Кондашевская и др. // Вестн. Моск. универ. – 1994. – № 3. – С. 15-17.
7. Антиканцерогенные и противодиабетические свойства цветков *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / В. Г. Беспалов, А. Ю. Лимаренко, А. С. Петров и др. // Раст. ресурсы. – 1993. – Т.29, вып.1. – С. 9-18.
8. Takagi, K. Natural products for inhibiting aldose reductase / K. Takagi // Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP. – 2002. – P. 256-283.
9. Шилова, И. В. Химический состав растений Сибири и разработка ноотропных средств на их основе : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук: 14.04.02, 14.03.06 / И. В. Шилова. – Пятигорск, 2011. – 48 с.
10. Шилова, И. В. Химический состав и ноотропная активность растений Сибири / И. В. Шилова, Н. И. Суслов, И. А. Самылина. – Томск : Изд-во Томского ун-та, 2010. – 236 с.
11. Шилова, И. В. Разработка ноотропных средств на основе растений Сибири / И. В. Шилова, И. А. Самылина, Н. И. Суслов. – Томск : Изд-во «Печатная мануфактура», 2013. – 268 с.