

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ МЕТОДОМ ВЭЖХ

П.Е. Худенко*, Н.С. Терёшина, доктор фармацевтических наук,
С.Л. Морохина, кандидат фармацевтических наук

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;
Российская Федерация, 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2

Введение. Трава якорцев стелющихся используется для получения противосклеротических лекарственных препаратов, применяется в гомеопатической практике и народной медицине. Она содержит стероидные сапонины и флавоноиды. Для совершенствования стандартизации сырья и препаратов якорцев необходимы исследования химического состава лекарственного растительного сырья.

Цель работы – углубленное изучение состава флавоноидов травы якорцев стелющихся.

Материал и методы. Объектом исследования служила высушенная трава якорцев стелющихся, заготовленная в 2015 г. в Крыму. Флавоноиды в сырье определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Waters Acquility с тандемным квадрупольным МС-детектором TQD.

Результаты и обсуждение. Исследованы выделение и идентификация флавоноидов в траве якорцев стелющихся. Методом ВЭЖХ-МС установлено наличие рутина, кемпферол-3-рутинозида, рамнетин-3-рутинозида, изорамнетин-3-рутинозида, тамараксетин-3-рутинозида, азалестин-3-рутинозида.

Заключение. Уточнен состав флавоноидов травы якорцев стелющихся. Идентифицировано 6 соединений.

Ключевые слова: якорцы стелющиеся, *Tribulus terrestris* L., трава, ВЭЖХ, флавоноиды.

*E-mail: pavel_khudenko@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Якорцы стелющиеся – *Tribulus terrestris* L. – однолетнее, полиморфное, экологически пластичное растение семейства парнолистниковых – *Zygophyllaceae*, произрастающее во всем мире, широко распространено в субтропической зоне, встречается в сухих степях на юге Европейской части России, а также в полупустынях Средней Азии и Восточной Сибири. На неполивных землях оно отмечено на стойбищах и как рудеральное растение [1, 2]. Трава якорцев стелющихся содержит стероидные сапонины (протодиосцин, прототрибестин, псевдопротодиосцин, кикубасапонин, протограциллин; диосгенин, диосцин, трибестин, трибулозин, триллин, грациллин, гитогенин, хлорогенин, рускогенин, трибуспонин), найдены также флавоноиды – рутин, кверцетин, изокверцитрин, кемпферол, кемпферол-3-глюкозид, астрагалин [2–9].

Трава якорцев стелющихся используется для получения противосклеротических лекарственных препаратов, применяется в гомеопатической практике и народной медицине [11, 13, 14]. Для совершенствования стандартизации сырья и препаратов якорцев актуальны исследования химического состава лекарственного растительного сырья [12].

Цель настоящей работы – углубленное изучение состава флавоноидов травы якорцев стелющихся.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила высушенная трава якорцев стелющихся, заготовленная в 2015 г. в Крыму. Трава представляла собой смесь бороздчатых стеблей с продолговатыми отдельными листочками сложного парнопериного листа с беловатым опушением, плодов пятизвездчатой формы, с морщинистой оболочкой и острыми твердыми шипами; реже встречались отдельные сложные плоды с 2 и 4 шипами, стебли – зеленовато-желтого цвета, плоды – светло-зеленые, листья – зеленые, запах сырья – слабый [10].

Флавоноиды в траве якорцев стелющихся определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Waters Acquility с тандемным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters) [15]. Условия определения: подвижная фаза А (ПФ А): смесь вода – ацетонитрил (95:5) с муравьиной кислотой; подвижная фаза В (ПФ В): ацетонитрил с муравьиной кислотой. Испытуемый раствор и растворы стандартов хроматографировали в следующих условиях: объем пробы – 5 мкл; колонка – 0,21×15,0 см Acquility UPLCBEHC18 (1,7 мкм); температура колонки – 35°C; скорость потока – 0,3 мл/мин; УФ-детекция – 220–500 нм. Градиентный режим хроматографирования формировался путем смешивания подвижных фаз А и В по следующей схеме:

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	95	5
30	50	50
32	0	100
33	95	5
36	95	5

МС-детекция проводилась в режиме позитивных и негативных ионов. Параметры детектора при режиме позитивных ионов: напряжение на капилляре – +3 кВ; напряжение на конусе – 50 В; температура капилляра – 450°C; температура источника – 120°C; скорость потока осушающего газа – 800 л/ч; скорость потока газа в конусе – 50 л/ч; сканирование в диапазоне масс – от 100 до 1500 ед. Параметры детектора в режиме негативных ионов: напряжение на капилляре – -3 кВ; напряжение на конусе – -30 В; температура капилляра – 350°C; температура источника – 120°C; скорость потока осушающего газа – 500 л/ч; скорость потока газа в конусе – 50 л/ч; сканирование в диапазоне масс – от 100 до 1500 ед. В качестве стандартов использовали рутин, лютеолин и диосмин.

Извлечение из травы якорцев стелющихся готовили по следующей методике: около 2 г сырья

(точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 60 мл 70% этилового спирта и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтр промывали 10 мл 70% этилового спирта и доводили объем раствора в колбе 70% этиловым спиртом до метки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа флавоноидов в смеси стандартов и извлечений из травы якорцев стелющихся в режимах позитивных и негативных ионов представлены на рис. 1, 2, 3.

При длине волны 360 нм на хроматограмме наблюдались только 3 достаточно интенсивных пика с массами молекулярных ионов в режиме регистрации позитивных ионов, равные 611, 595 и 625; в режиме регистрации негативных ионов – 609, 593 и 623 и с временами удерживания 7,4; 8,8 и 9,1 мин. Пик с временем удерживания 7,4 мин массой 610 соответствовал рутину, так как совпадал по спектрам и времени удерживания со стандартом (см. рис. 2). Пик с временем удерживания 8,8 мин в ре-

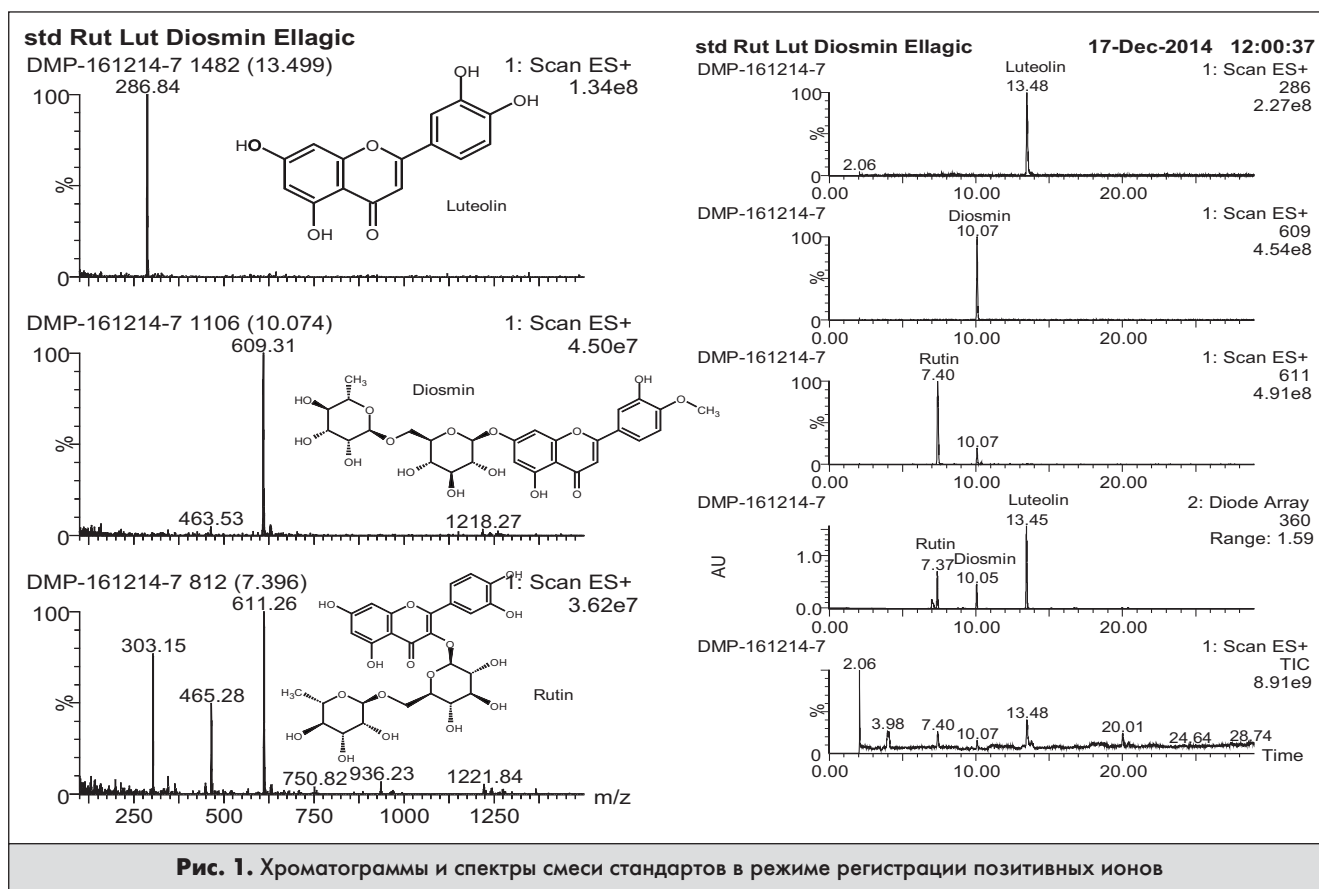


Рис. 1. Хроматограммы и спектры смеси стандартов в режиме регистрации позитивных ионов

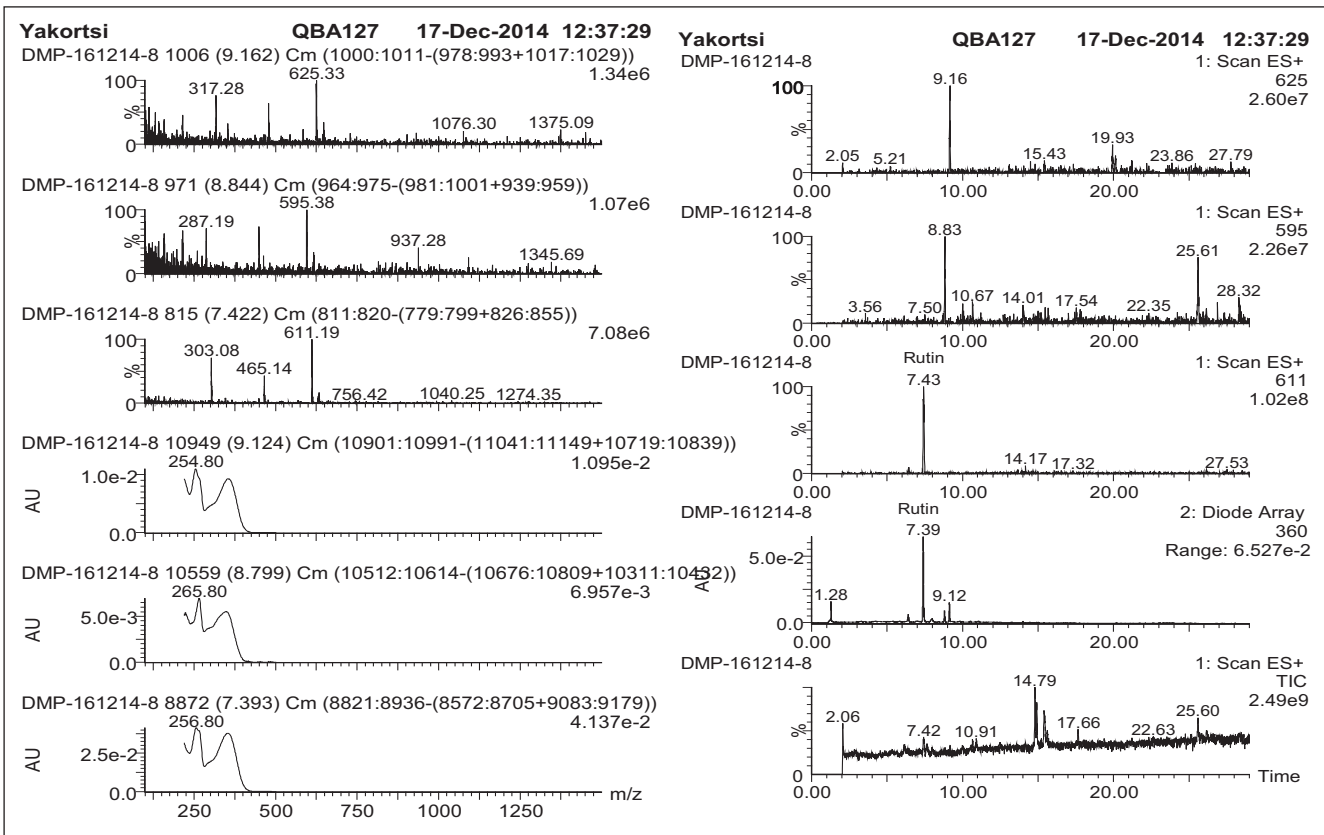


Рис. 2. Хроматограммы и спектры экстракта якорцев стелющихся в режиме регистрации положительных ионов

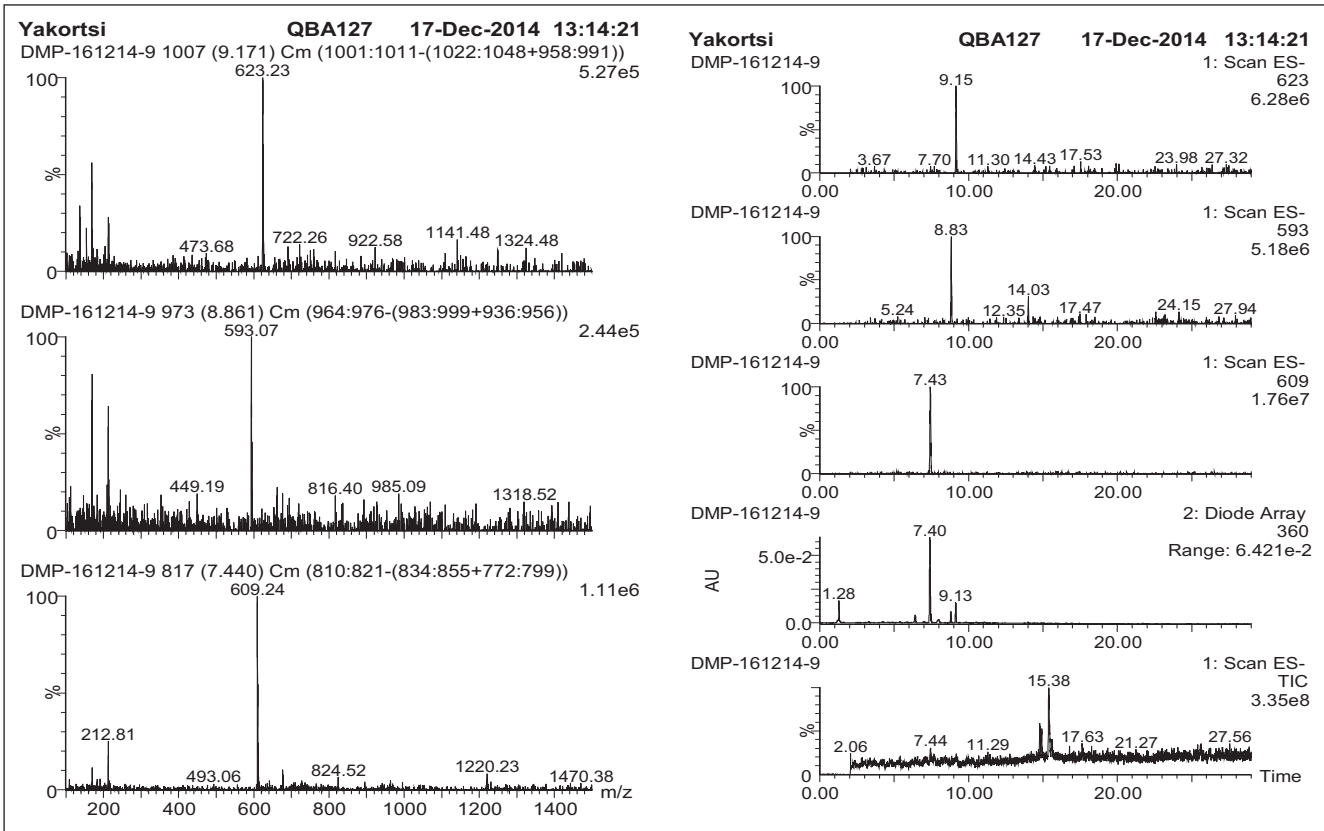
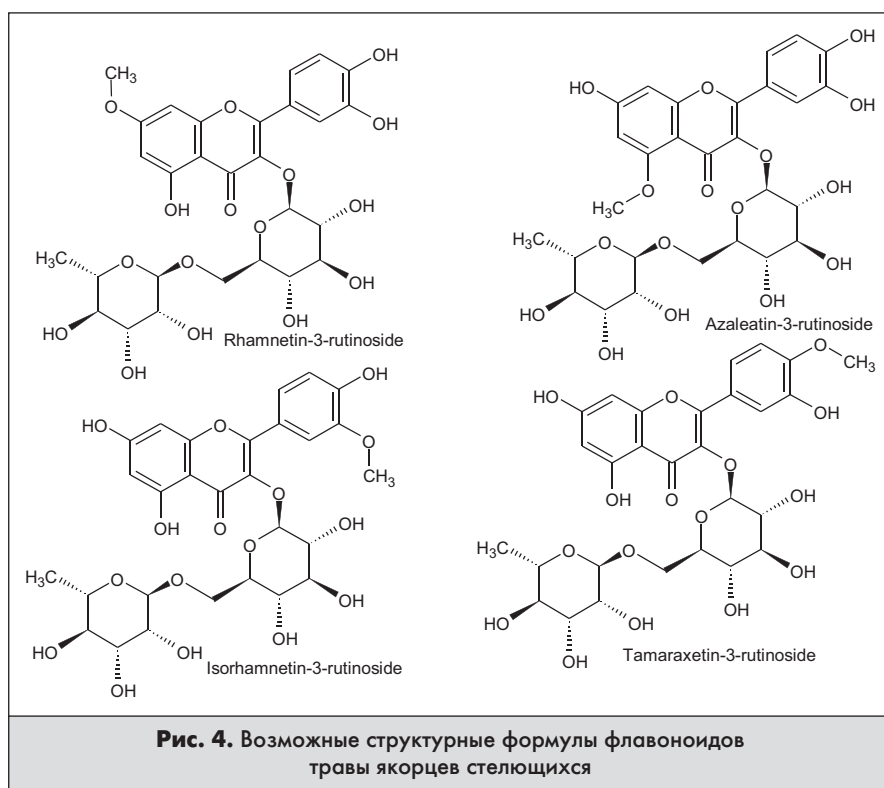


Рис. 3. Хроматограммы и спектры экстракта якорцев в режиме регистрации отрицательных ионов



жине регистрации позитивных ионов имел фрагменты с 287 (кемпферол) и 449, с потерей масс 148 и 162 аналогичных фрагментации рутина (611 до 303 и 465). Пик с временем удерживания 9,1 мин может иметь одну из предлагаемых структур (рис.4), так как его молекулярный ион 625 фрагментируется на 479 и 317 (кверцетин, метилированный в одно из 4 положений: рамнетин, изорамнетин, тамараксетин или азалеатин), что также аналогично фрагментации рутина.

Таким образом, в траве якорцев стелющихся установлено присутствие флавоноидов: рутина, кемпферол-3-рутинозида, рамнетин-3-рутинозида, изорамнетин-3-рутинозида, тамараксетин-3-рутинозида, азалеатин-3-рутинозида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью метода ВЭЖХ-МС уточнен состав флавоноидов травы якорцев стелющихся. Идентифицировано 6 соединений: рутин, кемпферол-3-рутинозид, рамнетин-3-рутинозид, изорамнетин-3-рутинозид, тамараксетин-3-рутинозид, азалеатин-3-рутинозид.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Шретер И.А. Распространение якорцев стелющихся в Советском Союзе. Растительные ресурсы, 1980; XVI (2). (Shreter I.A. Distribution of *Tribulus terrestris* in the Soviet Union. Plant resources, 1980; XVI (2)) (in Russian).
2. Ivanova A., Lazarova I., Mechkarova P., Tchorbanova B. HPLC Method for Screening of Steroidal Saponins and Rutin as Biologically Active Compounds in *Tribulus terrestris* L. Supplement 1, Special Issue:

Second Balkan Conference on biology, 21-23 may, 2010. Plovdiv, Bulgaria. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2010; 24: 129-33.

3. Dinchev D., Janda B., Evstatieva L. et al. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. Phytochemistry, 2008; 69 (1): 176-86.

4. Перепелица Э.Д., Кинтя П.К. Химическое изучение стероидных гликозидов *Tribulus terrestris*. IV. Стероидные сапонины. Химия природных соединений, 1975; 2. (Perpelitsa, E.D., Kintya P.K. Chemical study of the steroid glycosides *Tribulus terrestris*. IV. Steroidal saponins. Chemistry of natural compounds, 1975; 2) (in Russian).

5. Shishovska M., Arsova-Sarafinovska Z., Memeti Sh. A Simple Method for Determination of Protodioscin in *Tribulus terrestris* L. and Pharmaceuticals by High-Performance Liquid Chromatography Using Diode-Array Detection. Journal of Chemical Engineering Research Updates, 2015; 2: 12-21.

6. Bieber Th., Leung D.Y. M. Atopic Dermatitis - CRC Press, 2002; 656.

7. Nabel A.M. Saleh, Ahmed A. Ahmed, Mohamed F. Abdalla. Flavonoid glycosides of *Tribulus pentandrus* and *T. terrestris*. Phytochemistry, 1982; 21 (8): 1995-2000.

8. Ashwani Kumar. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in north indian populations of *Tribulus terrestris* L., by HPLC. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2012; 3 (4): 69-79.

9. Худенко П.Е., Терёшина Н.С., Морохина С.А. Изучение диагностических признаков якорцев стелющихся. Гомеопатический ежегодник, 2016. Новосибирск: Гомеопатическая книга, 2016; 177-8. (Khudenko P.E., Teryoshina N.S., Morokhina S.L. Study of the diagnostic signs of *Tribulus terrestris*. Homeopathic Yearbook, 2016. Novosibirsk: Homeopathic book, 2016; 177-8) (in Russian).

10. Poprizecki S., Zebrowska A., Cholewa J. Ergogenic effects of *Tribulus terrestris* supplementation in men. Journal of Human, 2005; 13: 41-50.

11. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация. Фармация, 2004; 2: 39-41. (Samylina I.A., Balandina I.A. The use of medicinal plant raw material and its standardization. Farmatsiya, 2004; 2: 39-41) (in Russian).

12. Маркрян А.А. Современное состояние стандартизации лекарственного растительного сырья и получаемых из него фитопрепаратов. Сб. трудов научной конференции «Технологии 21 века и фитотерапия». М., 2004; 45. (Markaryan A. A. Current state of standardization of medicinal plants and the herbal remedies. SB. works of scientific conference « Technologies of the 21st century and herbal medicine ». Moscow, 2004; 45) (in Russian).

13. Патудин А.В., Терёшина Н.С., Мищенко В.С., Губанов И.А. Мировые ресурсы гомеопатического лекарственного сырья. М., 2006; 560. (Patudin A.V., Teryoshina N.S., Mishenko V.S., Gubanov I.A. World resources homeopathic medicinal raw materials. Moscow, 2006; 560) (in Russian).

14. Сорокина А.А., Марахова А.И., Станишевский Я.М., Ковалева Т.Ю. Спектрофотометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. М.: Российский университет дружбы народов, 2015; 156. (Sorokina A.A., Marakhova A.I., Stanishevskiy Ya.M., Kovaleva T.Yu. Spectrophotometry in the analysis of medicinal plants and preparations on its basis. Moscow: Russian Peoples Friendship University, 2015; 156) (in Russian).

Поступила 31 марта 2016 г.

HPLC DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN GROUND BURNUT (*TRIBULUS TERRESTRIS*) HERB

P.E. Khudenko; N.S. Tereshina, PhD; S.L. Morokhina, PhD

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 199991, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. Ground burnut (*Tribulus terrestris*) herb is used to manufacture antisclerotic drugs for homeopathic and folk medicine. It contains steroid saponins and flavonoids. Investigations of the chemical composition of raw medical plant materials are needed to improve the standardization of raw materials and preparations of ground burnut.

Objective. To conduct an in-depth study of the composition of flavonoids in ground burnut herb.

Material and methods. The study was concerned with the dried ground burnut herb stored in Crimea in 2015. Raw material flavonoids were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Waters Acquity chromatograph with tandem quadrupole mass spectrometry (HPLC-MS) detector (Waters).

Results and discussion. The isolation and identification of flavonoids in the ground burnut herb were investigated. HPLC-MC established that the latter contained rutin, kaempferol-3-rutinoside, rhamnetin-3-rutinoside, isorhamnetin-3-rutinoside, tamaraxetin-3-rutinoside, and azaleatin-3-rutinoside.

Conclusion. The composition of flavonoids in the ground burnut herb was specified. Six compounds were identified.

Key words: ground burnut (*Tribulus terrestris* L.), herb, high performance liquid chromatography, flavonoids.