

## ФЛАВОНОИДЫ ЗВЕРБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

И.И. Баяндина, Ю.В. Загурская\*, А.Л. Богатырев\*\*, В.Г. Васильев\*\*\*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия, bayandina@ngs.ru

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии человека СО РАН, Кемерово, Россия, syjil@ngs.ru

\*\*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия, alexey\_bogatyrev@mail.ru

\*\*\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии СО РАН, vgvasil@nioch.nsc.ru

### Введение

Высокое содержание флавоноидов в зверобое продырявленном (*Hypericum perforatum* L.) определяет его применение в народной и научной медицине – капилляроукрепляющее, противовоспалительное, диуретическое и желчегонное действие. Состав флавоноидов зверобоя продырявленного давно и интенсивно изучается. Применение новых инструментальных методов позволяет обнаруживать новые соединения в этом, казалось бы, полностью изученном лекарственном растении. В цветущей части зверобоя продырявленного кроме мономерных флавоноидов найдены бифлавоноиды: I3, П8-биапигенин и аментофлавоин [1]. При изучении образцов *H. perforatum* из Греции обнаружены флавоноиды (кверцетин, кверцитрин, изокверцитрин, гиперозид, астильбин (3-О-рамнозид дигидрокверцетина), микуелианин (C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>13</sub>), I3, П8-биапигенин), которые были идентифицированы с использованием данных UV, MS, MS/MS и 1H NMR спектров [2]. С использованием метода колоночной хроматографии О.Е. Правдивцевой и В.А. Куркиным [3] были выделены следующие флавоноиды: 3,8<sup>11</sup>-бисапигенин, кверцетин, 6,8<sup>11</sup>-дикверцетин, гиперозид и рутин. Целью нашего исследования было сравнительное изучение состава и содержания флавоноидов зверобоя продырявленного, выращенного в трех регионах Западной Сибири.

### Методы исследования

Из генетически однородных семян (сорт Золото долины, семена собраны с плантации в Новосибирской области в 2009 г.) рассадным способом получены индивидуальные растения *Hypericum perforatum* в трех регионах Западной Сибири (Республика Алтай, Новосибирская и Кемеровская области). Сбор образцов сырья растений производили по мере достижения фенологического состояния в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи СССР [4]. Растения выращивали на территории: Кузбасского ботанического сада (Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово); Сада мичуринцев НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск); Горно-Алтайского ботанического сада (АЛТФ ЦСБС СО РАН «Горно-Алтайский ботанический сад», пос. Камлак, Республика Алтай).

Общее содержание флавоноидов в образцах *Hypericum perforatum* определяли с помощью спектрофотометрического метода, приведенного в Государственной фармакопее СССР [4], разработанного В.В. Беликовым и др. [5], так как этот метод является официальным методом анализа сырья зверобоя продырявленного. Этот метод использует реакцию комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия.

*Пробоподготовка для ВЭЖХ.* Для приготовления средних образцов брали аликвотную массу от каждого растения в пределах выборки. Полученный образец тщательно перемешивали, из него отбирали точные навески в трех повторностях массой 1 г. Затем на водяной бане проводили трехкратную горячую экстракцию 50%-м этиловым спиртом. Затем для удаления взвеси сырья экстракты фильтровали через ватный фильтр. Достоинство горячей экстракции в довольно полном извлечении различных веществ из сырья, а

недостаток – многие флавоноиды являются гликозидами и могут гидролизироваться в горячих водных растворах. Важный этап пробоподготовки – отделение различных хлорофиллов от экстрактов, которые чаще всего очень сильно удерживаются обращено-фазовым сорбентом хроматографической колонки, что приводит к различным проблемам с хроматографической системой (повышение давления, изменение времен удерживания различных веществ из-за уменьшения эффективной площади сорбента и др.). Нами был использован метод твердофазной экстракции. Смешивали экстракты из трех повторностей по 5 мл для усреднения. Аликвоту полученного экстракта (700 мкл) пропускали через патрон, заполненный обращено-фазовым сорбентом (Диапак С16). При пропускании через патрон вещества из экстракта начинают в различной степени удерживаться поверхностью сорбента, причем хлорофиллы почти необратимо связываются с фазой. Затем патрон промывают метанолом (700 мкл), чтобы смыть с сорбента различные соединения, в том числе флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты.

**ВЭЖХ-МС хроматография.** Полученные растворы анализировали методом ВЭЖХ-МС в системе жидкостного хроматографа Agilent 1200 SL (с диодно-матричным детектором) и гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker micrOTOFQ. Использовали обращено-фазовый режим элюирования. Для обращено-фазовой ВЭЖХ использовали колонку фирмы Zorbax (2,1x150 мм, 3,5 мкм) с сорбентом EclipseXDB-C18. Колонка находилась в термостате при температуре 25°C. Скорость потока растворителя выбрали 0,2 мл/мин, т.к. она оказалась оптимальной скоростью для совместного использования хроматографа и масс-спектрометра для анализа растительных экстрактов. Хроматограммы регистрировались на двух диапазонах длин волн: (340±50) нм – основной диапазон поглощения интересующих нас соединений (флавоноидов и фенолкарбоновых кислот) и (650±50) нм, в котором поглощают различные хлорофиллы, этот диапазон использовался для контроля количества хлорофиллов после очистки экстрактов твердофазной экстракцией. Оптимальный вводимый объем пробы раствора составил всего 5 мкл, так как оба детектора обладают высокой чувствительностью к фенольным соединениям, что позволило получить интенсивные сигналы.

Для разделения использовали водно-метанольную смесь в режиме ступенчатого элюирования – сочетание изократического и градиентного режимов, т.к. после очистки экстрактов получили растворы в метаноле. Для экстрактов *H. perforatum* оптимальным было следующее элюирование: первые пять минут пропускался 10%-ный водный раствор метанола в изократическом режиме, затем в течение 7 минут объемное содержание метилового спирта менялось от 10 до 30%, затем в течение 20 минут – от 30% до 70%, затем в течение 8 минут – от 70 до 100%, а потом снова изократическое элюирование чистым метанолом в течение 10 минут.

В качестве способа получения ионов использовалась ионизация электрораспылением (ESI, электроспрей). Рабочие параметры ионизации: давление газа-распылителя – 2 бара; скорость подачи газа-осушителя – 8 л/мин; температура осушителя – 240°C; напряжение на конце капилляра – ±4 кВ. Диапазон регистрации  $m/z$ : 100–1200; точность определения массы ±0,01 Да.

Были записаны хроматограммы и масс-спектры экстрактов и раствора, содержащего смесь стандартов хлорогеновой кислоты, рутина, кверцитрина, кверцетина, апигенина и лютеолина. При помощи полученных масс-спектров были определены молекулярные массы основных фенольных соединений в экстрактах. Масс-детектирование велось в режиме как положительных, так и отрицательных ионов.

### **Результаты и обсуждение**

Содержание флавоноидов в сырье зверобоя из различных регионов Западной Сибири различалось значительно. Среднее содержание суммы флавоноидов было максимально в Новосибирске (3,86±0,046%) и достоверно отличалось от алтайских образцов (3,45±0,098%), минимальное содержание флавоноидов характеризовало растения, выращенные в Кемерово (2,78±0,012%).

Нами проведена идентификация фенольных соединений в спиртовых экстрактах *H. perforatum*, выращенных в Новосибирской, Кемеровской областях и в Республике Алтай. Сравнением данных, полученных с помощью ВЭЖХ-МС для экстрактов и смеси стандартов, удалось идентифицировать два вещества – хлорогеновую кислоту (16,9 мин) и рутин (24,2 мин). Остальные пики хроматограммы экстракта идентифицировали по полученным УФ- и масс-спектрам. В экстракте зверобоя продырявленного было обнаружено шесть

основных соединений, относящихся к классу флавоноидов, и несколько минорных компонентов, представляющих собой производные кофейной кислоты.

Масс-хроматограмма и УФ-хроматограмма для раствора стандартов, записанные в аналогичных экстракту *H. Perforatum* условиях, дали информацию о масс-спектрах и временах удерживания стандартов хлорогеновой кислоты, рутина, кверцитрина, кверцетина, апигенина и лютеолина (рисунок 1).

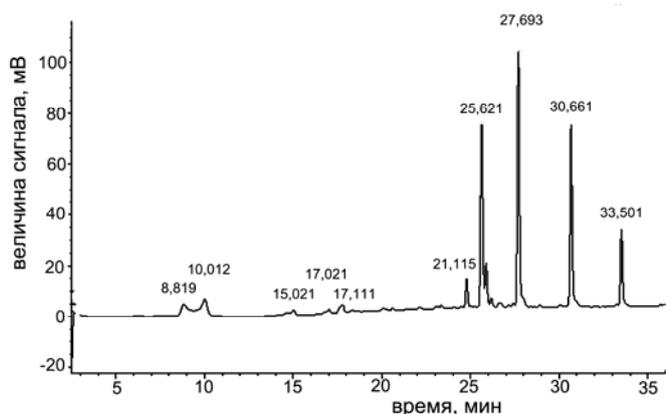


Рисунок 1 – ВЭЖХ-хроматограмма 50% этанольных экстрактов сырьевой части *H. perforatum*

Соответствие пиков на хроматограмме экстракта и пиков хроматограммы смеси использованных стандартных соединений было установлено по совпадению спектров поглощения каждого пика и спектров из имеющейся базы данных. Полученные данные позволили идентифицировать в экстракте *H. perforatum* следующие соединения:

Рутин (3-О-рамнозо-гликозид кверцетина):  $C_{27}H_{30}O_{16}$ ; MW=610,153;  $t_R=25,9$  мин;  $\lambda_{max}=255$  и 355 нм; отрицательные ионы:  $m/z = 609,137$  ( $[M-H]^-$ ), 463,077 ( $[M-C_6H_{11}O_4]^-$ ), 301,031 ( $[C_{15}H_9O_7]^-$ ); положительные ионы:  $m/z = 303,059$  ( $[C_{15}H_{11}O_7]^+$ ), 465,118 ( $[M-C_6H_{10}O_4+H]^+$ ), 487,095 ( $[M-C_6H_{10}O_4+Na]^+$ ).

Кверцитрин (3-О-рамнозид кверцетина):  $C_{21}H_{20}O_{11}$ ; MW=448,100;  $t_R=27,7$  мин;  $\lambda_{max}=256$  и 350 нм; отрицательные ионы:  $m/z = 447,083$  ( $[M-H]^-$ ), 301,031 ( $[C_{15}H_9O_7]^-$ ); положительные ионы:  $m/z = 303,059$  ( $[C_{15}H_{11}O_7]^+$ ), 471,100 ( $[M+Na]^+$ ).

Кверцетин:  $C_{15}H_{10}O_7$ ; MW=302,043;  $t_R=30,7$  мин;  $\lambda_{max}=254$  и 370 нм; отрицательные ионы:  $m/z = 301,031$  ( $[M-H]^-$ ); положительные ионы:  $m/z = 303,059$  ( $[M+H]^+$ ).

Три оставшихся основных пика пришлось идентифицировать только по масс- и УФ-спектрам:

Пик с  $t_R=24,8$  мин имеет УФ-спектр, схожий со спектром дигидрокверцетина. Масс-данные: отрицательные ионы с  $m/z = 449,099$  ( $[M-H]^-$ ), 303,045 ( $[C_{15}H_{11}O_7]^-$ ); положительные ионы с  $m/z = 305,076$  ( $[C_{15}H_{13}O_7]^+$ ), 473,108 ( $[M+Na]^+$ ). Полученные данные соответствуют флавоноиду астильбину (3-О-рамнозид дигидрокверцетина,  $C_{21}H_{22}O_{11}$ ). Других производных дигидрокверцетина с такой же молекулярной массой ранее в экстрактах зверобоя продырявленного не обнаруживали.

Пик с  $t_R=25,7$  мин однороден с точки зрения спектров оптического поглощения и имеет спектр, схожий со спектром гиперозида. Согласно масс-спектрам пик содержит два различных соединения с ММ = 464,085 и 478,065, но с общим фрагментом массой 302,040, соответствующей массе кверцетина. Одно из двух составляющих пика с  $t_R=25,7$  мин было идентифицировано как гиперозид (3-О-галактозид кверцетина,  $C_{21}H_{20}O_{12}$ , ММ = 464,085,  $\lambda_{max}=254$  и 370 нм) по совпадению УФ-спектра с базой данных, а также молекулярных весов неизвестного соединения и гиперозида. Такой вывод нельзя считать однозначным, т.к. подобными характеристиками обладает также изокверцетрин – 3-О-гликозид кверцетина, так как они отличаются только изомерами сахарной части. Данные, полученные для второго компонента, подходят для флавоноида микуелианина ( $C_{21}H_{18}O_{13}$ , ММ = 478,065,  $\lambda_{max}=254$  и 370 нм). Согласно результатам, полученным китайскими учеными при изучении флавоноидного состава экстрактов зверобоя продырявленного [6], почти невозможно разделить смесь трех флавоноидов – гиперозида, микуелианина и изокверцетрина, поэтому было решено, что пик с  $t_R=25,7$  мин состоит из смеси трех флавоноидов – гиперозида, микуелианина и изокверцетрина.

Пик с  $t_R=33,5$  мин имеет спектр поглощения, подобный апигенину. Масс-данные: отрицательные ионы с  $m/z = 537,073$  ( $[M-H]^-$ ); положительные ионы с  $m/z = 539,111$  ( $[M+H]^+$ ),  $561,097$  ( $[M+Na]^+$ ). Отсутствие фрагментных ионов исключает предположение, что это соединение – флавоноидный гликозид. Полученная нейтральная масса  $538,090$  соответствует формуле  $(C_{15}H_9O_5)_2$ . На основе полученных результатов можно отнести пик с  $t_R=33,5$  мин к флавоноидубиапигенину.

Таким образом, обнаруженные флавоноиды были идентифицированы как: рутин, кверцетрин, кверцетин, биапигенин, а также производные дигидрокверцетина. Один из пиков, вероятно, представляет собой смесь гиперозида, микуелианина и изокверцетрина.

Небольшое количество компонентов в экстракте *H. perforatum*, в основном представляющее производные кверцетина, позволяет не объединять их в группы, а проводить сравнение по каждому соединению. Для каждого образца были посчитаны площади под хроматографическими пиками и относительные содержания каждого в пересчете на минимальную площадь пика (таблица 1).

Таблица 1 – Соотношение основных фенольных компонентов в сырьевой части *H. perforatum*, культивируемых в различных регионах Западной Сибири (в пересчете на минимальную площадь пика)

Соединение	Регион выращивания		
	Камлак	Новосибирск	Кемерово
Астильбин	1,0	1,9	2,3
Производные кофейной кислоты	1,0	1,5	1,8
Смесь гиперозида, изокверцитрина, микуелианина	1,0	1,2	1,4
Рутин	1,1	1,0	1,9
Кверцитрин	1,0	2,2	1,7
Кверцетин	2,4	3,4	1,8
Биапигенин	1,6	2,1	1,0

Качественный состав основных компонентов фенольных соединений одинаков в образцах из всех регионов выращивания, но несколько различается соотношение компонентов.

#### Выводы

В зверобое продырявленном, выращенном в Западной Сибири, обнаружены флавоноиды: кверцетин и его гликозиды (рутин, гиперозид, изокверцитрин, кверцитрин и микуелианин), астильбин, биапигенин. Основные различия в растениях, выращенных в трех регионах (Республика Алтай, Новосибирская и Кемеровская области) связаны с содержанием и соотношением флавоноидов.

#### Список литературы

1. Berghöfer, R. Johaniskraut (*Hypericum perforatum* L.): Prüfung auf Verfälschung / R. Berghöfer, J. Hölzl // Deutsche Apothekerzeitung. – 1986. – Vol. 47, №126. – P. 2569–2573.
2. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS / T.S. Tatsis [et al.] // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 68, № 3. – P. 383–393.
3. Правдивцева, О.Е. Исследования по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного / О.Е. Правдивцева, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2008. – №1. – С. 81–86.
4. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / – 11-е изд. – М., 1990. – 400 с.
5. Беликов, В.В. Количественное определение основных действующих веществ у видов *Hypericum* L. / В.В. Беликов [и др.] // Растит. ресурсы. – 1990. – Т. 26, вып.4. – С.541–578.
6. Separation of epigallocatechin and flavonoids from *Hypericum perforatum* L. by high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography / Y. Yun Wei [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216, № 19. – P. 4313–4318.