

ГИДРОКСИКОРИЧНЫЕ КИСЛОТЫ ТРАВЫ ГОРЦА ПОЧЕЧУЙНОГО

И.Б. Перова¹, кандидат фармацевтических наук,
К.И. Эллер¹, доктор химических наук, профессор,
А.А. Мальцева^{2*}, кандидат фармацевтических наук, **А.С. Чистякова**²,
А.И. Сливкин², доктор фармацевтических наук, профессор,
А.А. Сорокина³, доктор фармацевтических наук, профессор

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи;
Российская Федерация, 109240, Москва, Устьинский пр., д. 2/14;

²Воронежский государственный университет;

Российская Федерация, 394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;
Российская Федерация, 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2

Введение. В составе биологически активных веществ (БАВ) горца почечуйного преобладают фенольные соединения, включая гидроксикоричные кислоты. Последние вносят существенный вклад в лечебное действие суммарных растительных препаратов благодаря своей разнообразной биологической активности.

Цель исследования – изучение профиля гидроксикоричных кислот травы горца почечуйного.

Материал и методы. Объект исследования – трава горца почечуйного, произрастающего в Воронежской области. Состав и содержание гидроксикоричных кислот устанавливали методами спектрофотометрии на приборе СФ 2000-01 и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодно-матричным и времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-УФ/МС) с использованием системы Agilent 1100.

Результаты. УФ-спектр извлечения из травы горца почечуйного показал присутствие максимума поглощения в виде плеча при длине волны 320–350 нм и имел схожие спектральные характеристики со спектром хлорогеновой кислоты. Количественное содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в сырье составило 1,95%. Методом ВЭЖХ-УФ/МС в траве горца почечуйного выявлено присутствие 7 производных гидроксикоричных кислот; 2 соединения идентифицированы как хлорогеновая и криптохлорогеновая кислоты.

Заключение. Установлен профиль и количественное содержание гидроксикоричных кислот травы горца почечуйного, произрастающего в Воронежской области, который представлен 7 соединениями.

Ключевые слова: горец почечуйный, *Polygonum persicaria* L., гидроксикоричные кислоты, УФ-спектрофотометрия, ВЭЖХ-УФ/МС.

*E-mail: alinevoroneg@mail.ru

ВЕДЕНИЕ

Род горец (*Persicaria* L.) семейства гречишных (*Polygonaceae* Juss.) объединяет свыше 1250 видов. Одним из наиболее распространенных видов является горец почечуйный – *Polygonum persicaria* L., широко распространенный по территории средней полосы России [1]. Химический состав травы горца почечуйного представлен разнообразными группами биологически активных веществ (БАВ), среди которых преобладают фенольные соединения с широким спектром биологической активности. Последние перспективны в плане создания на их основе новых высокоэффективных лекарственных препаратов.

В настоящее время внимание ученых приковано к фенольным соединениям с одним ароматиче-

ским кольцом, в частности их интересуют простые фенолы, фенолоспирты, фенолокислоты (гидроксикоричные кислоты), кумарины, хромоны, лигнаны. Гидроксикоричные кислоты в различных комбинациях, в свободном виде или в виде гликозидов и сложных эфиров, содержатся во многих высших растениях. Они вносят существенный вклад в лечебное действие суммарных растительных препаратов благодаря специфической биологической активности. Гидроксикоричные кислоты проявляют желчегонную, антимикробную, антимикозную, гепатопротекторную, противовоспалительную, иммуностимулирующую активность, тормозят агрегацию эритроцитов, имеют бактериостатические свойства [2,3].

Цель исследования – изучение профиля гидроксикоричных кислот травы горца почечуйного, заготовленной в Воронежской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила высушенная трава горца почечуйного, заготовленная в 2014 г. в Воронежской области от дикорастущих растений в фазу цветения.

Для изучения качественных и количественных характеристик гидроксикоричных кислот травы горца почечуйного использовали метод прямой УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ-УФ/МС.

Для проведения прямой УФ-спектрофотометрии около 1,0 г сырья (точная навеска) экстрагировали 50 мл 70% спирта этилового на водяной бане с обратным холодильником. После охлаждения фильтровали, отбирали 5 мл полученного извлечения, помещали в колбу вместимостью 25 мл и доводили спиртом этиловым до метки. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на приборе СФ 2000-01 относительно спирта этилового.

Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот, в пересчете на хлорогеновую кислоту проводили согласно фармакопейной методике «Крпавы двудомной листьа» (ФС.2.5.0019.15) [4]. Для этого аналитическую пробу сырья измельчали до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 50 мл спирта 70%. Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстрагирование повторяли еще раз в описанных выше условиях. Полученное извлечение фильтровали в ту же мерную колбу. Объединенные извлечения в мерной колбе доводили спиртом 70% до метки и перемешивали (раствор А).

2,0 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора спиртом 96% до метки и перемешивали (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре СФ-2000-01 при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служил спирт 96%.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W) \cdot 100},$$

где А – оптическая плотность раствора Б; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507; а – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Профиль гидроксикоричных кислот в траве горца почечуйного исследовали методом ВЭЖХ-УФ/МС

по модифицированной оригинальной методике, разработанной ранее для анализа флавоноидов и производных гидроксикоричных кислот в траве пустырника пятилопастного [5].

Пробоподготовка. 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья переносили в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл 60% метанола. Экстракцию проводили на водяной бане с обратным холодильником при температуре 95°C в течение 1 ч. Далее колбу с извлечением охлаждали до комнатной температуры и помещали на УЗ-ванну на 5 мин. Содержимое колбы переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки 60% метанолом и тщательно перемешивали. 1,5 мл переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при скорости 15000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант помещали в виалу для автосемплера.

Исследования выполнялись с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), оснащенной бинарным насосом, дегазатором, термостатируемым автосамплером, термостатом колонок, диодно-матричным спектрофотометрическим (Agilent 1100 Series Diode Array) и времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (Agilent 6200 TOF LC/MS). В качестве стандартных образцов использовались коммерчески доступные индивидуальные вещества: хлорогеновая кислота ($\geq 95\%$, Sigma), кофейная кислота ($\geq 98\%$, Sigma), феруловая кислота ($\geq 99\%$, Aldrich), розмариновая кислота ($> 96\%$, Aldrich), кафтаровая кислота ($\geq 98\%$, Fluka), п-кумаровая кислота ($\geq 98\%$, Sigma), синаповая кислота ($\geq 98\%$, Sigma).

Условия хроматографирования. Неподвижная фаза: колонка ProteCol C18 HPH125 250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза: А – 0,1% раствор муравьиной кислоты, В – ацетонитрил. Градиентное элюирование – 0–40 мин, 10–60% В, затем регенерация колонки – 41–50 мин, 10% В. Температура колонки – 30°C, скорость подачи элюента – 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл. Диодно-матричное спектрофотометрическое детектирование проводилось при длине волны 330 и 290 нм.

Условия масс-детектирования. Ионизация электроспреем, сканирование масс – в режиме регистрации положительных ионов (ESI-MS+) в диапазоне m/z 100–1000 Да. Рабочие параметры источника ионизации: напряжение на капилляре – 3500 В, поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин, температура – 325°C, давление на распылителе – 0,27 МПа. Напряжение на фрагменторе – 175 В, на конусе – 65 В, на октополе OCT 1RF Vpp – 250 В. Обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software. Метрологические характеристики методики оценивали согласно РМГ 61-2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ спектров поглощения, полученных прямой УФ-спектроскопией, показал присутствие максимума поглощения в виде плеча при длине волны 320–350 нм (рис. 1). Данный диапазон характерен для поглощения соединения фенольной природы, в частности гидроксикоричных кислот [6].

Следует учитывать, что в области 320–330 нм происходит поглощение не только гидроксикоричных кислот, но и других классов фенольных соединений. Поэтому в качестве показателя качества сырья целесообразно использовать суммарное содержание фенольных веществ. Так как УФ-спектр хлорогеновой кислоты (рис. 2) обладает схожими спектральными характеристиками, т.е. имеет максимум поглощения при длине волны 330 нм, данное вещество выбрали для пересчета. Количественное содержание суммы гидроксикоричных кис-

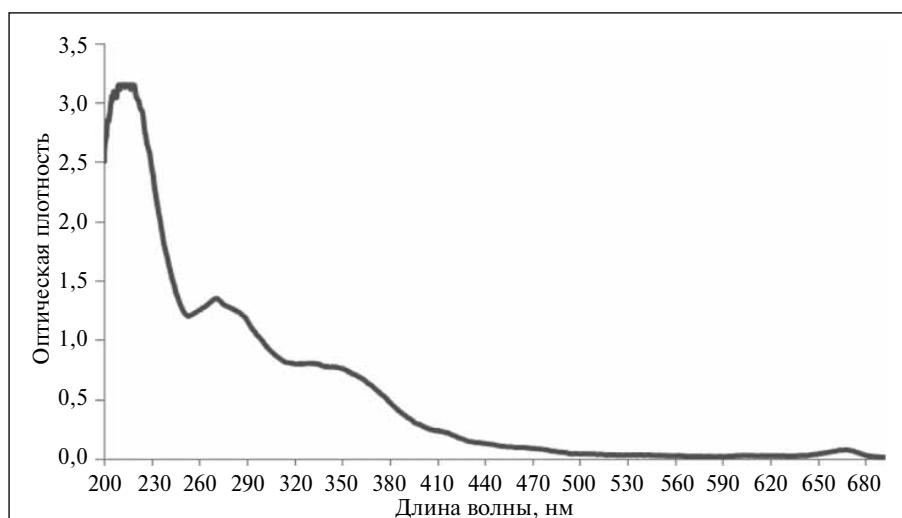


Рис. 1. Общий вид УФ-спектра спиртового извлечения из травы горца почечуйного

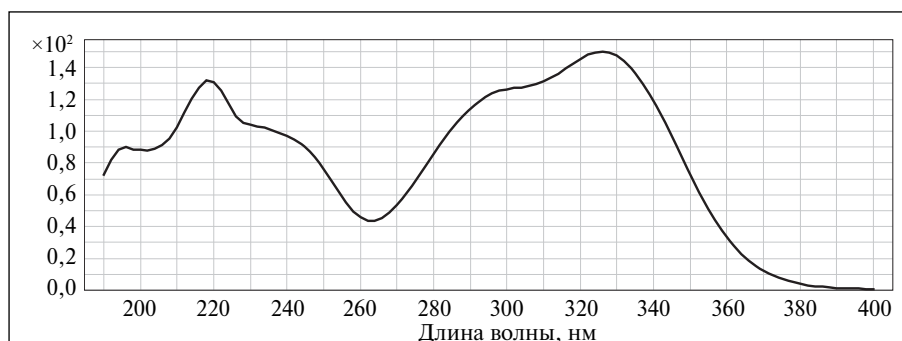


Рис. 2. Спектр поглощения хлорогеновой кислоты

ПРОИЗВОДНЫЕ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ ТРАВЫ ГОРЦА ПОЧЕЧУЙНОГО

| Номера пиков производных ГКК | Производное гидроксикоричной кислоты | К | ESI-MS ⁺ , m/z | Детектируемый ион | λ_{max} , нм | Содержание, мг/г |
|---|---|------|--------------------------------|--|-------------------------------|------------------|
| 1 | Хлорогеновая кислота | 3,12 | 355.14, 163.07 | [M+H] ⁺ [M – хинная кислота + H] ⁺ | 218, 234, 300 плечо, 326 | 0,56 |
| 2 | Криптохлорогеновая кислота | 3,20 | 355.14, 163.07 | [M+H] ⁺ [M – хинная кислота + H] ⁺ | 218, 234, 300 плечо, 325 | 0,24 |
| 3 | Неидентифицированное производное гидроксикоричной кислоты | 7,75 | 798.32, 663.36, 601.23 | [M+NH ₄] ⁺ | 214, 228, 300 плечо, 312 | 0,09 |
| 4 | Неидентифицированное производное гидроксикоричной кислоты | 9,02 | 974.38, 601.23 | [M+NH ₄] ⁺ | 214, 228, 300 плечо, 314 | 0,66 |
| 5 | Неидентифицированное производное гидроксикоричной кислоты | 9,07 | 631.24, 617.36 | | 206, 298 плечо, 322 | 0,15 |
| 6 | Неидентифицированное производное гидроксикоричной кислоты | 9,68 | 694.47, 601.23, 263.16 | [M+NH ₄] ⁺ | 214, 230, 300 плечо, 316 | 0,22 |
| 7 | Неидентифицированное производное гидроксикоричной кислоты | 9,76 | 694.47, 631.24, 353.31, 261.26 | [M+NH ₄] ⁺ | 204, 210, 235, 300 плечо, 316 | 0,09 |
| Сумма производных гидроксикоричных кислот | | | | | | 2,01 |

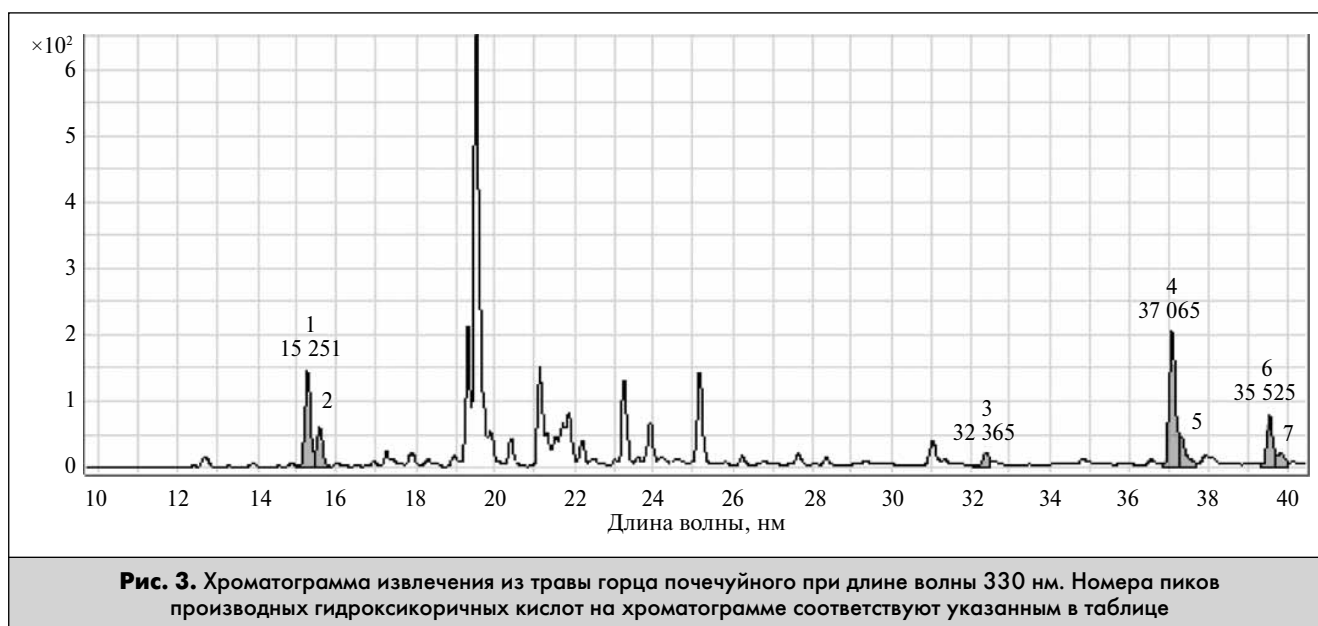


Рис. 3. Хроматограмма извлечения из травы горца почечуйного при длине волны 330 нм. Номера пиков производных гидроксикоричных кислот на хроматограмме соответствуют указанным в таблице

лот в пересчете на хлорогеновую кислоту составило $1,95 \pm 0,12\%$ ($n=5$; $p = 0,95$).

Коэффициенты емкости, результаты масс-спектрометрического анализа, максимумы поглощения и содержание производных гидроксикоричных кислот (ГКК) в траве горца почечуйного представлены в таблице. Хроматограмма извлечения из травы горца приводится на рис. 3.

С помощью метода ВЭЖХ-УФ/МС установлено, что в траве горца почечуйного содержатся 7 производных гидроксикоричных кислот (рис. 3, 4, см. таблицу). Идентифицированы хлорогеновая и криптохлорогеновая кислоты, содержание которых (0,56 и 0,24 мг/г соответственно) составляет около 40% от общего содержания производных гидроксикоричных кислот (2,01 мг/г). Остальные 60% приходятся на неидентифицированные производные гидроксикоричных кислот. Поскольку максимумы поглощения гидроксикоричных кислот (ГКК №№ 3, 4, 6 и 7) находятся в области длин волн 312–316 нм, можно предположить, что это производные п-кумаровой кислоты.

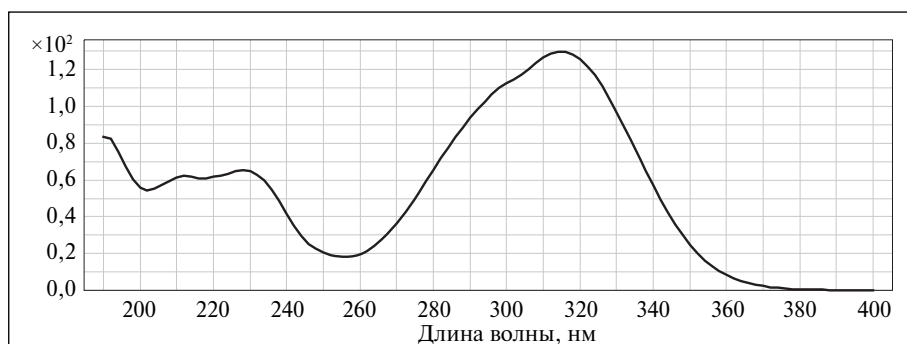


Рис. 4. Спектр поглощения основного производного дигидроксикоричной кислоты (ГКК № 4) в траве горца почечуйного

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведено исследование травы горца почечуйного, произрастающего в Воронежской области. С помощью метода ВЭЖХ-УФ/МС в траве выявлены 7 производных гидроксикоричных кислот, 2 из них идентифицированы как хлорогеновая и криптохлорогеновая кислоты. Количественное содержание в траве горца почечуйного суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, определенное спектрофотометрически, составило $1,95 \pm 0,12\%$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маевский П.Ф. Флора средней полосы Европейской части России. 11-е изд. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014; 635.
2. Бурда Н.Е. и др. Количественное определение гидроксикоричных кислот в траве и подземных органах *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Материалы Всероссийской с международным участием научно-практической конференции «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики». Курск (апрель, 2011); 209–12.
3. Запорожец О.А. и др. Спектрофотометрическое определение гидроксикоричной кислоты и ее производных в препаратах эхинацеи. Химико-фармацевтический журнал, 2003; 32 (12): 11–4.
4. Государственная фармакопея РФ XIII изд. (Электронный ресурс). Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml> Дата обращения: 19.11.2016.
5. Жогова А.А. и др. Идентификация и количественное определение основных биологически активных веществ травы пустырника с помощью ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Химико-фармацевтический журнал, 2014; 48 (7): 54–9.
6. Жукова О.Л. и др. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного. Вест. Московского университета. Сер.2. Химия, 2006; 47(5): 342–5.

Поступила 6 апреля 2017 г.

HYDROXYCINNAMIC ACIDS OF LADY'S THUMB (*POLYGONUM PERSICARIA*) HERB

I.B. Perova¹, PhD; Professor K.I. Eller¹, PhD; A.A. Maltseva², PhD; A.S. Chistyakova²; Professor A.I. Slivkin², PhD; Professor A.A. Sorokina³, PhD

¹Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology, and Food Safety; 2/14, Ustyinsky Proezd, Moscow 109240, Russian Federation;

²Voronezh State University; 1, Universitetskaya Sq. Voronezh 394006, Russian Federation;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. Lady's thumb (*Polygonum persicaria*) contains biologically active substances, predominantly phenolic compounds, including hydroxycinnamic acids. The latter make a considerable contribution to the therapeutic effect of combined herbal medicines due to their diverse biological activities.

Objective: to investigate the profile of hydroxycinnamic acids in the lady's thumb herb.

Material and methods. The investigation object was lady's thumb herb grown in the Voronezh Region. The composition and content of hydroxycinnamic acids were determined by spectrometry by means of a SP 2000-01 device and by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV diode array and time-of-flight mass spectrometric detection (HPLC-UV/MS) using an Agilent 1100 system.

Results. The UV spectrum of extraction from lady's thumb herb showed the maximum absorption as a shoulder at 320-350 nm and had spectral characteristics similar to those of chlorogenic acid. The raw material content of a sum of hydroxycinnamic acids calculated with reference to chlorogenic acid was 1.95%. HPLC-UV/MS revealed that lady's thumb herb contained 7 hydroxycinnamic acid derivatives; 2 compounds were identified as chlorogenic and cryptochlorogenic acids.

Conclusion. The profile and content of hydroxycinnamic acids in the herb of lady's thumb grown in the Voronezh Region have been established, which is represented by 7 compounds.

Key words: lady's thumb, *Polygonum persicaria* L., hydroxycinnamic acids, ultraviolet spectrophotometry, high-performance liquid chromatography – ultraviolet mass spectrometry.

REFERENCES

1. Maevskiy P.F. Flora of the middle part of the European part of Russia. 11-e ed. Moscow: The Partnership of Scientific Publications KMK, 2014; 635 (in Russian).
2. Burda N.E. et al. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in grass and underground organs *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation «Traditions and Innovations in Pharmaceutical Science and Practice». Kursk (April, 2011); 209–12 (in Russian).
3. Zaporozhets O.A. et al. Spectrophotometric determination of hydroxycinnamic acid and its derivatives in *Echinacea* preparations. *Himiko-farmaceuticheskiy zhurnal*, 2003; 32 (12): 11–4 (in Russian).
4. State Pharmacopoeia of RF, XIII edition (Electronic resource). Mode of access: <http://www.femb.ru/fem/> Date of access: 19.11.2016 (in Russian).
5. Zhogova A.A. et al. Identification and quantitative determination of the main biologically active substances of *Leonurus* grass using HPLC-mass spectrometry. *Himiko-farmaceuticheskiy zhurnal*, 2014; 48 (7): 54–9 (in Russian).
6. Zhukova O.L. et al. Study of the phenolic composition of the subterranean organs of the swamp saber. *Bulletin of Moscow University. Ser.2. Chemistry*, 2006; 47(5): 342–5 (in Russian).