



УДК 615.322

## ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО СОСТАВА И РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ТРАВЫ РЕПЕШКА ОБЫКНОВЕННОГО

**Н.А. ПИСАРЕВА  
Д.И. ПИСАРЕВ  
О.О. НОВИКОВ  
И.А. СЕВРУК  
О.А. ВАНХИН**

*Белгородский  
государственный  
национальный  
исследовательский  
университет*

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

Статья посвящена химическому изучению полифенолов репешка обыкновенного. Авторами использованы современные инструментальные методы определения полифенолов, а именно высокоэффективная жидкостная хроматография и метод масс-спектрометрии в варианте *MALDI/TOF/MS*. В результате установлено, что в состав полифенолов репешка обыкновенного входят гликозиды кверцетина, лютеолина, апигенина и кемпферола. Оксикоричные кислоты представлены *p*-кумаровой и кофейной кислотами. Характерно присутствие значительного количества кислоты эллаговой. Методом *MALDI/TOF/MS* кроме указанных флавоноидов удалось обнаружить проантоцианидины. На основании установленного состава полифенолов репешка обыкновенного предложено их количественное определение в сырье с использованием абсолютной градуировки методом ОФ ВЭЖХ в пересчёте на гиперозид и лютеолин-7-гликозид.

Ключевые слова: репешок обыкновенный, ОФ ВЭЖХ, *MALDI/TOF/MS*, полифенолы, флавоноиды, оксикоричные кислоты.

Несмотря на широкое распространение флавоноидов в природе, для изготовления лекарственных препаратов круг наиболее ценных растений невелик, поэтому выявление перспективных источников флавоноидов представляет несомненную актуальность [1].

Одним из таких перспективных объектов является репешок обыкновенный.

Репешок обыкновенный – *Agrimonia eupatoria* – в настоящее время не является официальным растительным сырьем в нашей стране, хотя успешно применяется в нетрадиционных лечебных практиках.

По последним данным зарубежных исследователей у репешка обыкновенного выявлен ряд совершенно уникальных фармакологических свойств. В первую очередь следует подчеркнуть влияние полифенольных соединений репешка на ингибирование вируса гепатита В, герпеса, гриппа и вируса Ауески. Также в эксперименте у спиртовых извлечений выявлено противодиабетическое, антиоксидантное и противовоспалительное действие [2].

Вышеперечисленные фармакологические эффекты определяют несомненную актуальность всестороннего изучения данного растения, в том числе с позиции химического состава. В связи с этим нахождение оптимальных путей установления химического состава и стандартизации суммарного фитокомплекса на основе репешка обыкновенного представляется весьма целесообразным.

**Целью** настоящего исследования явилось химическое изучение полифенолов репешка обыкновенного для стандартизации его сырья.

Для анализа биологически активных веществ репешка обыкновенного использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию. Предварительно комплекс полифенолов репешка обыкновенного экстрагировали спиртом этиловым 70%-ным.

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «*Agilent Technologies 1200 Infinity*».

Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «*Agilent ChemStation*».

Качественное определение флавоноидов и оксикоричных кислот выполняли методом ОФ ВЭЖХ.

Испытания проводили с использованием стальных хроматографических колонок, наиболее подходящей из которых оказалась: *Reprosil-Pur C18-AQ 150 мм×2 мм*, с размером частиц 3 мкм.

Сумму полифенолов репешка подвергали хроматографическому разделению в следующих условиях: подвижная фаза: (А) – 4% водный раствор кислоты фосфорной, (Б) – ацетонитрил в градиентном режиме элюирования; скорость подвижной фазы – 0,25 мл/мин.; температура колонки +35 °С; объем вводимой пробы 5 мкл.

Состав подвижной фазы представлен в табл. 1.

Таблица 1

**Условия градиентного элюирования полифенолов репешка обыкновенного**

Время, мин.	А, %	Б, %
0	90	10
10	80	20
20	70	30
30	50	50
40	10	90

Детектирование осуществляли для флавонов и флавонолов при 360 нм, для оксикоричных кислот при 325 нм.

Относительное содержание индивидуальных флавоноидов и оксикоричных кислот определяли как отношение площади хроматографического пика и суммы площадей пиков всех идентифицированных флавоноидов и оксикоричных кислот по формуле 1:

$$X_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S} \tag{1}$$

где  $S_i$  – среднее значение площади пика компонента на хроматограммах суммы;

$\sum S$  – среднее значение суммы всех площадей пиков на хроматограммах.

При хроматографировании полифенолов репешка обыкновенного методом ОФ ВЭЖХ установлено, что основными флавоноидами являются гликозиды кверцетина – кверцетин-3-галактозид (гиперозид), лютеолина – лютеолин-7-глюкозид, апигенина – апигенин-7-глюкозид, кемпферола – кемпферол-3-глюкозид, а также дигидрокверцетин и кверцетин (рис. 1, 2).

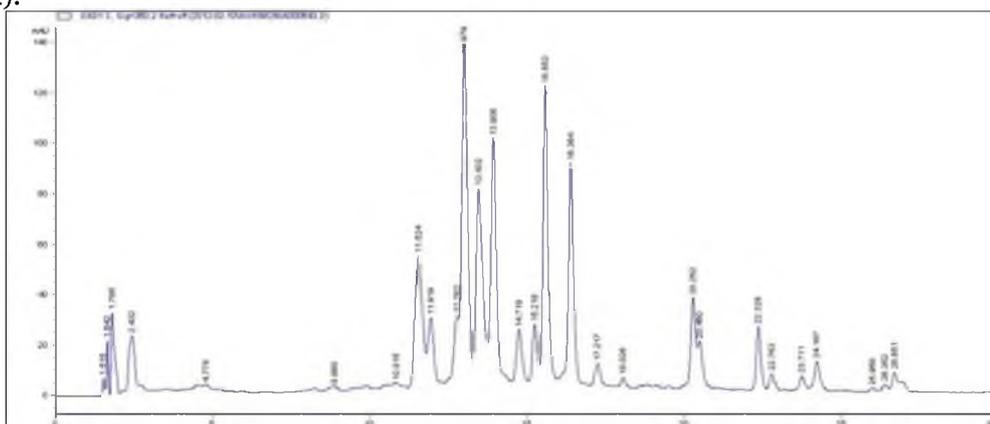


Рис. 1. Хроматограмма разделения флавоноидов травы репешка обыкновенного (детекция диодно-матричная  $\lambda = 360$  нм)

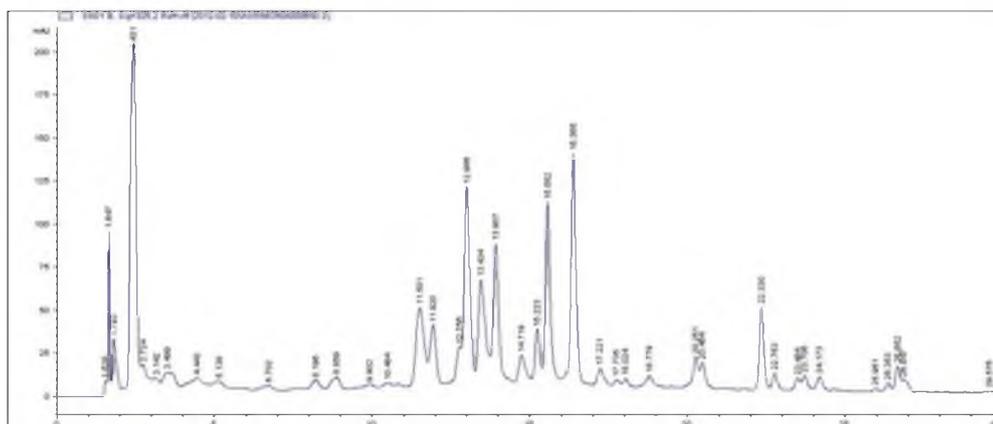


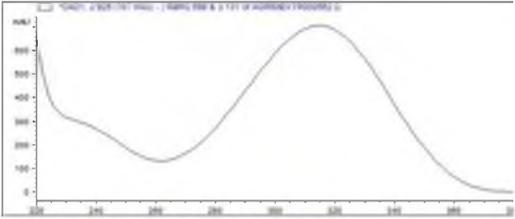
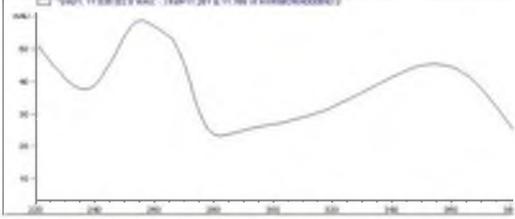
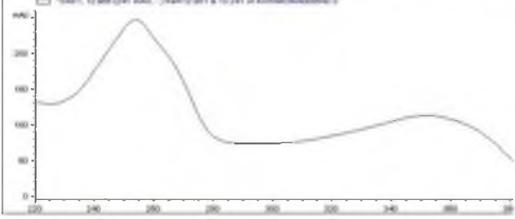
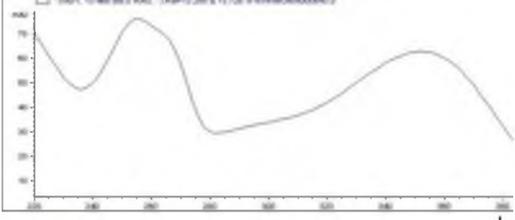
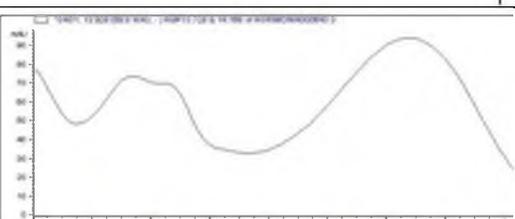
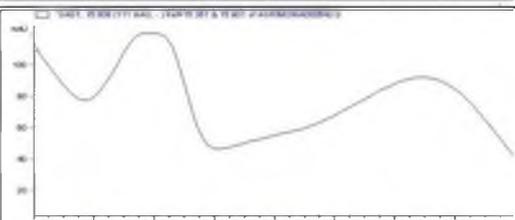
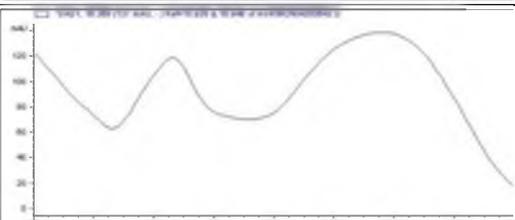
Рис. 2. Хроматограмма разделения флавоноидов травы репешка обыкновенного (детекция диодно-матричная  $\lambda = 325$  нм)

Из оксикоричных кислот наибольшее количество приходится на кислоту кофейную. Фенолокислоты представлены кислотой эллаговой. Компонентный состав полифенолов репешка обыкновенного представлен в табл. 2.



Таблица 2

## Компонентный состав полифенолов травы репешка обыкновенного

Время удерживания, мин	УФ-спектр	Содержание внутри группы, %	Относительное содержание в сумме, %	Идентифицированный компонент
2,43		61,1	27,0	П-кумаровая кислота
11,53		13,2	7,4	Гликозид кверцетина
12,955		29,6	13,0	Эллаговая кислота
13,468		17,0	9,5	Кверцетин-3-галактозид (гиперозид)
13,928		18,0	10,1	Лютеолин-7-глюкозид
15,5		23,6	13,2	Кемферол-3-галактозид
16,36		19,6	11,0	Апигенин-7-глюкозид

Общее процентное распределение полифенолов травы репешка обыкновенного представлено на рис. 3.

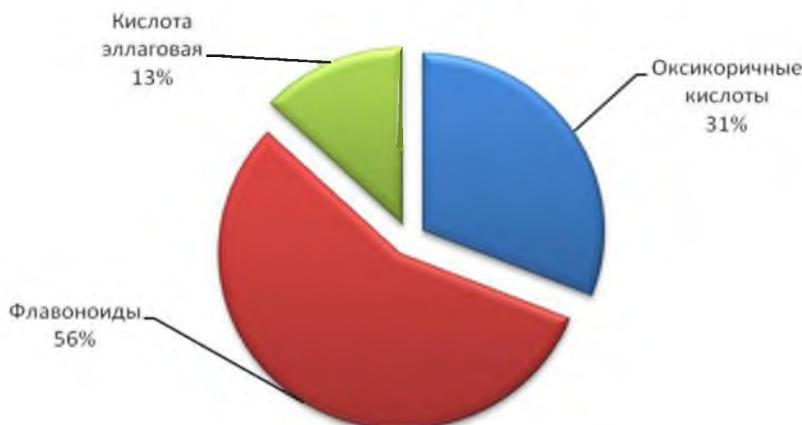


Рис. 3. Процентное распределение полифенолов травы репешка обыкновенного

Из диаграммы следует, что доминирующими полифенолами в траве репешка обыкновенного являются флавоноиды (56,0% в сумме), также примечательно достаточно высокое содержание эллаговой кислоты (13,0%).

Процентное распределение флавоноидов в траве репешка обыкновенного представлено на рис. 4.

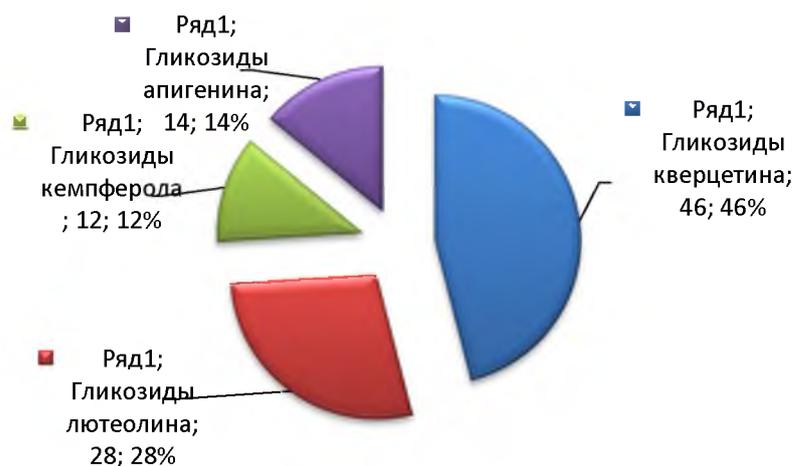


Рис. 4. Процентное распределение флавоноидов в траве репешка обыкновенного

Таким образом, данные представленные в табл. 2 и рис. 4, свидетельствуют, что основными флавоноидами репешка обыкновенного являются гликозиды кверцетина, кемпферола, лютеолина и апигенина.

Однако метод ВЭЖХ не всегда удобен из-за его низкой пропускной способности и большой продолжительности исследований. Поэтому дополнительно использовали масс-спектрометрический метод анализа.

Регистрацию масс-спектров проводили на приборе масс-спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics производства Германии. Предварительно анализируемый раствор в количестве по 0,5 µl наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel TF», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали α-цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы «Flex Control», обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis», в отражённом режиме при положительной поляризации (*reflective positive*).

В масс-спектре полифенольного комплекса наблюдаются интенсивные пики молекулярных ионов с  $m/z = 433,299; 449,248$  и  $487,221$ , принадлежащие гликозидным формам флавоноидов в монозидной форме, что наблюдается по характерной фрагментации с образованием молекулярных пиков ионов агликонов с  $m/z = 271,350; 287,320$  и  $303,291$ , принадлежащих апигенину, лютеолину/кемпферолу и кверцетину (рис. 5).

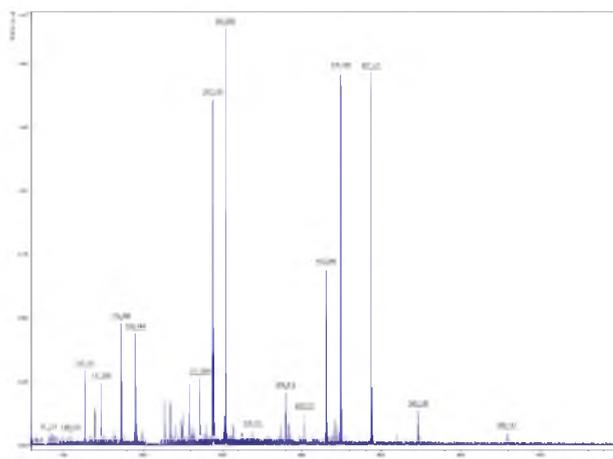


Рис. 5. Масс-спектрометрический профиль флавоноидов репешка обыкновенного

Помимо молекулярных пиков флавоноидов с помощью *MALDI/TOF/MS* удалось обнаружить присутствие проантоцианидинов по их типичным молекулярным массам с  $m/z = 593,291$  и  $607,443$  с характерной фрагментацией [67] (рис. 6).

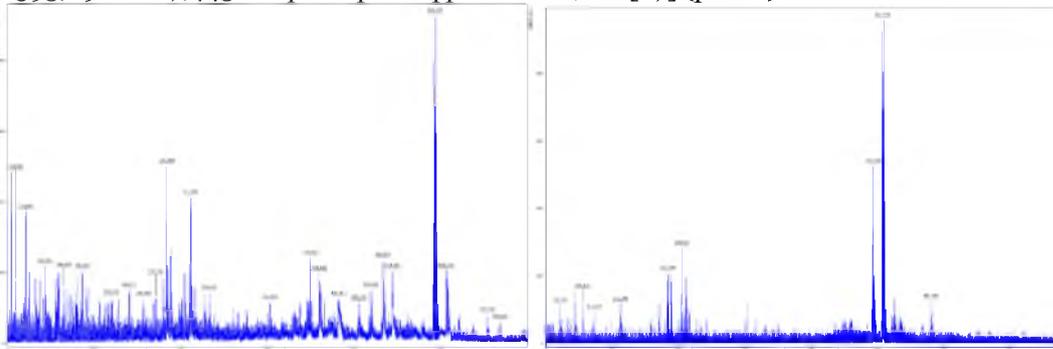


Рис. 6. Масс-спектрометрический профиль проантоцианидинов репешка обыкновенного

Таким образом, с помощью метода *MALDI/TOF/MS* удалось подтвердить наличие флавоноидов, детектированных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Кроме того, *MALDI/TOF/MS* оказался более чувствительным к проантоцианидинам, которых на хроматограммах, полученных методом ОФ ВЭЖХ, не наблюдалось.

Количественное определение флавоноидов проводили методом абсолютной градуировки (внешнего стандарта). В качестве стандартных образцов веществ свидетелей (СОВС) использовали гиперозид и лютеолин-7-глюкозид, как основные компоненты фитокомплекса.

Далее у анализируемых компонентов измеряли площади пика и на основании градуировочных графиков рассчитывали их количество по формуле 2:

$$x = \frac{C_{ст} \times W \times 100}{m \times (100 - B)}, \quad (2)$$

где  $C_{ст}$  – количество суммы флавоноидов, найденных по калибровочному графику, %

$m$  – масса навески образца;

$W$  – разведение образца;

$B$  – потеря в массе при высушивании образца.

Результаты количественного определения травы репешка обыкновенного представлены в табл. 3-4.

Таблица 3

**Результаты количественного определения гиперозида в траве репешка обыкновенного**

№ п/п	Масса навески сырья, г	Содержание гиперозида (X), %	S	$\Delta\bar{X}$	$\varepsilon$ , %
1	2	3	4	5	6
1	1,05	3,12	0,013	0,032	1,03
2	1,09	3,15			
3	1,12	3,14			



Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6
4	1,10	3,16			
5	1,11	3,18			
6	1,16	3,23			
7	1,12	3,17			
		$\bar{X} = 3,16$			

Таблица 4

**Результаты количественного определения лютеолин-7-глюкозида в траве репешка обыкновенного**

№ п/п	Масса навески сырья, г	Содержание лютеолин-7-глюкозида (X), %	S	$\Delta\bar{X}$	$\epsilon$ , %
1	1,05	1,32	0,02	0,05	3,7
2	1,09	1,26			
3	1,12	1,29			
4	1,10	1,41			
5	1,11	1,37			
6	1,16	1,39			
7	1,12	1,34			
		$\bar{X} = 1,34$			

Из данных табл. 3-4 следует, что содержание гиперозида в траве репешка обыкновенного составило  $3,16 \pm 0,032\%$ , лютеолин-7-глюкозида –  $1,34 \pm 0,005\%$ . Ошибка единичного определения при погрешности Р, 95% во всех случаях не превышала 5,0%, что укладывается в диапазон, рекомендуемый ГФ.

Таким образом, в ходе настоящего исследования установлен химический состав травы репешка обыкновенного, предложена его стандартизация по содержанию гиперозида и лютеолин-7-глюкозида.

**Литература**

1. Георгиевский, В. П. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений / В. П. Георгиевский, А. И. Рыбаченко, А. Л. Казаков ; отв. ред. Н. Ф. Комисаренко ; Сев.-Кавказ. науч. центр. вып. шк. – Ростов н/Д : Изд-во Ростов. ун-та, 1988. – 144 с.
2. Дикорастущие полезные растения России : [справ.] / Ботан. ин-т Рос. акад. наук [и др.] ; отв. ред. А. Л. Буданцев, Е. Е. Лесниковская. – СПб. : Изд-во СПбХФА, 2001. – 663 с.

**THE STUDY OF THE POLYPHENOL COMPOSITION AND WORKING METHODS OF ASSESSING THE QUALITY OF GRASS OF REPESHKO ORDINARY**

**N.A. PISAREVA  
D.I. PISAREV  
O.O. NOVIKOV  
I.A. SEVRUK  
O.A. VANHIN**

*Belgorod National  
Research University*

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

Article is devoted to the study of chemical polyphenols of Repeshko usual. The authors used modern instrumental methods for determining the polyphenols , namely the high performance liquid chromatography and mass spectrometry method in embodiment MALDI / TOF / MS. As a result, it was found that the polyphenols in the ordinary Repeshko includes quercetin glycosides, luteolin, apigenin, and kaempferol. Hydroxycinnamic acid presented p-coumaric and caffeic acids. Characterized by the presence of significant amounts of ellagic acid . Method MALDI / TOF / MS except as indicated flavonoids have found proanthocyanidins . Based on the set of polyphenols Repeshko proposed ordinary quantification of their raw materials using absolute calibration by RP HPLC calculated as hyperoside and luteolin -7- glucoside.

Keywords: agrimony ordinary RP-HPLC, MALDI / TOF / MS, polyphenols , flavonoids, hydroxycinnamic acid.