



## СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИЛИАНИНА

**Д.И. ПИСАРЕВ, О.О. НОВИКОВ  
О.С. ВОРОНКОВА, Н.А. ПИСАРЕВА**

*Белгородский  
государственный  
национальный  
исследовательский  
университет*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

В статье представлены результаты разработки простого и эффективного способа выделения тилианина и предложена его идентификация на основании применения УФ-спектроскопии с пифт-реактивами и масс-спектрометрии.

Ключевые слова: флавоноиды, тилианин, УФ-спектрофотометрия, масс-спектрофотометрия.

В настоящее время интерес, проявляемый к изучению флавоноидов специалистами разных направлений, существенно возрос. Причина этого заключается в их значительной биологической роли в живых системах и разнонаправленном фармакологическом действии. Для флавоноидов достоверно установлены такие фармакологические эффекты, как иммуностимулирующий, противоопухолевый, кардио-, гепато- и геропротекторный, антитромбоцитный, противоаллергический, противовирусный, гипохолестеринемический, капилляроукрепляющий, эстрогенный.

Доминирующее действие флавоноидов – антирадикальное, связанное с наличием в их структуре фенольных гидроксиллов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях радикального типа. В этих реакциях флавоноиды выступают в роли восстановителей – доноров электронов по отношению к какому-либо радикальному агенту, переходя в свою окисленную форму – флавоксильный радикал [3].

Флавоноиды – кристаллические вещества, ограниченно растворимые в спирте, этилацетате, не растворимы в хлороформе, дихлорэтаноле, бензоле, бензине, растворимы в разбавленных растворах едких щелочей. Флавоноидные гликозиды не растворимы в холодной и растворимы в горячей воде. Плохую растворимость в холодной воде используют для очистки флавоноидов от полярных веществ растворением в горячей воде и осаждением при охлаждении.

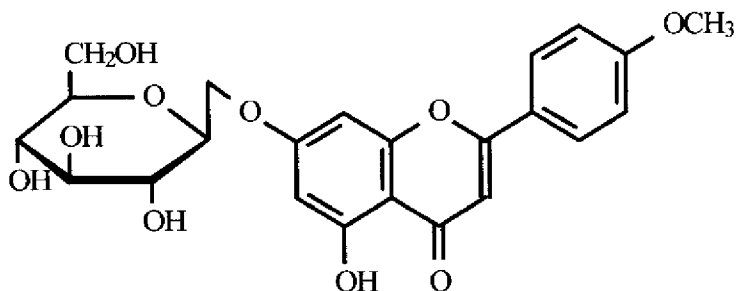
Методы выделения и очистки флавоноидных гликозидов основаны на их специфических свойствах, в основном на растворимости.

Существует множество методов выделения флавоноидов. К классическим методам можно отнести экстракцию этиловым спиртом или кипящей водой с последующей очисткой путём замены одного растворителя другим (спирта нагретой водой), экстракцией жидкости жидкостью (в качестве экстрагента чаще всего используют этилацетат или его смесь со спиртом), а также колоночной хроматографией на полиамидном сорбенте с избирательным элюированием сопутствующих и действующих веществ [5].

У таких методов выделения и очистки имеются достоинства и недостатки. Основным недостатком их является многостадийность, длительность по времени выделения, использование токсичных органических растворителей (этилацетат, хлороформ, диэтиловый эфир).

Данная разработка посвящена способу выделения и установления строения тилианина.

Тилианин – акацетин-7-гликозид, флавоноид, у которого выявлен антиатерогенный эффект за счет уменьшения ЛПНП, а также способность ингибировать опухоли эндотелиальных клеток пупочной вены человека [6].



Структура тилианина

В литературе описан способ выделения тилианина из травы многоколосника морщинистого, недостаток которого заключается в многостадийности и использовании токсичных растворителей.

Цель работы – предложить малостадийный, быстрый, безопасный способ выделения тилианина и установления его строения.

В качестве объекта для выделения тилианина была использована трава лофанта анисового.

100,0 г воздушно-сухого сырья лофанта анисового экстрагировали спиртом этиловым 70% в аппарате «Сокслет» до полного истощения сырья. Полученное извлечение в количестве 250 мл упаривали досуха под вакуумом на ротационном испарителе. Остаток в колбе растворяли в 100 мл горячего насыщенного водного раствора калия хлорида (KCl) ( $t \sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$ ), добавляя его небольшими порциями. Промывные воды быстро фильтровали через бумажный фильтр в горячем виде под вакуумом с помощью колбы Бунзена и воронки Бюхнера. Полученный водный раствор охлаждали в холодильнике. По истечении суток из водного извлечения наблюдалось выпадение обильного жёлтого-коричневого осадка, который отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин). Осадок сушили в течение суток в эксикаторе над безводным кальция хлоридом. Выход полученного продукта составил 0,7 г, который представлял собой коричневато-жёлтый аморфный порошок без запаха, растворимый в спирте этиловом, нерастворимый в воде, хлороформе и эфире.

Для очистки продукта его подвергали перекристаллизации. Для этого его помещали в колбу ёмкостью 100 мл, колбу присоединяли к обратному холодильнику и растворяли при нагревании в минимальном количестве спирта этилового 96%. Полученный раствор доводили до кипения – до полного растворения продукта и небольшими порциями через обратный холодильник добавляли хлороформ до тех пор, пока осадок, появляющийся в месте падения капли хлороформа, ещё растворялся. Полученный раствор доводили до кипения и фильтровали горячим. Колбу с фильтратом закрывали и оставляли для охлаждения в холодильнике. Спустя сутки из фильтрата выпадал жёлтый кристаллический осадок. Надосадочную жидкость декантировали, а осадок высушивали в эксикаторе над кальция хлоридом безводным.

Выход выделенного вещества из 100,0 г травы лофанта анисового – 0,5 г. Оно представляло собой жёлтый кристаллический порошок, хорошо растворимый в спирте этиловом, мало растворимый в воде, нерастворимый в эфире и хлороформе.

Для отнесения выделенного вещества к группе флавоноидов использовали качественные реакции и результаты хроматографирования.

Анализируемое вещество давало положительную цианидиновую пробу по Синоду и отрицательную по Брианту, что свидетельствует о его гликозидной природе.

Хроматографирование осуществляли в тонком слое силикагеля на пластинках «Сорбфил» в системе этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (10:1:1:2,6). Хроматограмму просматривали в УФ-свете и проявляли хромогенными реактивами: парами 25% аммония гидроксида, 5% спиртовым раствором алюминия хлорида, 10% водным раствором натрия карбоната (результаты приведены в таблице).

**Результаты качественных реакций анализируемого флавоноида  
на хроматограмме в тонком слое силикагеля**

Окраска пятна при проявлении реактивами			
УФ-свет	УФ-свет + NH <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> 5% спиртовый р-р в УФ-свете	5% водный р-р натрия карбоната
Тёмно-жёлтая	Ярко- жёлтая	Ярко-жёлтая	Жёлтая

Для определения структуры выделенного вещества нами использован подход, заключающийся в сочетании двух методов: УФ-спектрофотометрии и масс-спектрометрии, что позволяет с предельной точностью экспрессно идентифицировать выделенное соединение.

Для установления расположения гидроксильных групп в структуре соединения использовали шифт-реактивы.

Используя УФ-спектрофотометрию с шифт-реактивами, можно добиться выявления определённых диагностических признаков в структуре исследуемого соединения, в частности, расположение гидроксильных групп и их гликозидирование. После добавления шифт-реактива в исходном спектре происходит сдвиг полос поглощения, и по характеру этих изменений делается вывод о наличии в соединении определённых структурных фрагментов [1, 2]. Привлечение масс-спектрометрии информирует о молярной массе вещества, а совпадение характера фрагментации неизвестного вещества и соединения предполагаемой структуры позволяет надёжно охарактеризовать строение соединения в целом [4].

В УФ-спектре вещества наблюдалось два максимума поглощения при  $\lambda = 268$  и  $322$  нм, что свидетельствует о флавоновой природе вещества (рис. 1).

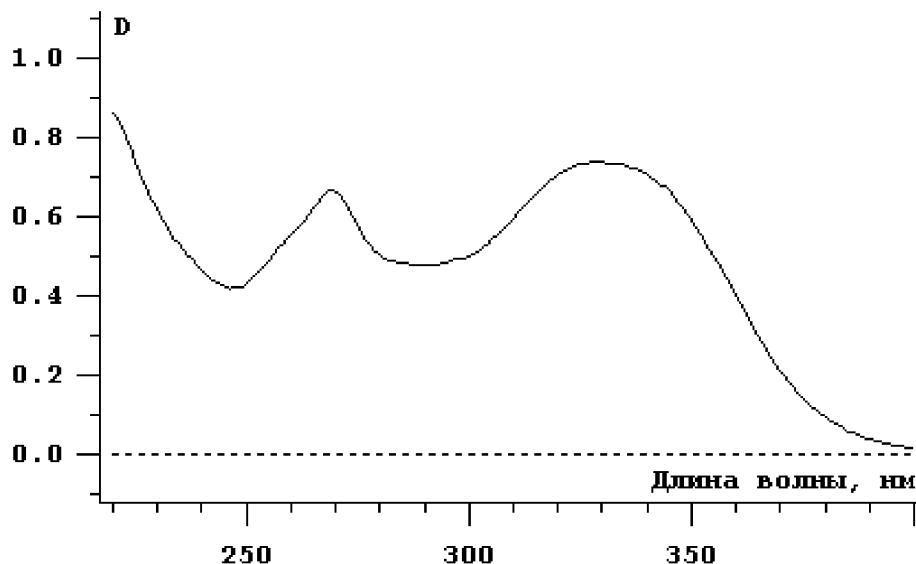


Рис. 1. УФ-спектр анализируемого вещества

При использовании шифт-пробы с алюминия хлоридом наблюдался батохромный сдвиг обеих полос поглощения, который понижался при добавлении кислоты хлористоводородной, что свидетельствует о свободной гидроксильной группе в 5 положении (рис. 2 и 3).

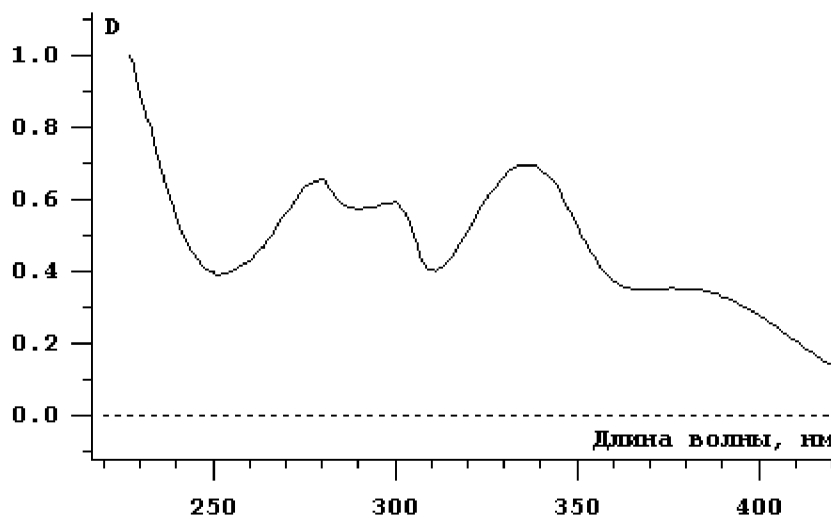


Рис. 2. УФ-спектр анализируемого вещества с использованием шифт-реактива алюминия хлорида

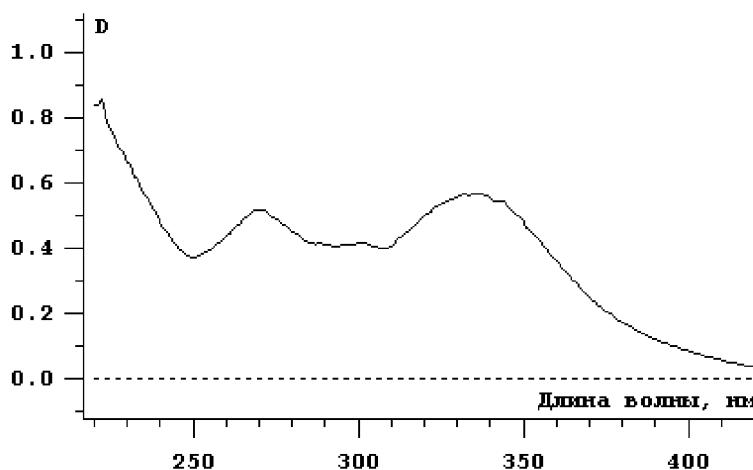


Рис. 3. УФ-спектр анализируемого вещества с шифт-реактивом алюминия хлоридом в присутствии кислоты хлористоводородной концентрированной

При добавлении ацетата натрия не наблюдалось батохромии первой полосы поглощения, что свидетельствует об отсутствии свободной гидроксильной группы в положении 7.

Добавление этилата натрия вызывало снижение интенсивности I полосы поглощения со сдвигом, что свидетельствует о замещённой 4'-ОН группе (рис. 4):

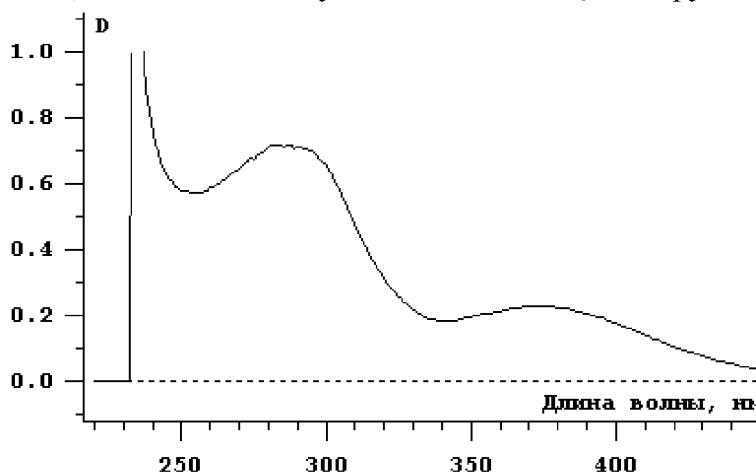


Рис. 4. УФ-спектр анализируемого вещества с этилатом натрия

Масс-спектр выделенного вещества регистрировали на аппарате Autoflex II, с использованием в качестве матрицы  $\alpha$ -цианокоричной кислоты. В масс-спектре обеих изучаемых веществ наблюдался один наиболее интенсивный пик иона  $m/z$  иона = 285,369, соответствующий агликону акацетину, и менее выраженный пик иона  $m/z$  = 447,269, отвечающий его гликозидной структуре (рис. 5).

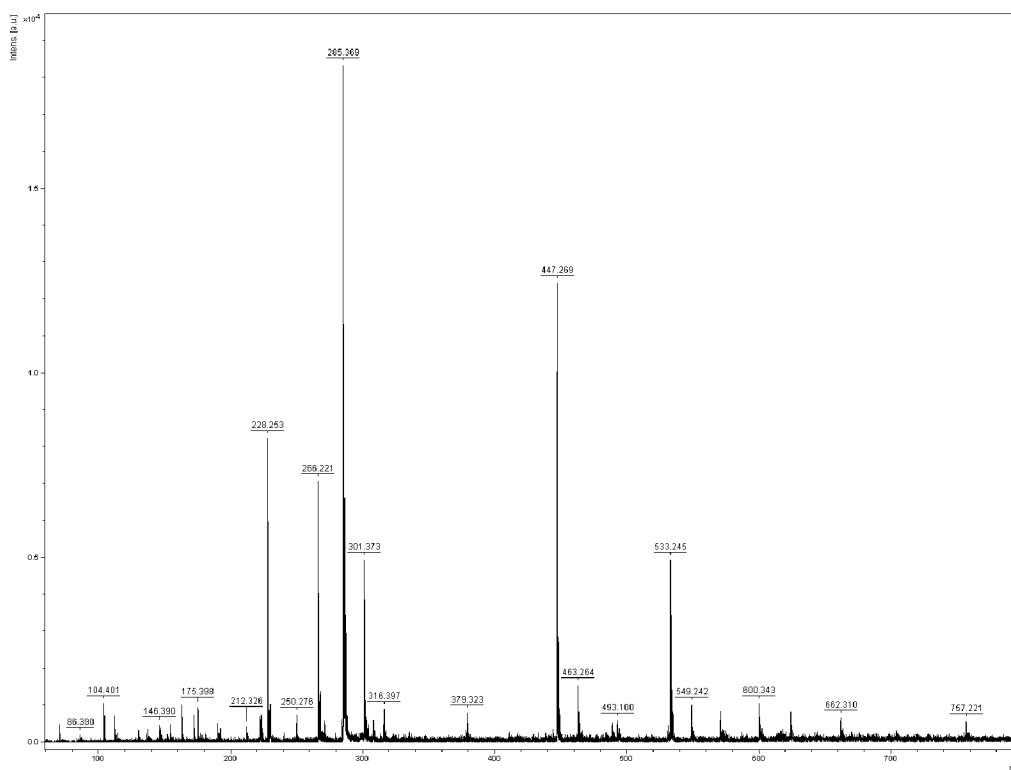


Рис. 5. Масс-спектр выделенного вещества

Для идентификации сахара, находящегося в 7-м положении, необходимо было провести кислотный гидролиз. Для этого 0,1 г анализируемого вещества помещали в колбу для гидролиза, заливали смесью  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 50% $\text{H}_2\text{SO}_4$  (соотношение 1:1) присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. После охлаждения выпавший осадок отделяли фильтрованием. Фильтрат нейтрализовывали бария карбонатом до нейтральной реакции среды по лакмусу и хроматографировали в тонком слое силикагеля в системе растворителей: этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (10:1:1:2,6) со свидетелями нейтральных сахаров. Проявляли путём нагревания в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 10 минут. Сахара проявлялись в виде коричневых пятен. Таким образом была идентифицирована глюкоза.

По совокупности результатов исследования можно утверждать, что выделенное нами вещество – акацетин-7-гликозид.

В результате исследований предложен простой, эффективный способ выделения тилианина и его идентификация на основании применения УФ-спектроскопии с шифт-реактивами и масс-спектрометрии.

*Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., государственный контракт № П425 от 12 мая 2010 г. «Разработка методик выделения и определения полифенольных соединений классов флавоноидов, каротиноидов и антоцианов и технологии создания лекарственных форм на их основе».*

### Литература

1. Клышев, Л.К. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования) / Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 220 с.  
Коренькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Коренькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстикова; Рос. Акад. Наук, Сиб. отд., Новосибир. Ин-т органической химии. – Новосибирск: Академическое изд-во «Тео», 2007. – 232 с.



2. Органическая химия: учеб. для вузов: в 2 кн. Кн 2: Специальный курс / Н.А. Тюкавкина, С.Э. Зурабян, В.Л. Белобородов и др.: под ред. Н.А. Тюкавкиной. – М.: Дрофа, 2008. – 592 с.
3. Отто, М. Современные методы аналитической химии. Изд. 2-е, испр. – М.: Техносфера, 2006. – 416 с.
4. Химия и технология фитопрепаратов: учеб. пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭО-ТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
5. Honga, J.-J. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa* / J.-J. Honga, J.-H. Choia, S.-R. Ohb et al. // FEBS Letters. – 2001. – Vol.495. – P. 142-147.

## METHOD OF SELECTION AND IDENTIFICATION OF TILIANIN

**D.I. PISAREV, O.O. NOVIKOV**  
**O.S. VORONKOVA, N.A. PISAREVA**

*Belgorod National Research University*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

The paper presents results of a simple and effective way to highlight tilianin and offered his identification on the basis of UV spectroscopy with shift-reagents and mass spectrometry.

Key words: flavonoids, tilianin, UV spectrophotometry, mass spectrophotometry.