

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС

Элькаиб Х.М., Феськова Е.В., Леонтьев В.Н., Игнатовец О.С.

Учреждение образования «Белорусский государственный  
технологический университет», г. Минск, leontiev@belstu.by

*Методом ВЭЖХ-МС установлено, что в водно-спиртовых экстрактах пажитника сенного содержится изоориентин, ориентин, витексин и изовитексин; тимьяна обыкновенного – диосмин, байкалин, розмариновая кислота и эриодиктиол; ромашки аптечной – кверцимеритрин и герниарин; ладанника шалфеелистного – кемпферол.*

**Введение.** Флавоноиды, содержащиеся в различных лекарственных растениях, являются фармакологически активной группой биологических веществ и обладают противовоспалительным, спазмолитическим, дезинфицирующим, кровоостанавливающим, регенерирующим, кардиопротекторным, антиоксидантным и др. действием.

Большинство исследований по идентификации индивидуальных флавоноидов в лекарственных растениях основаны на определении их физико-химических характеристик, что требует высокой степени очистки образцов. Оптимальным методом по идентификации флавоноидов в экстрактах лекарственных растений является метод ВЭЖХ-МС (последовательное использование диодноматричного и масс-спектрометрического детекторов). Данный метод обладает большой информативностью и позволяет определять структуру флавоноидов.

Объектами исследования были лекарственные растения пажитник сенной (*Trigonella foenum-graecum* L.), тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius* L.), приобретенные на рынке Ливии.

Цель исследования – анализ и идентификация флавоноидов в экстрактах вышеперечисленных растений.

**Экспериментальная часть.** Водно-спиртовую экстракцию проводили 50%-м этиловым спиртом в течение 2 суток при 20°C. Экстракты анализировали при помощи хроматомасс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C<sub>18</sub> 250×4,6 мм, 5мкм (Thermo Electron Corporation, США). Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспреей ионизацией (ESI). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : вода с 1% муравьиной кислоты в соотношении 20 : 80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в области положительных ионов. Параметры ионизации: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение

на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура десольватации – 350°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/час.

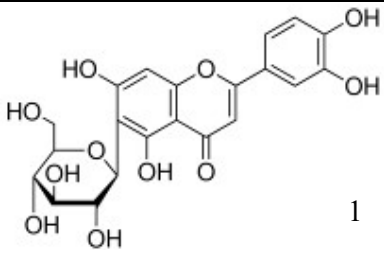
Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Mass Lynx».

Идентификацию флавоноидов проводили на основании масс- и электронных спектров, а также сравнением с литературными данными.

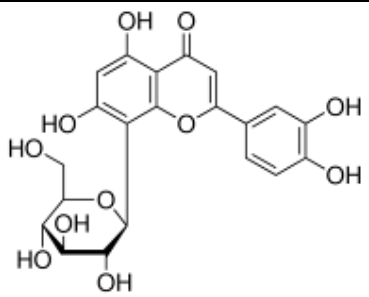
**Обсуждение результатов.** Результаты спектроскопического и масс-спектрометрического анализов представлены в таблицах 1-3. В экстракте флавоноидов пажитника сенного идентифицированы четыре соединения (таблица 1).

Таблица 1 – Флавоноиды, обнаруженные в экстракте пажитника сенного

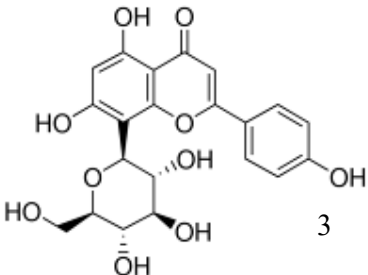
| Соединение | Время удержания, мин | Максимум поглощения, нм | (ESI) <sup>+</sup> m/z | Предполагаемое соединение |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 1          | 6,33                 | 232, 270, 349           | 431,54; 449,49         | изоориентин               |
| 2          | 7,10                 | 232, 268, 348           | 449,49                 | ориентин                  |
| 3          | 9,56                 | 233, 268, 337           | 433,52                 | витексин                  |
| 4          | 10,23                | 233, 270, 337           | 415,51; 433,52         | изовитексин               |



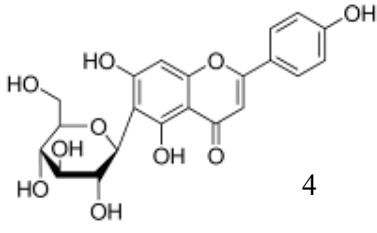
1



2



3



4

Электронные спектры соединений 1-4 имеют выраженные максимумы поглощения при 268-270 нм и при 337-349 нм, характерные для флавонов [2].

Для соединений 1 и 2 с временем удержания 6,33 и 7,10 мин был зарегистрирован пик молекулярного иона с m/z 449,49, а для соединений 3 и 4 был – пик молекулярного иона с m/z 433,52.

На основании электронных и масс-спектров сделали вывод о соответствии структуры соединений 1 и 2 флавону ориентину (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>), встречающегося в двух формах, ориентин (лютеолин 8-С глюкозид) и изоориентин (лютеолин 6-С глюкозид), соединений 3 и 4 – флавону витексину (апигенин 8-С глюкозид) (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>), встречающегося и в форме изовитексина (апигенин 6-С глюкозид).

Для флавонов моно-С-гексоз положение сахарного остатка может быть определено наличием в масс-спектре фрагмента  $[M-H_2O]$ . Фрагментация 6-С изомеров более обширная, дающая характерный ион  $[M-H_2O]$ , вероятнее всего из-за образования дополнительной водородной связи между 2''-гидроксильной группой сахара и 5- или 7-гидроксильной группой агликаона [7].

Таким образом, наличие в масс-спектре соединения 1 молекулярного иона с  $m/z$  431,54  $[M-H_2O]^+$  свидетельствует о том, что моно-С-гликозилирование произошло в 6 положении и соединение 1 относится к изоориентину, соответственно отсутствие молекулярного иона с  $m/z$  431,54 для соединения 2 свидетельствует о том, что данное соединение – ориентин.

Наличие в масс-спектре соединения 4 молекулярного иона с  $m/z$  415,51 (таблица 1), соответствующего  $[M-H_2O]^+$ , свидетельствует о том, что соединение с временем удержания 10,23 мин является изовитексином, а соединение с временем удержания 9,56 мин – витексином.

В экстракте флавоноидов тимьяна идентифицированы четыре соединения (таблица 2).

Таблица 2 – Флавоноиды, обнаруженные в экстракте тимьяна обыкновенного

| Соединение | Время удержания, мин | Максимум поглощения, нм | (ESI) <sup>+</sup> m/z | Предполагаемое соединение |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 5          | 19,89                | 233, 270, 342           | 301,70; 609,62         | диосмин                   |
| 6          | 21,98                | 235, 267, 332           | 271,68; 447,58         | байкалин                  |
| 7          | 25,18                | 235, 329                | 163,41; 461,67         | розмариновая кислота      |
| 8          | 41,68                | 235, 287                | 289,62                 | эриодиктиол               |

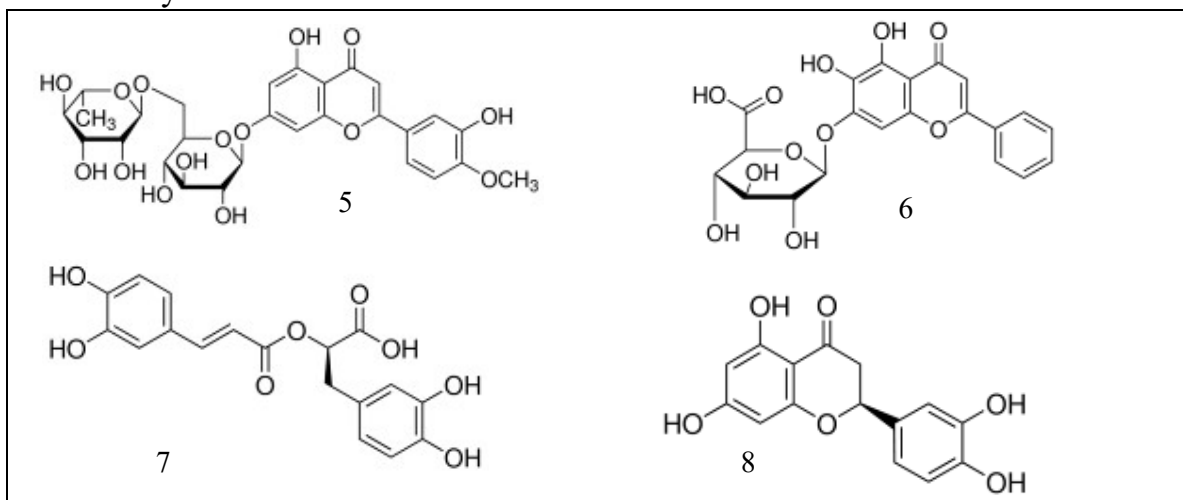
На основании данных электронного и масс-спектров, сделали вывод о соответствии структуры соединений 5 и 6 соответственно флавонам диосмину ( $C_{28}H_{32}O_{15}$ ) и байкалину ( $C_{21}H_{18}O_{11}$ ).

На масс-спектре молекулярный ион для соединения 5 с  $m/z$  609,62 соответствует  $[M+H]^+$ , наличие молекулярного иона с  $m/z$  301,70, относящегося к агликону диосмина – диосметину  $[M-2glu+H]^+$ , подтверждает структуру соединения 5. Аналогично для соединения 6 наличие в масс-спектре молекулярного иона с  $m/z$  271,68, относящегося к агликону байкалина – байкалеину  $[M-2glu+H]^+$ , и молекулярного иона с  $m/z$  447,58, соответствующего  $[M+H]^+$ , подтверждает, что соединения 6 относится к байкалину.

На основании данных электронного и масс-спектров, сделали вывод о соответствии структуры соединений 5 и 6 соответственно флавонам диосмину ( $C_{28}H_{32}O_{15}$ ) и байкалину ( $C_{21}H_{18}O_{11}$ ).

На масс-спектре молекулярный ион для соединения 5 с  $m/z$  609,62 соответствует  $[M+H]^+$ , наличие молекулярного иона с  $m/z$  301,70, относящегося к агликону диосмина – диосметину  $[M-2glu+H]^+$ , подтверждает структуру соединения 5. Аналогично для соединения 6 наличие в масс-

спектре молекулярного иона с  $m/z$  271,68, относящегося к агликону байкалина– байкалеину  $[M-2glu+H]^+$ , и молекулярного иона с  $m/z$  447,58, соответствующего  $[M+H]^+$ , подтверждает, что соединения 6 относится к байкалину.



Соединение 7 с временем удержания 25,18 мин имеет максимумы поглощения при 234 и 328 нм, что характерно для розмариновой кислоты ( $C_{18}H_{16}O_8$ ) [3-5]. В масс-спектре соединения 7 наблюдается молекулярный ион с  $m/z$  461,67, соответствующий  $[M+H]^+$  и характерный для розмариновой кислоты ион с  $m/z$  163,41, относящийся к  $[M-C_9H_{10}O_5+H]^+$  [6].

Максимум поглощения соединения 8 наблюдается при 286 нм, что соответствует максимуму поглощения флаванонов [2]. В области положительных ионов в масс-спектре наблюдается молекулярный ион с  $m/z$  289,62, что соответствует  $[M+H]^+$  (таблица 2). Таким образом соединение с временем удержания 41,66 мин можно отнести к эриодиктиолу ( $C_{15}H_{12}O_6$ ).

В экстракте флавоноидов ромашки аптечной идентифицированы соединения 9 и 10 (таблица 3).

Таблица 3– Флавоноиды, обнаруженные в экстракте ромашки аптечной

| Соединение | Время удержания, мин | Максимум поглощения, нм | (ESI) <sup>+</sup> m/z | Предполагаемое соединение |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 9          | 9,40                 | 232, 255, 315, 374      | 465,65                 | кверцимеритрин            |
| 10         | 34,63                | 232, 321                |                        | герниарин                 |

По результатам анализа электронного спектра соединение 9 относится к флавонолам. В масс-спектре соединения 9 с временем удержания 9,40 мин наблюдается молекулярный ион с  $m/z$  465,65, что соответствует молекулярному иону кверцимеритрина (кверцитин-7-О-глюкозид,  $C_{21}H_{20}O_{12}$ ).

В электронном спектре соединения с временем удержания 34,63 мин наблюдаются две полосы поглощения при 232 нм и при 321 нм, характерные для кумаринов [1]. В масс-спектре идентифицируется молекулярный ион с  $m/z$  177,53. Эти факты дают возможность предположить, что соединение 10 является герниарином ( $C_{10}H_8O_3$ ).

Анализ электронных и масс-спектров экстракта ладанника шалфеелистного позволил установить только соединение с временем удержания 15,58 мин, которое является кемпферолом, что подтверждается стандартом коммерческого препарата (Sigma, Франция).

Таким образом, используя метод ВЭЖХ-МС, удалось идентифицировать флавоноиды в водно-спиртовых экстрактах пажитника сенного: изоориентин, ориентин, витексин и изовитексин; тимьяна обыкновенного: диосмин, байкалин, розмариновая кислота и эриодиктиол; ромашки аптечной: кверцимеритрин и герниарин; ладанника шалфеелистного – кемпферол.

#### **Список литературы:**

1. Фитохимический анализ растений и сырья, содержащих простые фенольные соединения и кумарины [Электронный ресурс] / ИГМУ. – Режим доступа: [https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/515a2a94\\_metodicheskoe\\_posobie\\_po\\_kumarinam.pdf](https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/515a2a94_metodicheskoe_posobie_po_kumarinam.pdf) – Дата доступа: 07.08.2017.
2. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды [Электронный ресурс] / ИГМУ. – Режим доступа: [https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/346ae99c\\_metodicheskoe\\_posobie\\_po\\_flavonoidam.pdf](https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/346ae99c_metodicheskoe_posobie_po_flavonoidam.pdf). – Дата доступа: 07.08.2017.
3. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts / M. Öztürk [et al.] // Food Chemistry – 2010. – Vol. 123, Issue 4. – P. 1352-1356.
4. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet–visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary / N. Troncoso [et al.] // Journal of Chromatography A – 2005. – Vol. 1100, Issue 1. – P. 20-25.
5. Identification, Separation and Quantification of Rosmarinic Acid from Extract of Orthosiphon by HPTLC / M.E. Craciun [et al.] // REVISTA DE CHIMIE – 2014. – Vol. 65, Issue 6. – P. 621-626.
6. Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0003572) [Electronic resource] / The Human Metabolome Database (HMDB). – Mode of access: [http://www.hmdb.ca/spectra/ms\\_ms/109957](http://www.hmdb.ca/spectra/ms_ms/109957). Date of access: 08.08.2017.
7. Sakalem M.E., Negri G., Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus // Brazilian Journal of Pharmacognosy – 2012. – Vol.22, no.6. – P. 1219-1232.