

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АУКУБИНА В СЫРЬЕ И ПРЕПАРАТАХ ПОДРОЖНИКА БОЛЬШОГО

А.А. Жогова^{1,2*}, И.А. Самылина¹, член-корр. РАН, докт. фарм. наук, профессор,
К.И. Эллер², докт. хим. наук, профессор

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;

119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

²НИИ питания РАН,

109240; Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

*E-mail: zhogovaaa@yandex.ru

Разработана ВЭЖХ-методика определения аукубина в листьях подорожника большого. С помощью этой методики определено содержание аукубина в сырье и препаратах (настой, настойка, сок) подорожника большого. Согласно полученным результатам, разработанную методику целесообразно использовать для стандартизации сырья, препаратов и БАД к пище на основе подорожника большого.

Ключевые слова: подорожник большой, *Plantago major* L., иридоиды, аукубин, содержание, ВЭЖХ.

Подорожник большой (*Plantago major* L.) — многолетнее травянистое растение семейства подорожниковых (*Plantaginaceae*). Листья подорожника большого обладают широким спектром фармакологической активности. Препараты подорожника большого усиливают секрецию бронхиальных желез, способствуют нормализации свойств сурфактанта дыхательных путей и восстановлению функций реснитчатого эпителия, оказывают обволакивающее и муколитическое действие, а также проявляют противовоспалительную, иммуномодулирующую, кровооста-

навливающую, противоаллергическую, анальгезирующую, гипотензивную и антиоксидантную активность. Кроме того, указанные препараты стимулируют регенерацию тканей, усиливают секреторную деятельность желез желудка и кишечника [1, 4, 5, 8, 10, 11].

Листья подорожника большого содержат полисахариды (полигалактоуронаны, арабиногалактаны, глюкоманнаны и др.), иридоиды (аукубин), фенолпропаноидные гликозиды (плантамайозид), флавоноиды (производные апигенина и лютеолина), органические кислоты, аскорбиновую кислоту, витамин К, каротиноиды [8, 12].

Листья подорожника большого применяют для получения водных извлечений (настой), настойки, препаратов, а свежую траву используют для получения сока. Согласно ст. 20 Государственной фармакопеи XI издания, вып. 2 стандартизацию сырья проводят по содержанию полисахаридов гравиметрическим методом. Однако определение суммы полисахаридов в сырье, предназначенном для получения спиртовых экстракционных препаратов листьев подорожника большого, не рационально.

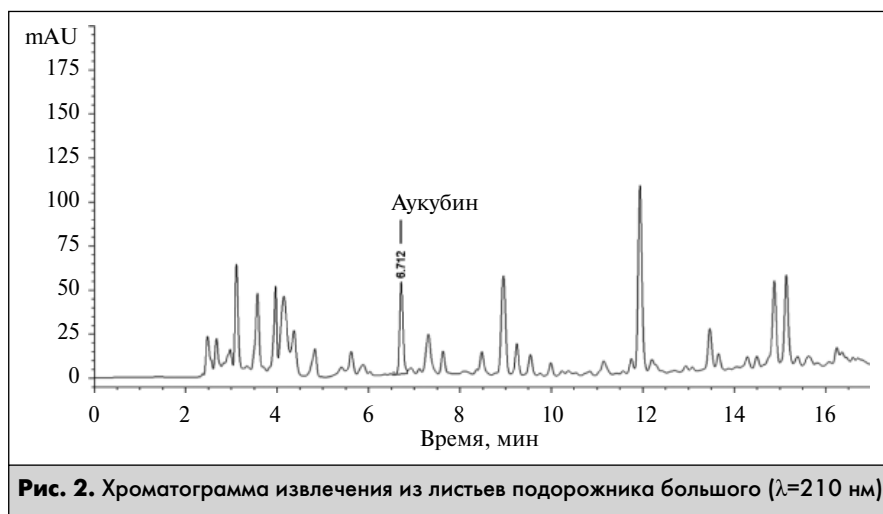
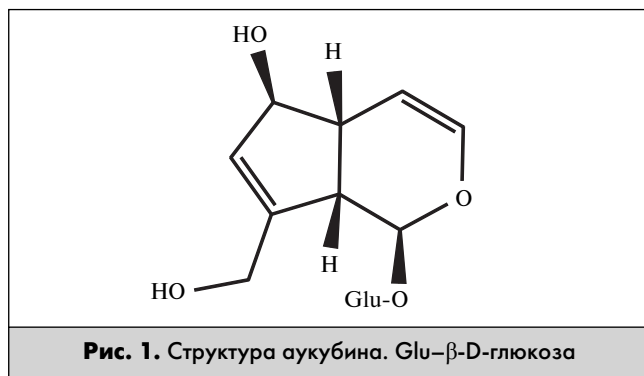
Основной иридоидный гликозид подорожника большого аукубин (рис. 1) экстрагируется как в водные, так и в водно-спиртовые растворы. Аукубин обладает широким спектром фармакологической активности. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана его противовоспалительная, спазмолитическая, ранозаживляющая, гепатопротекторная, иммуномодулирующая и противовирусная активность [2–4, 7, 6, 9].

Из многообразия хроматографических методов для идентификации и количественного определения иридоидов чаще всего используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Данный метод сочетает в себе высокую эффективность разделения компонентов с селективностью и чувствительностью применяемых детекторов.

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения аукубина в сырье и препаратах (настой, настойка, сок) подорожника большого с помощью метода ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-детектированием.

Экспериментальная часть

Объектами исследования явились 5 образцов сушovesудушного сырья подорожника большого, заго-



товленных в различных областях России: образцы 1–3 – в Московской обл., образец 4 – во Владимирской обл., образец 5 – в Тамбовской обл., 6 промышленных образцов сырья подорожника различных производителей (измельченные листья, фасованные в пакеты, – ЛИ1, ЛИ2, ЛИ3; порошок листьев в фильтр-пакетах – ФП1, ФП2, ФП3; а также 2 образца сока подорожника большого (С1, С2) и настойка подорожника (Н1).

Аукубин по структуре является гликозидом, растворимым в воде и водно-спиртовых растворах. Исходя из этого подобрали оптимальные условия экстракции аукубина из листьев подорожника большого. В ходе эксперимента изучали влияние состава экстрагента (вода, 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70% этиловый спирт) и времени экстракции на водяной бане (15, 30, 60 мин) на полноту извлечения аукубина. Наиболее полное извлечение аукубина было получено экстракцией 30% этиловым спиртом в течение 60 мин.

Иридоидный гликозид аукубин в своей структуре содержит большое число полярных групп, поэтому в анализе целесообразно применение обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ). Подобрали оптимальные условия разделения на колонке С18. В качестве подвижной фазы (ПФ) опробовали смеси воды с ацетонитрилами/или метиловым спиртом в различных соотношениях с добавками 0,05–0,1% муравьиной, уксусной или фосфорной кислот для улучшения формы пика. Наилучшие параметры хроматографического разделения были получены при использовании градиентного элюирования водой, содержащей 0,05% фосфорной кислоты, и ацетонитрилом.

Аукубин не имеет в своей структуре сильных хромофоров, поэтому детектирование с использованием детектора на фотодиодной матрице проводили при длине волны 210 нм. Структуру аукубина дополнительно подтверждали с помощью масс-селективного детектора (МСД). В анализе с помощью масс-спектрометрии (МС) в качестве добавки в ПФ вместо фосфорной использовалась муравьиная кислота.

Анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с диодно-матричным детектором Agilent 1100 Series Diode Array, время пролетным МСД Agilent6200 TOF LC/MS с ионизацией электрораспылением, автосемплером и программным обеспечением обработки хроматографических данных MassHunter. Стандартным об-

разцом (СО) служил метанольный раствор аукубина ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich).

Методика количественного определения. *Высушенное сырье.* Около 2 г (точная навеска) листьев подорожника большого, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 70 мл 30% спирта и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Извлечение отфильтровывают в колбу вместимостью 100 мл. Шрот и фильтр промывают 30 мл экстрагента, доводят объем раствора в колбе до метки и перемешивают.

Соки и настойки. 10 мл сока или настойки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Настои. Настои готовили из промышленных образцов измельченного сырья и сырья в фильтр-пакетах, согласно инструкции на упаковке: измельченное сырье из расчета 10 г на 100 мл воды, фильтр-пакеты – 3 г (2 фильтр-пакета) на 100 мл воды. 1 мл полученных извлечений центрифугировали на скорости 12000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость исследовали, проводя не менее 3 повторений.

Условия ВЭЖХ: колонка Prote Col C18NPH125 (5 мкм, 250×4,6 мм); градиентное элюирование в системе 0,05% водный раствор фосфорной кислоты (при использовании МС – муравьиной кислоты) (А) – ацетонитрил (В) (0 – 20 мин, 5 – 30% В; 20 – 25 мин, 30 – 50% В; 25 – 26 мин, 50 – 5% В; 26 – 30 мин, 5% В); температура колонки – 30°C; расход элюента – 1 мл/мин (при использовании МС – 0,5 мл/мин). Объем вводимой пробы – 10 мкл. Общее время анализа – 30 мин. Аналитическая длина волны – 210 нм. Сканирование масс проводят в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне m/z 150–1000. Рабочие параметры источника ионизации: напряжение на капилляре – 3,5 кВ, поток газа-осушителя (азот) – 10 л/мин, температура – 325°C, давление на распылителе – 0,34 МПа.

Хроматограмма извлечения из листьев подорожника большого представлена на рис. 2. Время удерживания аукубина – $6,7 \pm 0,1$ мин.

Метрологические характеристики методики при определении содержания аукубина представлены в табл. 1. Относительная ошибка единичного определения с 95% доверительной вероятностью составила $\pm 2,2\%$, что свидетельствует о воспроизводимости методики. Относительная ошибка при проведении анализа в 3 повторностях не превышала $\pm 1,28\%$. Поэтому в методиках рекомендуется проводить анализ в 3 повторностях.

Результаты количественного определения содержания аукубина в сырье подорожника большого с использованием разработанной методики представлены в табл. 2. Содержание аукубина в образцах высушенного сырья составляло от 1,16 до 5,68 мг/г.

Определено содержание аукубина в промышленных образцах листьев подорожника большого и настоях, полученных из этого сырья. Установлена степень перехода аукубина в водные извлечения (табл. 3).

Содержание аукубина в промышленных образцах измельченного сырья, фасованного в пачки, колебалось от 1,86 до 7,07 мг/г. Концентрация аукубина в настоях варьировала от 0,05 до 0,21 мг/мл, что в пересчете на сухое сырье составило от 0,95 до 4,62 мг/г. Степень перехода вещества в водные извлечения составила от 44,9 до 60,3%.

Таблица 1

**МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АУКУБИНА
В ЛИСТЬЯХ ПОДРОЖНИКА БОЛЬШОГО (n=6)**

Содержание аукубина, x	\bar{x} , мг/г	f	S \bar{x}	P, %	t(P;f)	Δx	ε , %
3,02; 3,02; 3,08; 3,03; 3,00; 3,05	3,02	5	0,026	95	2,57	0,067	$\pm 2,2$

Таблица 2

**СОДЕРЖАНИЕ АУКУБИНА В ЛИСТЬЯХ
ПОДРОЖНИКА БОЛЬШОГО (n=3)**

Образец	1	2	3	4	5
Содержание аукубина, мг/г	1,75	5,68	3,02	3,80	1,16

Таблица 3

**СОДЕРЖАНИЕ АУКУБИНА В ПРЕПАРАТАХ
ПОДРОЖНИКА БОЛЬШОГО (n=3)**

Содержание	Образец					
	ЛИ1	ЛИ2	ЛИ3	ФП1	ФП2	ФП3
Сырье, мг/г	1,86	2,45	7,07	5,08	2,28	1,17
Настой, мг/мл	0,05	0,06	0,21	0,08	0,04	0,02
Настой в пересчете на сырье, мг/г	0,95	1,10	4,26	2,70	1,29	0,72
Степень извлечения в настоях, %	51,2	44,9	60,3	53,1	56,6	61,5

Содержание аукубина в образцах сырья в фильтр-пакетах составляло от 1,17 до 5,08 мг/г. В приготовленных настоях концентрация варьировала от 0,02 до 0,08 мг/мл, что в пересчете на сухое сырье составило от 0,72 до 2,70 мг/г. Степень перехода аукубина в водные извлечения из фильтр-пакетов составила от 53,1 до 61,5%, что в среднем превышало аналогичный показатель для измельченного сырья. Это, возможно, объясняется большей степенью измельченности сырья в фильтр-пакетах, а также большим соотношением сырье–экстракт.

Определено достаточно высокое содержание аукубина в настойке и соках подорожника большого. Содержание аукубина в соке подорожника (образцы С1 и С2) составило 0,30 и 0,41 мг/мл соответственно, в настойке подорожника – 0,38 мг/мл.

Согласно полученным результатам, разработанную методику можно использовать для стандартизации сырья и препаратов подорожника большого. Следовательно, норма содержания аукубина в листьях подорожника большого должна быть не менее 0,1%.

Выводы

1. Разработана ВЭЖХ-методика количественного определения аукубина в листьях подорожника большого с относительной ошибкой единичного определения $\pm 2,2\%$.

2. По разработанной методике определено содержание аукубина в образцах высушенного сырья подорожника большого (1,16 – 5,68 мг/г), в промышленных образцах измельченного сырья в пачках и сырья в фильтр-пакетах (1,17 – 7,07 мг/г), в настойке (0,38 мг/мл) и соке подорожника большого (0,30 – 0,41 мг/мл).

3. В настоях листьев подорожника большого концентрация аукубина колебалась от 0,02 до 0,21 мг/мл. Степень перехода вещества в настой составила от 44,9 до 61,5%.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Atta A.H., El-Sooud K.A. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 95: 235–238.
2. Chang I.M. Antiviral activity of aucubine against hepatitis B virus replication. *Phytoterapy Research*, 1997; 11: 189–192.
3. Chang I.M. Liver-protective activities of aucubine derived from traditional oriental medicine. *Research Communication in Molecular Pathology and Pharmacology*, 1998; 102: 189–204.
4. Chiang L.-Ch., Ng L.T., Chiang W. et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Plantamedica*, 2003; 69. (7): 600–604.
5. Nyunt T.M., Lwin K.K., Aye T.T. et al. Antihypertensive effect of *Plantago major* L. whole plant on mild to moderate hypertensive patients. *Myanmar Health Sciences Research Journal*, 2007; 19: 97–102.
6. Ortiz de Urbina A.V., Martin M.L., Fernandez B. et al. *In vitro* antispasmodic activity of peracetylated pempinose, aucubine and catalpol. *Plantamedica*, 1994; 60: 512–515.
7. Park K.S., Bong Hyun Kim B.H., Chang I.-M. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in vitro. *eCAM*, 2010; 7. (1): 41–45.
8. Samuelsen A.B. The Traditional Uses, Chemical Constituents and Biological Activities of *Plantago major* L. A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000; 71: 1–21.
9. Shim K.M., Choi S.H., Jeong M.J. et al. Effects of aucubin on the healing of oral wounds. *In vivo*, 2007; 21. (6): 1037–1041.
10. Sourji E., Amin G., Farsam H. et al. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU*, 2008; 16. (2): 83–87.
11. Türel I., Özbek H., Erten R. et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian journal of pharmacology*, 2009; 41. (3): 120.
12. Zubair M., Nybom H., Lindholm C. et al. Genetic variation, biochemical contents and wound healing activity of *Plantago major* L. *SciHortic*, 2011; 128: 523–529.

Поступила 28 марта 2014 г.

DETERMINATION OF AUCUBIN IN THE GREATER PLANTAIN (*PLANTAGO MAJOR* L.) RAW MATERIALS AND PREPARATIONS

A.A. Zhogova^{1,2}; Professor I.A. Samylina¹, PhD; Professor K.I. Eller², PhD

¹*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991*

²*Research Institute of Nutrition, Russian Academy of Sciences; 2/14, Ustyinsky Proezd, Moscow 109240*

SUMMARY

An HPLC procedure was developed to determine aucubin in the greater plantain (*Plantago major*) leaves. The relative error of single determination at 95% confidence interval was $\pm 2.2\%$. The developed procedure could determine the amount of aucubin in greater plantain raw materials and preparations (infusion, tincture, juice). The content of aucubin in the samples of dried raw materials was 1.16 to 7.07 mg/g. Fairly high aucubin levels were determined in the greater plantain tincture (0.38 mg/ml) and juice (0.30–0.41 mg/ml). The findings suggest that the developed procedure should be used to standardize greater plantain raw materials, preparations, and supplements.

Key words: greater plantain, *Plantago major* L., iridoids, aucubin, content, high-performance liquid chromatography.