

© ЛУКАШОВ Р.И., МОИСЕЕВ Д.В., 2015

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ РУДБЕКЦИИ ШЕРШАВОЙ ЦВЕТКОВ И ИХ ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ

ЛУКАШОВ Р.И., МОИСЕЕВ Д.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Используя высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием, в рудбекии шершавой цветках, заготовленных в Беларуси, установлено наличие десяти флавоноидов и четырех гидроксикоричных кислот. Рудбекии шершавой цветки, высушенные воздушно-теньевым способом при комнатной температуре, содержат максимальное количество биологически активных веществ. Тепловая сушка (40, 60, 80 и 100°C) с принудительной вентиляцией приводит к снижению их содержания. Оптимальным режимом сушки рудбекии шершавой цветков можно считать воздушно-теньевую сушку при комнатной температуре. В течение двух лет хранения в бумажных пакетах в защищенном от света месте и при комнатной температуре рудбекии шершавой цветки являются стабильными. Показатели подлинности и доброкачественности в течение двух лет хранения практически не изменяются. Показано выраженное иммуностропное действие настойки и настоя в индуцированной фитогемагглютинином реакции бласттрансформации лимфоцитов. Патулетрин и кофейная кислота практически не проявляют иммуностропного действия в индуцированной фитогемагглютинином реакции бласттрансформации лимфоцитов.

Ключевые слова: фенольные соединения, цветки, рудбекия шершавая, сушка, хранение, иммуностропная активность.

Abstract.

The presence of ten flavonoids and four hydroxycinnamonic acids has been confirmed in *Rudbeckia hirta* flowers harvested in Belarus by means of high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Rudbeckia hirta* flowers dried by air shadow method at room temperature contain the highest quantity of biologically active substances. Thermal drying (40, 60, 80 and 100°C) with forced ventilation reduces the content of biologically active substances. The optimal mode of drying *Rudbeckia hirta* flowers may be considered air shadow one at room temperature. Within two years of storage in a dark place at room temperature *Rudbeckia hirta* flowers are stable. Indices of authenticity and purity during two years of storage are practically unchanged. Immunotropic effect of a tincture and an infusion in phytohemagglutinin induced lymphocyte blast transformation reaction is shown. Patuletin and caffeic acid practically do not show any immunotropic action in response induced by PHA blast transformation lymphocytes reaction.

Key words: phenolic compounds, flowers, *Rudbeckia hirta*, drying, storage, immunotropic activity.

В настоящее время в связи с ухудшением экологической обстановки и действием других неблагоприятных факторов на организм человека приобретает значение корректирование иммунного статуса при помощи лекарственных средств [1, 2]. С точки зрения безопасности и плавности нарастания фармакологического эффекта наиболее рациональными средствами можно считать фитопрепараты, разрабатываемые на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) [3, 4]. Перспективным сырьем для получения

фитопрепаратов считаются рудбекии шершавой цветки [5-7].

Цель исследования – изучить влияние температуры сушки и срока хранения на содержание фенольных соединений (ФС) в рудбекии шершавой цветках и их иммуностропную активность в индуцированной реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Материал и методы

Изучение состава ФС с использованием

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием. Исследование проводили в комбинированной системе: жидкостный хроматограф Accela и масс-спектрометр TSQ Quantum Access MAX (ThermoSci, США). Сбор данных, обработку хроматограмм и масс-спектров осуществляли при помощи компьютерной программы Xcalibur version 2.1.

Для проведения исследования использовали хроматографическую колонку Hypersil Gold 2,1 × 50 мм с размером частиц силикагеля октадецилсилильного для хроматографии P 1,9 мкм; температура колонки 35°C.

При подборе состава подвижной фазы изучали различные соотношения ацетонитрила P, метанола P и раствора 1 г/л кислоты муравьиной безводной P. Оптимальным оказался следующий состав при изократическом режиме элюирования: ацетонитрил P – метанол P – раствор 1 г/л кислоты муравьиной безводной P (30:20:50, об/об/об). Скорость подачи элюента: 200 мкл/мин. Объем инжестируемой пробы: 5,00 мкл. Температура в автосэмплере: 4°C. Время хроматографического анализа составило 10 мин.

Сигнал получали в режиме сканирования одного иона (SIM). Способ ионизации – ионизация в электроспрее. Напряжение на электроспрее: 3200 В. Данные получены в позитивном режиме ионизации.

Идентификацию флавоноидов и гидроксикоричных кислот проводили путем сопоставления величины m/z (отношение массы (m) молекулярного иона $[M+H]^+$ к его заряду (z) и молекулярной массы идентифицируемого вещества (M_r) с учетом последовательности их элюирования с хроматографической колонки.

Извлечение для анализа получали по методике, разработанной ранее [5].

Подбор оптимальной температуры сушки. Для подбора оптимальной температуры сушки, обеспечивающей максимальное содержание действующих веществ в сухом сырье, использовали рудбекии шершавой цветки, заготовленные на учебно-полевом участке в п. Улановичи (окрестности г. Витебска) в 2012, 2013 гг. и на плантации ООО «НПК Биотест» в 2015 г. в начале цветения. Свежесобранное сырье подвергли воздушно-

теновой сушке при комнатной температуре, разложив его в хорошо вентилируемом помещении без доступа прямых солнечных лучей, и сушке при нагревании в сушильном шкафу до 40°C, 60°C, 80°C и 100°C (тепловая сушка) с принудительной вентиляцией. Сушку считали законченной, когда потеря в массе при высушивании рудбекии шершавой цветков составляла не более 14%.

Содержание биологически активных веществ (БАВ) в воздушно-сухих и высушенных при различных температурах рудбекии шершавой цветках определяли по методикам, разработанным ранее [5, 6].

Оценка стабильности при хранении сырья в бумажных пакетах. Осуществляли хранение цельного воздушно-сухого ЛРС сбора 2013 г. (п. Улановичи) в бумажных пакетах в защищенном от света месте при комнатной температуре. Контроль проводили один раз в год в течение двух лет хранения. Содержание БАВ определяли по методикам, разработанным ранее [5, 6].

Постановка индуцированной РБТЛ. Постановку РБТЛ выполняли аналогично методике, опубликованной ранее [7] с внесением следующих изменений. Для постановки индуцированной РБТЛ формировали дополнительно следующие группы проб: во флаконы с патулетрином; во флаконы с кофейной кислотой P; во флаконы с настойкой в дозе 2,34 нмоль/л; во флаконы с настоем в дозе 18,9 нмоль/л и во флаконы с растворителем вносили дополнительно по 0,1 мл раствора 0,2 г/л фитогемагглютина (в воде для инъекций). Инкубировали в течение трех суток при 37°C.

Результаты

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. В таблице 1 представлены значения величин m/z и молекулярные массы флавоноидов и гидроксикоричных кислот рудбекии шершавой цветков.

Молекулярная масса идентифицированных дигликозидов находилась в диапазоне: от 563 до 611, моногликозидов – от 446 до 497, агликонов – от 286 до 333, гидроксикоричных кислот – от 180 до 475.

Оптимальная температура сушки. На рисунке 1 представлена зависимость содержания флавоноидов и гидроксикоричных

Таблица 1 – Значения величин m/z и молекулярные массы флавоноидов и гидроксикоричных кислот рудбекии шершавой цветков

Название соединения	m/z	M_r
1. Кверцетин-3-О-диглюкозид	565	564
2. Рутин	612	611
3. Патuletин-7-О-галактозид	497	496
4. Патuletин	497	496
5. Хризозеириол-3-О-рамнозид	447	446
6. Мирицетин	319	318
7. Хризозеириол-3-О-глюкозид	464	463
8. Кверцетагетин	319	318
9. Лютеолин	287	286
10. Патuletин	333	332
11. Хлорогеновая кислота	355	354
12. Кофейная кислота	181	180
13. Феруловая кислота	195	194
14. Цикориевая кислота	475	474

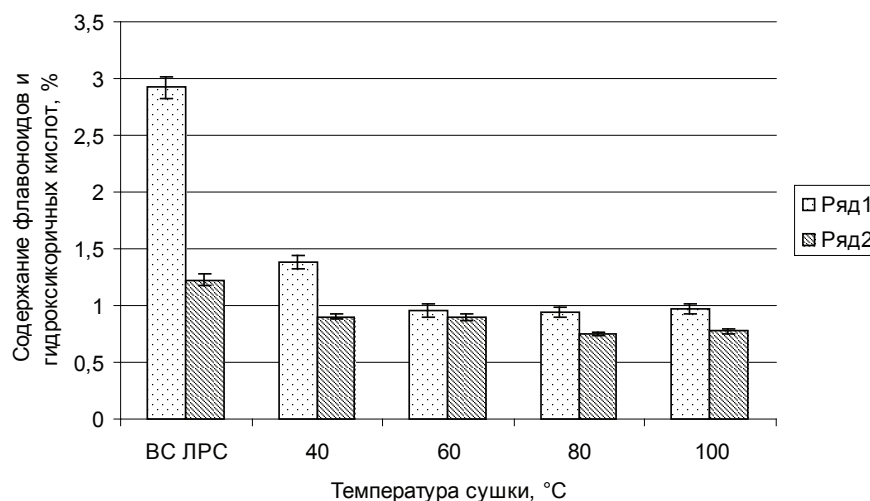


Рисунок 1 – Зависимость содержания флавоноидов и гидроксикоричных кислот в рудбекии шершавой цветках от температуры их сушки: Ряд 1 – сумма флавоноидов и гидроксикоричных кислот, %; Ряд 2 – патuletин, %; ВС ЛРС – воздушно-сухое ЛРС.

кислот в рудбекии шершавой цветках от температуры их сушки.

Из рисунка 1 видно, что максимальное содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот отмечено в ЛРС, которое высушено воздушно-теневым способом при комнатной температуре. При этом их содержание соответствовало рекомендуемому значению, т.е. больше 1,5%.

При переходе от воздушно-теневого сушки к сушке при 40°C содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот уменьшалось практически в два раза, что,

предположительно, обусловлено совместным ферментативным и термическим разрушением данных БАВ. Дальнейшее повышение температуры сушки (от 40°C до 60°C) приводило к снижению содержания суммы данных веществ в полтора раза. Менее резкое снижение обусловлено некоторым температурным ингибированием активности ферментов. При сушке рудбекии шершавой цветков при температурах 60°C, 80°C и 100°C содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот практически не изменялось в виду того, что в ЛРС оставались термически ста-

бильные БАВ, а также происходило уменьшение времени сушки с повышением ее температуры (табл. 3) и более быстрое удаление избытка влаги, которая являлась средой для протекания реакций деструкции, в частности, гидролиза.

При тепловой сушке содержание суммы данных веществ в рудбекии шершавой цветках не соответствовало рекомендуемому значению, т.е. меньше 1,5%.

Максимальное содержание патулетрина отмечено в ЛРС, высушенном воздушно-теневым способом при комнатной температуре. При переходе от воздушно-теновой сушки к сушке при 40°C содержание патулетрина уменьшалось в 1,4 раза. Повышение температуры сушки от 60°C до 80°C приводило к снижению содержания данного гликозида в 1,2 раза, что подтверждало относительную термолабильность патулетрина. При сушке рудбекии шершавой цветков при температурах 40°C, 60°C и 80°C, 100°C наблюдали два плато содержания патулетрина.

Показано, что цветки, высушенные при 60°C, содержали практически только патулетрин, остальные флавоноиды и гидроксикоричные кислоты определены в следовых количествах.

В таблице 2 представлена зависимость содержания суммы ФС в рудбекии шершавой цветках от температуры их сушки.

Из таблицы 2 видно, что максимальное суммарное содержание ФС отмечено в ЛРС, которое высушено воздушно-теневым способом при комнатной температуре. При переходе от воздушно-теновой сушки к сушке при 40°C содержание суммы ФС уменьшалось в 1,3 раза, что преимущественно связано с разрушением гликозидов хризозериола и па-

тулетина (состав ФС при различных температурных режимах сушки контролировали методом ВЭЖХ [5]). Дальнейшее повышение температуры сушки (от 40°C до 60°C) приводило к статистически незначимому увеличению содержания суммы данных веществ, что обусловлено разрушением гликозидов флавоноидов до агликонов, которые разлагались до более простых фенолов, вступающих также в реакцию с фосфорномолибденово-вольфрамовым реактивом Р. Нагревание до 80°C приводило к снижению суммарного содержания в 1,3 раза в сравнении с воздушно-сухим сырьем за счет полного разрушения гликозидов хризозериола. Однако дальнейшее увеличение температуры сушки (от 80°C до 100°C) способствовало увеличению содержания суммы ФС практически в 1,2 раза за счет накопления простых фенолов – продуктов термического распада более сложных молекул (флавоноидов, гидроксикоричных кислот). Повышение температуры сушки выше комнатной влекло за собой изменение состава ФС, что, в свою очередь, приводило к изменению хроматографического профиля.

В таблице 3 представлена зависимость продолжительности сушки рудбекии шершавой цветков от ее температуры.

Из таблицы 3 видно, что продолжительность сушки составила от 1 часа до 4 дней, с повышением температуры сушки ее продолжительность сокращалась.

Стабильность при хранении. В таблице 4 представлена динамика показателей подлинности и доброкачественности рудбекии шершавой цветков при хранении в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Из таблицы 4 видно, что показатели качества цветков, которые хранились два года

Таблица 2 – Зависимость содержания суммы ФС в рудбекии шершавой цветках от температуры их сушки

Воздушно-сухое ЛРС	40°C	60°C	80°C	100°C
4,03±0,23	3,17±0,14	3,32±0,18	3,20±0,10	3,70±0,12

Таблица 3 – Зависимость продолжительности сушки рудбекии шершавой цветков от ее температуры

Воздушно-сухое ЛРС	40°C	60°C	80°C	100°C
4 дня	20 часов	5 часов	1,5 часа	1 час

Таблица 4 – Динамика показателей подлинности и доброкачественности рудбекии шершавой цветков при хранении в защищенном от света месте при комнатной температуре

Срок хранения, мес	Тест «Тонкослойная хроматография»	Содержание в % ($n = 3$)			
		Сумма ФС	Сумма флавоноидов и гидроксикоричных кислот	Патулетрин	Потеря в массе при высушивании
Исходное сырье	Соответствует	3,64±0,08	2,91±0,06	1,54±0,03	10,6±0,2
12	Соответствует	3,46±0,10	2,84±0,04	1,49±0,02	10,7±0,1
24	Соответствует	3,35±0,09	2,69±0,04	1,42±0,03	10,6±0,2

Таблица 5 – Процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов в пробах с патулетрином и кофейной кислотой Р в индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ ($n = 4$)

Патулетрин + фитогемагглютинин	Кофейная кислота Р + фитогемагглютинин	Фитогемагглютинин	Контроль
65,3±1,5*	63,3±4,4*	61,8±5,5*	4,8±0,8

Примечание: * – статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными пробами.

Таблица 6 – Процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов в пробах с настойкой и настоем в индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ ($n = 4$)

Настойка в дозе 2,34 нмоль/л + фитогемагглютинин	Настой в дозе 18,9 нмоль/л + фитогемагглютинин	Фитогемагглютинин	Контроль
86,0±4,5* **	80,5±5,9* **	61,8±5,5*	4,8±0,8

Примечание: * – статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными пробами; ** – статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) по сравнению с пробами, содержащими только фитогемагглютинин.

в защищенном от света месте при комнатной температуре, отличались несущественно ($p > 0,05$) от аналогичных параметров исходного сырья. Количественные показатели качества (содержания суммы ФС, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, патулетрина, потеря в массе при высушивании) в течение двух лет хранения в защищенном от света месте при комнатной температуре изменялись в пределах критерия приемлемости $\pm 10\%$ [8].

Состав флавоноидов и гидроксикоричных кислот цветков, которые хранились два года в защищенном от света месте при комнатной температуре, практически не отличался от состава цветков, которые хранились два года при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(60 \pm 5)\%$ [9].

Индукцированная РБТЛ. В таблице 5 представлены результаты определения имму-

нотропных свойств патулетрина и кофейной кислоты Р в индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ.

Из таблицы 5 видно, что процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов в пробах с фитогемагглютинином практически в 13 раз выше, чем в контрольных пробах, что указывало на высокую митогенную активность используемого образца фитогемагглютинина. При добавлении патулетрина и кофейной кислоты Р в пробы с фитогемагглютинином процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов незначительно возрастал (на 1,5–10,3% (отн.) и 1,5–3,4% (отн.) соответственно) в сравнении с пробами, содержащими только фитогемагглютинин, что указывало на наличие слабовыраженных комитогенных свойств по отношению к фитогемагглютину у данных соединений.

В таблице 6 представлены результаты определения иммуотропных свойств настойки и настоя в индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ.

Из таблицы 6 видно, что при добавлении настойки и настоя в пробы с фитогемагглютинином процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов возрастал статистически значимо ($p < 0,05$) (31,2–55,2% (отн.) и 16,9–46,6% (отн.) соответственно) по сравнению с пробами, содержащими только фитогемагглютинин. Полученные результаты индуцированной РБТЛ согласовывались с данными, полученными ранее в спонтанной РБТЛ [7].

Обсуждение

При построении корреляционной матрицы зависимостей содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, а также патулетрина в рудбекии шершавой цветках, хранившихся в разных условиях [8–10], установлены достоверные связи между данными зависимостями ($r \sim 0,88$ – $0,90$ для содержаний суммы веществ и $r \sim 0,88$ – $0,96$ для содержаний патулетрина).

Достоверные связи между зависимостями и идентичность составов указывали на сходство процессов деструкции БАВ, которые происходили в исследуемом ЛРС при хранении в разных условиях. Изменение показателей качества при хранении в условиях согласно Техническому кодексу установившейся практики 431-2012 [8] практически не отличалось от динамики показателей качества при хранении в традиционных условиях согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь, что подтверждало равноправность применения обоих подходов.

Заключение

Используя ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, в рудбекии шершавой цветках, заготовленных в Беларуси, подтверждено наличие десяти флавоноидов и четырех гидроксикоричных кислот. Проведена более достоверная идентификация гликозидов одного и того же агликона-флавоноида.

Оптимальным режимом сушки рудбе-

кии шершавой цветков можно считать воздушно-теневою сушку при комнатной температуре, которая обеспечивала наибольшее сохранение нативных действующих веществ в ЛРС. Не рекомендовано использовать при сушке рудбекии шершавой цветков температуру выше комнатной.

В течение двух лет хранения в защищенном от света месте при комнатной температуре рудбекии шершавой цветки являлись стабильными и соответствовали показателям, установленным для них в нормативной документации по контролю качества.

Показано иммуотропное действие настойки и настоя в индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ, что подтверждало данные, полученные в условиях спонтанной РБТЛ.

Литература

1. Новиков, Д. К. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммуореабилитация / Д. К. Новиков, П. Д. Новиков, Н. Д. Титова. – Витебск : ВГМУ, 2006. – 198 с.
2. Катцунг, Г. Б. Базисная и клиническая фармакология : в 2 т. / Г. Б. Катцунг. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : БИНОМ ; СПб. : Диалект, 2008. – Т. 2. – 784 с.
3. Соколов, С. Я. Фитотерапия и фитотерапевтика : рук. для врачей / С. Я. Соколов. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2000. – 976 с.
4. Клиническая фармакология и фармакотерапия : учеб. для вузов / под ред. В. Г. Кукеса, А. К. Стародубцева. – 2-е изд., испр. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 640 с.
5. Лукашов, Р. И. Количественное определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот в цветках рудбекии шершавой / Р. И. Лукашов, Д. В. Моисеев // Рецепт. – 2013. – № 5. – С. 95-105.
6. Рудбекии шершавой цветки // Новости экспертизы и регистрации. – 2014. – № 5. – С. 26-30.
7. Лукашов, Р. И. Иммуотропная активность цветков рудбекии шершавой (*Rudbeckia hirta* L.) / Р. И. Лукашов, Д. В. Моисеев // Рецепт. – 2013. – № 4. – С. 96-103.
8. ТКП 431-2012 (02041), ВУ. Производство лекарственных средств. Испытания стабильности = Вытворчасць лекавых сродкаў. Выпрабаванні стабільнасці. – Введ. 29.11.12. – Минск : Департамент фармацевтической промышленности, 2012. – 66 с.
9. Лукашов, Р. И. Обоснование сроков годности

цветков рудбекии шершавой / Р. И. Лукашов // Молодая фармация – потенциал будущего : сб. материалов IV Всерос. науч. конф. студентов и аспирантов с междунар. участием, Санкт-Петербург, 14-15 апр. 2014 г. – СПб., 2014. – С. 489-492.

10. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II) : в 2 т. / под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно : Победа, 2012. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 1217 с.

Поступила 21.07.2015 г.

Принята в печать 07.08.2015 г.

Сведения об авторах:

Лукашов Р.И. – аспирант кафедры стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Моисеев Д.В. – к.ф.н., доцент, заведующий кафедрой стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК. E-mail: r_lukashov@mail.ru – Лукашов Роман Игоревич.