

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦВЕТКОВ *RUDBECKIA HIRTA L.* И *ECHINACEA PURPUREA L.*

**Р. И. ЛУКАШОВ, Д. В. МОИСЕЕВ**

The botanical characteristic of *Echinacea purpurea L.* as the inserted species from the Republic of Belarus is given. Identification of raw *Echinacea purpurea L.* harvested in the territory of the Republic of Belarus is held. The alcohol extracts of *Echinacea purpurea L.* contained a significant amount of hydroxycinnamic acids and a few amount flavonoids. The flavonoid composition of *Rudbeckia hirta L.* compared with the composition of *Echinacea purpurea L.* flavonoids is more varied. The composition of *Echinacea purpurea L.* hydroxycinnamic acids is more diverse in comparison with the composition of *Rudbeckia hirta L.* flowers hydroxycinnamic acids. The total content of phenolic compounds (flavonoids and hydroxycinnamic acids) in flowers of *Echinacea purpurea L.* exceeds the content of phenolic compounds (flavonoids, hydroxycinnamic acids and anthocyanins) in the flowers of *Rudbeckia hirta L.* more than twice

Ключевые слова: *Echinacea purpurea L.*, *Rudbeckia hirta L.*, цветки, фитохимический состав.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Источником лекарственного растительного сырья являются лекарственные растения, произрастающие в различных частях света. Однако при введении в фармацевтическую и медицинскую практику новых видов лекарственных растений необходимо учитывать национальные запасы предлагаемого сырья, возможность его заготовки и культивирования в условиях умеренно континентального климата Республики Беларусь. Важным аспектом также является предшествующее использование изучаемого вида в народной медицине и гомеопатии.

Изучение нового вида лекарственного растительного сырья необходимо начинать с фитохимического анализа, чтобы определить основные группы биологически активных веществ и в последующем прогнозировать токсические свойства и специфическую фармакологическую активность растения.

Изучение химического состава органических соединений растения необходимо начинать с постановки качественных реакций, результаты которых носят ориентировочный характер и позволяют обнаружить группы биологически активных веществ. Определение групповой принадлежности биологически активных веществ является основой дальнейшего исследования, в частности выбора систем

растворителей и неподвижных фаз для тонкослойной хроматографии. Метод тонкослойной хроматографии рекомендуют как один из методов подтверждения подлинности (идентификации) лекарственного растительного сырья.

Углубленное фитохимическое изучение предлагаемого объекта проводят с использованием современных методов анализа, в частности с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет проводить полный химический анализ испытуемых образцов, включая идентификацию и количественное определение нативных веществ. Он является доступным, информативным (позволяет получить спектральные характеристики веществ) и высокочувствительным аналитическим методом.

Фенольные соединения являются одной из наиболее изученных групп соединений природного происхождения. Фенольные соединения встречаются практически у всех растений. Широкий спектр их терапевтической активности и низкий уровень системной токсичности делает их одними из важнейших соединений растительного происхождения при лечении и профилактике ряда патологий.

Род эхинацея (*Echinacea* Moench. – в переводе с греческого обозначает «колючий», так как прицветники игловидно заостренные и могут колоться). Родина рода – Северная Америка. Род эхинацея относится к семейству астровых (*Asteraceae*) и включает 11 видов. Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* Moench.) широко используется в медицине. Существует филогенетическая близость между родом рудбекии (*Rudbeckia* L.) и родом эхинацея, поэтому представляет интерес сравнить химические составы представителей обоих родов. Для сравнения взяты наиболее известные представители – *Rudbeckia hirta* L. и *Echinacea purpurea* L.

Целью настоящей работы является проведение сравнительного фитохимического анализа цветков *Rudbeckia hirta* L. и *Echinacea purpurea* L.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили цветки *Rudbeckia hirta* L. и *Echinacea purpurea* L., заготовленные на учебно-полевом участке в поселке Улановичи в 2011 г. в фазу цветения. Сырье подверглось воздушно-теневого сушке. Испытуемые извлечения получали с использованием 96% этанола (ч.д.а.) и воды высокоочищенной. Сырье до проведения анализа хранили в бумажных пакетах в сухом проветриваемом помещении.

*Условия хроматографирования:* хроматографическая колонка Zorbax SB 4,6 × 250 мм с размером частиц октадецильного силикагеля 5 мкм, температура колонки 30°C. Состав подвижной фазы: 0,01 М фосфатный буферный раствор с pH=3 и ацетонитрил. Соотношение варьировалось в зависимости от группы определяемых биологически активных соединений. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Режим элюирования изократический. Длины волн детекции 280, 360 и 530 нм.

В максимумах хроматографических пиков были записаны спектры поглощения в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм с шагом 1 нм. Идентификацию фенольных соединений проводили путем сравнения времен удерживания и спектров поглощения веществ в испытуемых извлечениях со стандартными образцами.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований дали ботаническую характеристику эхинацеи пурпурной как интродуцированного представителя флоры Республики Беларусь. Эхинацея пурпурная – многолетнее травянистое растение. Стебли цилиндрические, ребристые, голые или опушенные. Листья черешковые, продолговато-яйцевидные, яйцевидно-ланцетные или ланцетные, остроконечные, неравнокрупнозубчатые, реже цельнокрайние, с несколькими продольными жилками, жесткие, шероховатые от короткощетинистого опушения, при основании суживающиеся до слабосердцевидных. Черешок длинный, крылатый. Соцветие корзинка, которая состояла из шишковидного центра темно- или красно-коричневого цвета, окруженного венчиком из тонких лепестков розового цвета. Обертка блюдцевидная, трехрядная; листочки обертки черепитчато расположенные, ланцетные, остроконечные, отогнутые, опущенные с внешней стороны, голые по краям. Прицветники узколанцетные, с шиловидным окончанием, превышающие по длине трубчатые цветки. Краевые цветки язычковые, пестичные, бесплодные, с двух-, трехзубчатым отгибом, снаружи опушенным. Срединные цветки трубчатые, обоополые, с пятизубчатым венчиком. Плоды – обратнопирамидальные, четырехгранные, суженные к основанию семянки с хохолком в виде короны с неравномерными зубчиками. Корневище ветвистое, от красно-коричневого до темно-коричневого цвета снаружи, на изломе – волокнистое, белого цвета. Корни спирально изогнутые, от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, с иссеченной поверхностью. Цветет эхинацея пурпурная летом, начиная со второго года жизни, размножалась семенами.

На втором этапе исследования провели идентификацию сырья эхинацеи пурпурной. Стебли цилиндрические, ребристые, голые до 1 см толщиной и высотой 50-70 см. Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый, местами с розовато-красными или фиолетово-красными пятнами.

Листья черешковые, продолговато-яйцевидные, неравнокрупнозубчатые, с 3-5 продольными жилками, жесткие, шероховатые от короткощетинистого опушения, при основании суживающиеся до слабосердцевидных, 5-20 см длиной, 2,5-7,5 см шириной. Черешок длинный, крылатый. Цвет листьев зеленый.

Цветок состоит из шишковидного центра темно-коричневого цвета, окруженного венчиком из тонких лепестков. Обертка блюдцевидная, трехрядная; листочки обертки черепитчато расположенные, ланцетные, остроконечные, отогнутые, опущенные с внешней стороны, голые по краям. Прицветники узколанцетные, с шиловидным окончанием, превышающие по длине трубчатые цветки. Краевые цветки язычковые, длиной до 6 см, с двух-, трехзубчатым отгибом, снаружи опущенным. Срединные цветки трубчатые, с пятизубчатым венчиком. Цвет листочков обертки серовато-зеленый; цветков - розовато-красный или фиолетово-красный.

Корневище около 15 см длиной, ветвистое, от красно-коричневого до темно-коричневого цвета снаружи, на изломе - волокнистое, белого цвета.

Корни спирально изогнутые, от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, с иссеченной поверхностью.

Далее изучали химический состав эхинацеи пурпурной при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Времена удерживания гликозидов флавоноидов цветков *Echinacea purpurea* L. составили не более 10 мин, а агликона – превышали 30 мин. Флавоноидный состав *Rudbeckia hirta* L. по сравнению с составом флавоноидов *Echinacea purpurea* L. более разнообразен.

На рис. 1 представлена хроматограмма этанольного извлечения из цветков *Echinacea purpurea* L.

В цветках *Echinacea purpurea* L. обнаружены кафтаровая кислота, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, п-кумаровая кислота и три неидентифицированные гидроксикоричные кислоты (предположительно по спектрам поглощения, производные фенилкоричной кислоты).

В таблице 1 представлены данные по удельному содержанию гидроксикоричных кислот в фенольном комплексе цветков *Echinacea purpurea* L.

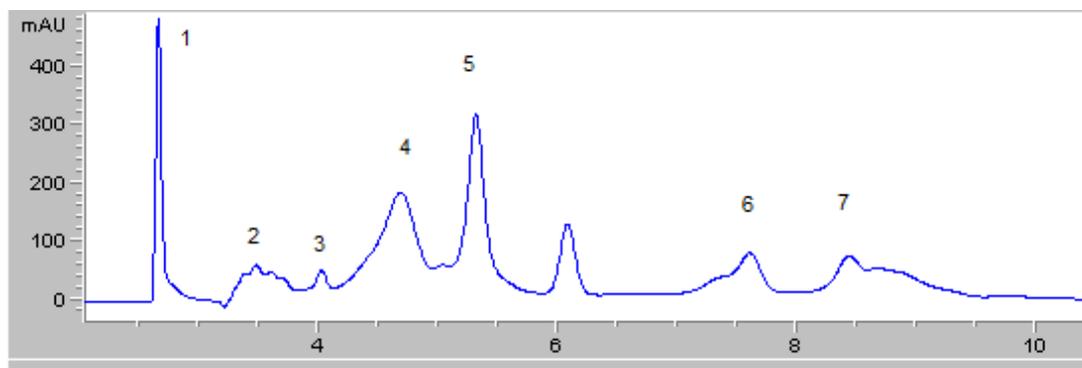


Рис. 1. Хроматограмма этанольного извлечения из цветков *Echinacea purpurea* L. при длине волны детекции 280 нм  
1 – кафтаровая кислота; 2 – хлорогеновая кислота; 3 – неидентифицированная гидроксикоричная кислота; 4 – неидентифицированная гидроксикоричная кислота; 5 – кофейная кислота; 6 – неидентифицированная гидроксикоричная кислота; 7 – п-кумаровая кислота

Таблица 1. Удельное содержание гидроксикоричных кислот в фенольном комплексе цветков *Echinacea purpurea* L. (в % от общей суммы)

Соединение	Относительное время удерживания	Удельное содержание, %
Кафтаровая кислота	0,8	14,3
Хлорогеновая кислота	1,0	3,4
Неидентифицированная гидроксикоричная кислота	1,2	3,6
Неидентифицированная гидроксикоричная кислота	1,4	26,1
Кофейная кислота	1,5	24,1
Неидентифицированная гидроксикоричная кислота	2,2	12,4
п-кумаровая кислота	2,6	16,1

\*Примечание: Относительные времена удерживания рассчитывали по отношению к хлорогеновой кислоте. Процентное содержание рассчитывалось методом внутренней нормализации, исходя из площадей отдельных пиков гидроксикоричных на хроматограмме и суммарной площади всех хроматографических пиков, принадлежащих гидроксикоричным кислотам.

Методом внутренней нормализации определено, что доминирующими компонентами цветков *Echinacea purpurea* L. являлись кофейная кислота и неидентифицированная гидроксикоричная кислота с относительным временем удерживания (по отношению к хлорогеновой кислоте) 1,4. Времена удерживания идентифицированных гидроксикоричных кислот составили от 2,5 до 9 мин. Спектры поглощения всех обнаруженных гидроксикоричных кислот содержали три максимума поглощения в диапазонах длин волн: 210 – 220, 226 – 242 и 310 – 326 нм. Вышеперечисленные соединения являются производными фенилкоричной кислоты и структурно отличаются друг от друга одним радикалом неароматического строения в боковой пропановой цепочке, что и обуславливает схожесть их спектров поглощения в ультрафиолетовой области. Состав гидроксикоричных кислот *Echinacea purpurea* L. более разнообразен по сравнению с составом гидроксикоричных кислот цветков *Rudbeckia hirta* L.

Оценили содержание в этанольных извлечениях из цветков *Rudbeckia hirta* L. и *Echinacea purpurea* L. суммы флавоноидов и суммы гидроксикоричных кислот. Растворы стандартных образцов готовили следующим образом: точную навеску флавоноида или гидроксикоричной кислоты помещали в мерную колбу, растворяли в небольшом объеме спирта и доводили спиртом до метки. Полученный раствор инжестрировали в хроматограф.

В таблице 2 представлены данные по сравнительному содержанию суммы флавоноидов и суммы гидроксикоричных кислот в цветках *Rudbeckia hirta* L. и *Echinacea purpurea* L.

Цветки *Rudbeckia hirta* L. содержали в два раза больше флавоноидов по сравнению с аналогичным сырьем *Echinacea purpurea* L. В это же время цветки *Echinacea purpurea* L. содержали в своем составе в четыре раза больше гидроксикоричных кислот, чем цветки *Rudbeckia hirta* L. Суммарное содержание фенольных соединений (флавоноидов и гидроксикоричных кислот) в цветках *Echinacea purpurea* L. превышает содержание фенольных соединений (флавоноидов, гидроксикоричных кислот и антоцианов) в цветках *Rudbeckia hirta* L. более чем в два раза.

Применен градиентный режим элюирования для улучшения разделения хроматографических пиков фенольных соединений *Echinacea purpurea* L.. В таблице 3 представлено изменение состава подвижной фазы во времени при градиентном элюировании.

На хроматограмме травы *Echinacea purpurea* L., предоставленной для анализа ООО «НПК Биотест», г. Гродно, отмечали пики каftarовой кислоты, хлорогеновой кислоты и цикориевой кислоты. Следует подчеркнуть, что эхинацея пурпурная, произрастающая на территории Республики Беларусь, не содержала в своем составе цикориевую кислоту (один из активных компонентов иммуностропного действия). В отличие от сырья импортного происхождения, предоставленного для анализа ООО «НПК Биотест», г. Гродно. Содержание суммы каftarовой и цикориевой кислот для травы эхинацеи пурпурной, предоставленной для анализа ООО «НПК Биотест», г. Гродно, составило 0,71%, что соответствует требованиям фармакопейной статьи «Эхинацеи пурпурной трава» (Государственная фармакопея Республики Беларусь, том 2) по разделу «Жидкостная хроматография». Пригодность хроматографической системы для жидкостной хроматографии характеризовалась разрешением между хроматографическими пиками. Пригодность хроматографической системы: разрешение между пиками кофейной кислоты и хлорогеновой кислоты не менее 5.

На рис. 2 представлена хроматограмма травы *Echinacea purpurea* L., предоставленной для анализа ООО «НПК Биотест», г. Гродно, в условиях градиентного элюирования.

Таблица 2. Сравнительное содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в цветках *Rudbeckia hirta* L. и *Echinacea purpurea* L.

Содержание веществ	<i>Rudbeckia hirta</i> L.	<i>Echinacea purpurea</i> L.
Сумма флавоноидов	1,14	0,60
Сумма гидроксикоричных кислот	0,74	3,31

\*Примечание: Расчет содержания действующих компонентов в мг произвели в пересчете на один грамм сухого сырья.

Таблица 3. Градиентный режим хроматографического анализа

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза В (% об/об)
0	90	10
0→13	90→78	10→22
13→14	78→60	22→40
14→20	60	40

\*Примечание: Подвижная фаза А: кислота фосфорная – вода (1: 999, об/об). Подвижная фаза В: ацетонитрил.

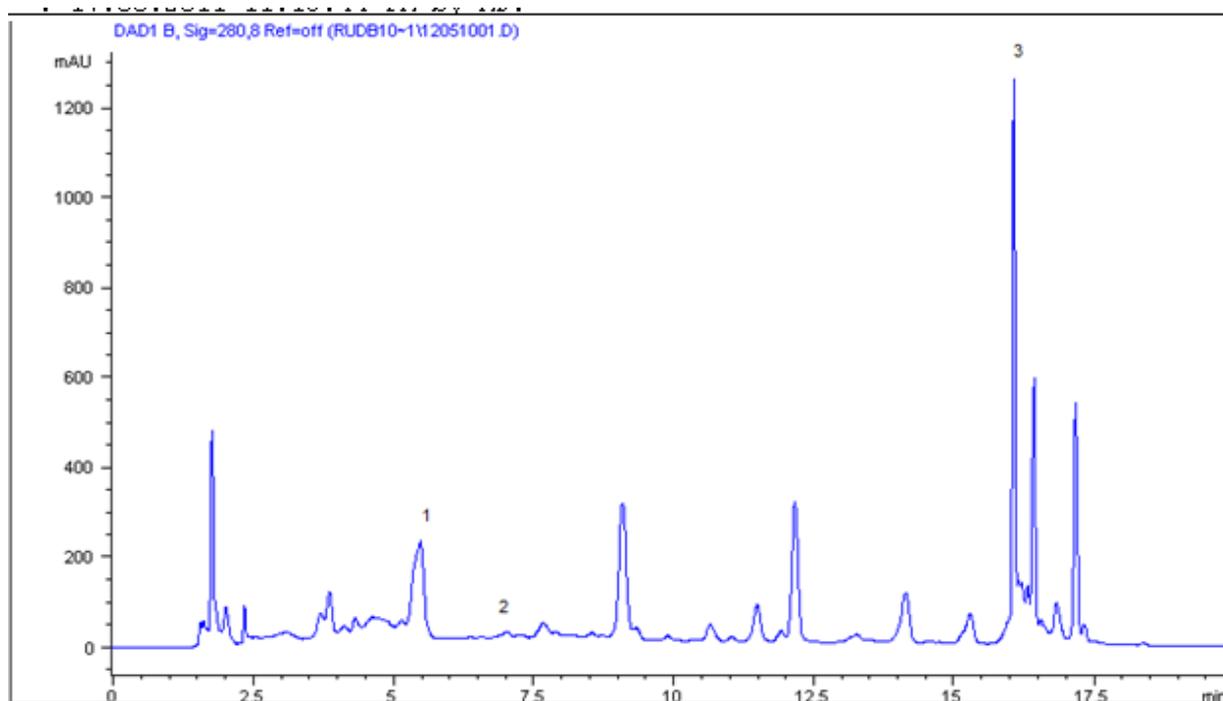


Рис. 2. Хроматограмма травы *Echinacea purpurea* L. в условиях градиентного элюирования: 1 – кафтаровая кислота; 2 – хлорогеновая кислота; 3 – цикориевая кислота

### Выводы

Дана ботаническая характеристика эхинацеи пурпурной как интродуцированному виду флоры Республики Беларусь. Проведена идентификация сырья эхинацеи пурпурной, заготовленной на территории Республики Беларусь. Этанольные извлечения из цветков *Echinacea purpurea* L. содержали значительное количество гидроксикоричных кислот и сравнительно мало флавоноидов. Флавоноидный состав *Rudbeckia hirta* L. по сравнению с составом флавоноидов *Echinacea purpurea* L. более разнообразен. Состав гидроксикоричных кислот *Echinacea purpurea* L. более разнообразен по сравнению с составом гидроксикоричных кислот цветков *Rudbeckia hirta* L. Суммарное содержание фенольных соединений в цветках *Echinacea purpurea* L. превышало содержание фенольных соединений в цветках *Rudbeckia hirta* L. более чем в два раза.