

ваво-красного в два раза выше по сравнению с плодами. Таким образом, листья боярышника кроваво-красного можно рекомендовать в качестве фармацевтической субстанции для получения высокоэффективных лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каверина, Н.В. Изучение специфической антиаритмической активности препаратов боярышника / Н.В. Каверина [и др.] // Фармация. – 1988. – № 6. – С. 33 – 36.
2. Смирнова, Л.П. Количественное определение суммы флавоноидов в желчегонном сборе / Л.П. Смирнова, Л.Н. Первых // Химико-фармац. журн. – 1999. – Т.33, № 3. – С.37-39.
3. Хишова, О.М. Фармакологическое действие боярышника кроваво-красного и применение в медицине / О.М. Хишова, Е.В. Кравченко, Т.В. Родионова // Вестник фармации. - Витебск - № 2 (24). - 2004. - С. 69 - 76.
4. Verma, S.K., Jain, V. , Verma, D., Khamesra, R. Crataegus oxyacantha - a cardioprotective herb / S.K Verma et al. // Journal of Herbal Medicine and Toxicology 1(1) 65-71 (2007) – P. 63 – 68.

SUMMARY

O.M. Khishova, T.V. Rodionova
COMPARATIVE QUANTITATIVE
ESTIMATION OF THE CONTENTS OF
FLAVONOIDS IN HAWTHORN RAW
MATERIALS

In the article the results of the research of Hawthorn (*Crataegus*) leaves and fruits flavonoids by the spectrophotometry method are given. The percentage content of total flavonoids calculated as rutin. The contents of flavonoids in leaves are 0,25 - 0, 29 per cent, in fruits are 0,12 - 0,14 per cent. Hawthorn leaves can be use to prepare of crude drug.

Поступила 20.02.2008 г.

О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО *SOMARUM* *PALUSTRE L.*

Витебский государственный
медицинский университет

В статье разработаны методики фракционирования проантоцианидиновых комплексов корневищ с корнями сабельника болотного. Фракционирование проводили по двум методикам: на колонке с полиамидом и на колонке с сорбентом «Диасорб-100-С₁₆». Каждая из полученных фракций была количественно охарактеризована и, на основании полученных данных, определена доминирующая группа комплексов проантоцианидинов. Хроматографическое исследование методами ТСХ и ВЭЖХ фракций, полученных на колонке с полиамидом, подтвердило содержание в каждой из хроматографических зон только одного вещества, что свидетельствует об эффективности разделения. По временам удерживания хроматографических зон, полученные вещества были найдены в цельных фракциях, полученных на полиамиде. Определена доминирующая группа проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного: олигомеры проантоцианидинов со степенью полимеризации 2-8 (фракционирование на полиамиде), низкомолекулярные проантоцианидины со степенью полимеризации меньше 5 (фракционирование на С₁₆-силикагеле).

ВВЕДЕНИЕ

Олигомерные проантоцианидины - одни из самых интересных и важных для человека представителей растительных полифенольных соединений. Главное отличие проантоцианидинов от остальных полифенольных соединений в том, что они составляют основную (до 80%) часть по-

требляемых человеком биофлавоноидов. Кроме вина в список продуктов питания, богатых проантоцианидинами и мономерными катехинами, входят виноград, яблоки, бобы, пшеница, а также какао, кофе, чай всех видов [1]. Основную часть от этого количества составляют проантоцианидины и их мономерные звенья - катехины и лейкоантоцианидины, так как только эти соединения флавоноидной природы способны образовывать полимерные структуры.

С точки зрения химического строения проантоцианидины представляют собой полимерные флаван-3-олы, которые имеют типичный С6-С3-С6-флавоноидный скелет (рис. 1).

Наиболее широко в пищевых продуктах растительного происхождения распространены проантоцианидины с расположением гидроксильных групп в положении 3',4'- в кольце В и прodelьфинидины с 3',4',5'-тригидрокси-замещением. Проантоцианидины часто встречаются в растительных продуктах и напитках в смеси с прodelьфинидинами. Проантоцианидины

существуют в виде растворимых в воде олигомеров, содержащих от двух до шести катехиновых единиц, а также в виде нерастворимых в воде полимеров со степенью полимеризации от 7 и выше, которые представляют собой основную (до 80%) часть проантоцианидиновых комплексов [1]. Катехиновые единицы в проантоцианидинах в основном связаны через атомы углерода, находящиеся в 4-м, 8-м или 6-м положениях. Такие проантоцианидины относятся к типу В (димеры) и типу С (тримеры). У проантоцианидинов А типа мономерные единицы связаны двумя связями (одной С-С и одной С-О).

Целью данной работы является разработка методик фракционирования проантоцианидиновых комплексов корневищ с корнями сабельника болотного, позволяющих количественно охарактеризовать каждую фракцию. По результатам проведенных методик фракционирования идентифицировать доминирующую группу комплексов проантоцианидинов с определенной степенью полимеризации.

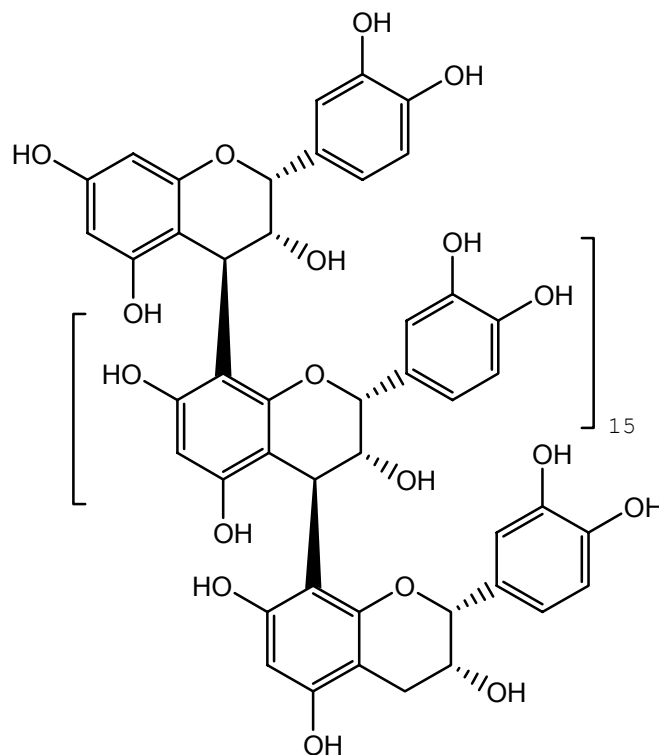


Рис. 1. Пример проантоцианидина, выделенного из растения Sorghum (эпикатехин-[(4β->8)-эпикатехин]₁₅-(4β->8)-катехин).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали корневища с корнями сабельника болотного, заготовленные в сентябре 2006 г. в местах естественного произрастания в окрестностях г. Витебска Республики Беларусь. До проведения анализов образцы хранились в бумажных пакетах при комнатной температуре.

Согласно литературным данным [2, 3], лучшими сорбентами для фракционирования проантоцианидиновых комплексов являются полиамид и C_{16} -силикагель. Поэтому фракционирование проантоцианидиновых комплексов корневищ с корнями сабельника болотного проводили по двум методикам: на колонке с полиамидом и на колонке с C_{16} -силикагелем.

Определение общего содержания фенольных соединений во фракциях, в пересчете на галловую кислоту, проводили по фотометрической методике, основанной на их окислении реагентом Фолина-Чокальте, содержащим фосфомолибдат и вольфрамат натрия [4].

Определение содержания проантоцианидинов во фракциях проводили по модифицированной методике Porter, в основе которой лежит кислотное расщепление процианидинов до антоцианидинов в присутствии катализатора (ионов Fe^{3+}) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Методика фракционирования на сорбенте «Диасорб-100- C_{16} »

Около 0,5 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром 0,25 мм, экстрагировали 15 мл дистиллированной воды на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Готовое извлечение охлаждали и центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 15 минут. Доводили рН извлечения до 7 титрованием 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Таблица 1 - Количественное содержание комплексов проантоцианидинов во фракциях

№ фракции	фракция	относительное содержание, %
I	фенолокислоты (ФК)	33,38
II	мономерные катехины (МК)	22,52
III	низкомолекулярные проантоцианидины (НМПЦ) ($n < 5$)	27,82
IV	высокомолекулярные проантоцианидины (ВМПЦ) ($n \geq 5$)	14,69

Фракционирование проводили на колонке, содержащей 500 мг C_{16} -силикагеля. Колонку предварительно кондиционировали 10 мл этилового спирта. После этого через колонку с C_{16} -силикагелем пропускали 10 мл извлечения корневищ с корнями сабельника болотного и элюировали 10 мл дистиллированной воды для удаления водорастворимых полифенолов и объединяли с образцом, собранным после нанесения (фракция I). Объем полученной фракции I составил 20 мл. После этого колонку с C_{16} -силикагелем просушивали в токе азота. Последующие фракции получали следующим образом:

- фракция II+III (мономерные катехины (МК), низкомолекулярные проантоцианидины (НМПЦ) ($n < 5$) и других небольшие фенольные молекулы)- элюированием 20 мл этилацетата;
- фракция IV (высокомолекулярные проантоцианидины (ВМПЦ) ($n \geq 5$))- элюированием 20 мл метанола.

Фракцию II+III упаривали досуха в вакууме при температуре $< 25^{\circ}C$, растворяли в 5 мл дистиллированной воды и наносили на ту же колонку, предварительно промытую 20 мл дистиллированной воды. После этого колонку с C_{16} -силикагелем просушивали в токе азота. Для разделения мономерных катехинов (МК) и низкомолекулярных проантоцианидинов (НМПЦ) ($n < 5$) применяли последовательное элюирование: 20 мл диэтилового эфира - фракция II (мономерные катехины (МК)) и 20 мл метанола - фракция III (низкомолекулярные проантоцианидины (НМПЦ) ($n < 5$)) [2].

Результаты количественного определения комплексов проантоцианидинов в пересчете на галловую кислоту представлены в таблице 1.

Исходя из данных таблицы 1, суммарное значение фракций составило 98,41%, что приближается к теоретическому-100%. Среди фракций проантоцианидинов доминирующей является фракция III (табл. 1): низкомолекулярные проантоцианидины (НМПЦ) ($n < 5$) 27,82%.

Методика фракционирования на полиамиде

Около 0,5 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром 0,25 мм, экстрагировали 20 мл 70% этилового спир-

та на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Готовое извлечение охлаждали и центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 15 минут.

Фракционирование проводили на колонке, содержащей 500 мг полиамида. Колонку предварительно кондиционировали 10 мл дистиллированной воды, а затем 10 мл метанола. После этого через полиамид пропускали 10 мл спиртового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного. Фракционирование проводили по следующей схеме (табл. 2).

Таблица 2 - Схема фракционирования проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного

№ фракции	Элюат	Элюирующий объем
I	96% этанол	4×10 мл
II	96% этанол:ацетон:вода 80:16:4	8×10 мл
III	ацетон:вода 70:30	1×10 мл

Фракция I: пропускали 4 порции 96% этанола по 10 мл, первую порцию собирали, остальные три отбрасывали.

Фракция II: пропускали 8 порций элюирующей смеси по 10 мл, первую порцию собирали, остальные семь отбрасывали.

Фракция III: пропускали 10 мл элюирующей смеси и фракцию собирали [3].

Каждую фракцию высушивали под вакуумом при 40°C и сухой остаток растворяли в 1 мл 96% этанола.

Результаты количественного определения комплексов проантоцианидинов в пересчете на цианидин хлорид представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Количественное содержание комплексов проантоцианидинов во фракциях

№ фракции	фракция	содержание, %
I	флавоноиды	4,1
II	олигомеры проантоцианидинов ($n=2-8$)	6,0
III	полимеры проантоцианидинов ($n>8$)	0,1

По результатам количественного определения (табл. 3.) доминирующей группой являются олигомеры проантоцианидинов со степенью полимеризации 2-8 (фракция II): 6,0%.

Далее нами проводилось хроматографическое исследование методами ТСХ и ВЭЖХ фракций, полученных на колонке с полиамидом.

Хроматографическое исследование методом ТСХ

На линию старта пластинки «Сорб-фил ПТСХ-В» наносили с помощью градуированного капилляра по 2 мкл каждой фракции в виде полоски: длиной 5 мм и шириной 5 мм.

Хроматографическую пластинку помещали в камеру, которую предварительно насыщали в течение 2 часов смесью

растворителей этилацетат: метанол: вода: муравьиная кислота (8,5:0,3:0,35:0,4). Состав данной оптимальной хроматографической системы был нами установлен в ходе предварительных исследований.

Пластинку хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 10 см, пластинку вынимали из камеры, и сушили на воздухе до полного удаления растворителей.

Для обнаружения проантоцианидинов хроматограмму опрыскивали 1 % рас-

твором ванилина в этиловом спирте, затем погружали на 1-2 мин в 10% раствор серной в этиловом спирте и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 5 минут. Появление на хроматограмме зон, окрашенных в красный цвет, свидетельствует о содержании во фракциях проантоцианидинов. В таблице 4 приведены значения Rf полученных хроматографических пятен.

Таблица 4 - Значения Rf хроматографических пятен выделенных на полиамиде фракций проантоцианидинов

Фракция	Rf
I	71-77 40-49
II	50-56
III	28-32

Согласно литературным данным [6], 70% водный раствор ацетона обладает высокой элюирующей способностью и позволяет практически полностью десорбировать с полиамида сумму проантоцианидинов. На рис. 2 представлены хроматограмма и денситограмма суммы проантоцианидинов, полученные путем элюирования 70% водным ацетоном сорбированного на полиамиде спиртового извлечения кор-

невищ с корнями сабельника болотного. Наличие четырех хроматографических зон со значениями Rf, соответствующими значениям Rf хроматографических пятен, полученных путем хроматографирования отдельных фракций проантоцианидинов сабельника болотного, подтверждает полностью фракционирования на колонке с полиамидом по предложенной методике.

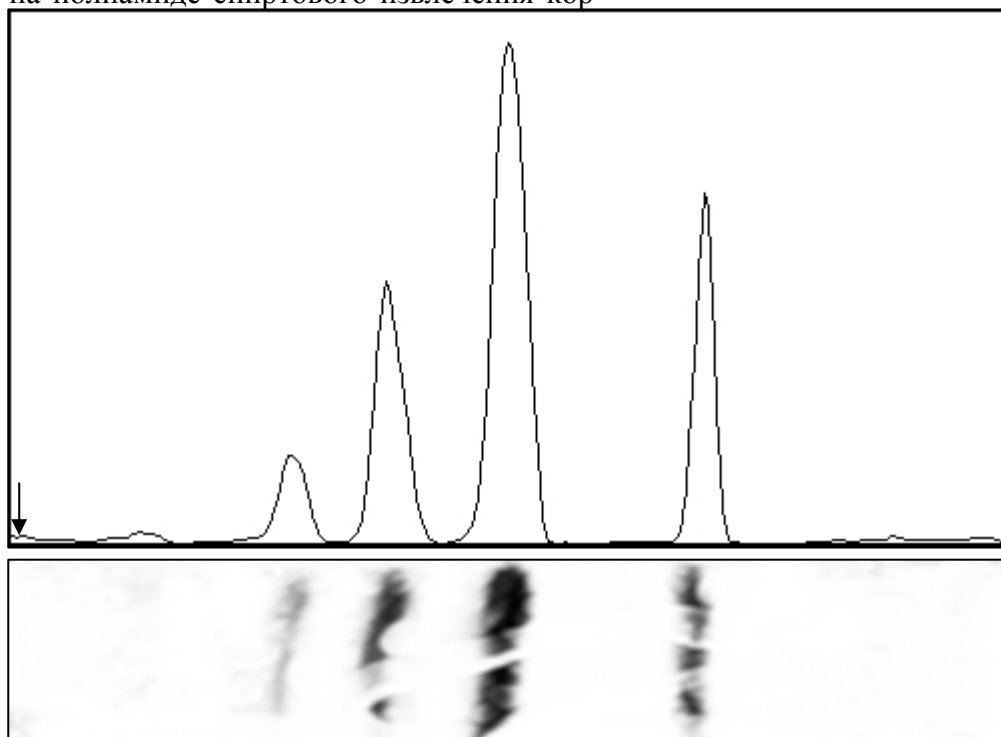


Рис. 2. Хроматограмма и денситограмма суммы проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного (↓-старт)

Хроматографическое исследование методом ВЭЖХ

На линии старта пластинок «Сорб-фил ПТСХ-В» наносили с помощью градуированного капилляра по 10 мкл каждой фракции в виде полоски и хроматографировали в условиях, описанных выше. Высушенные на воздухе хроматограммы, делили на 2 части: первую часть проявляли, как описано выше, со второй части хроматограмм соскабливали сорбент на уровне проявленных пятен первой части пластинок и растворяли в 0,5 мл 96% этилового спирта. Исследования проводили на хроматографе Agilent HP 1100. В работе при-

меняли обращеннофазный метод: неподвижная фаза - колонка Zorbax SB-C 18 (4,6×250 мм), подвижная фаза – ацетонитрил-0,1 % фосфорная кислота в соотношении 10:90. Оптимальные условия хроматографирования были подобраны экспериментально. Анализ проводили при 20°C в изократическом режиме элюирования со скоростью подачи элюента 1 мл/мин. Для детектирования применяли УФ-детектор ($\lambda=280$ нм). По 20 мкл полученных извлечений вводят в хроматограф и анализируют в описанных выше условиях. В таблице 5 приведены значения времен удерживания (t) фракций проантоцианидинов.

Таблица 5 - Значения времен удерживания (t) фракций проантоцианидинов.

Фракция	t, мин
I	12,9
	10,8
II	11,3
III	8,6

Исходя из полученных данных, в каждой из хроматографических зон фракций, полученных на полиамиде, содержится только одно вещество, что свидетельствует об эффективности разделения.

По временам удерживания хроматографических зон, полученные вещества были найдены в цельных фракциях, полученных на полиамиде.

ВЫВОДЫ

Разработаны методики фракционирования комплексов проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного, не требующие применения сложного оборудования и позволяющие количественно охарактеризовать каждую фракцию.

Определена доминирующая группа проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного: олигомеры проантоцианидинов со степенью полимеризации 2-8 (фракционирование на полиамиде), низкомолекулярные проантоцианидины со степенью полимеризации меньше 5 (фракционирование на C_{16} -силикагеле).

ЛИТЕРАТУРА

1. Спрыгин, В.Г. Природные олигомерные проантоцианидины – перспективные регуляторы метаболических нарушений / В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова // Вестник ДВО РАН. – 2006. - №2. – С. 81-90.
2. Спрыгин, В.Г. Метод оценки и стандартизации олигомерных проантоцианидиновых комплексов, полученных из различных видов растительного сырья / В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т 36. – № 3. - С. 31-35.
3. Kathrin, Koll. Optimierung und Validierung dunnschichtchromatographischer Verfahren in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka: dis. ... zur Erlangung des Doktorgrades / Kathrin Koll. -- Bonn. 2004. – 104 с.
4. Гнедков, П.А. О качестве сырья для получения препарата Биосед / П.А. Гнедков, А.П. Гнедкова // Химико-фармацевтический журнал. – 1975. – Т 9. – С. 36-41.
5. Ёршик, О.А. Количественное определение проантоцианидинов в сабельнике болотном *Comarum palustre* L. / О.А. Ёр-

шик, Г.Н. Бузук // Вестник Фармации. – 2007. – № 4. – С. 10-17.

6. Miami University's centralized web server for personal web pages [Electronic resource] / Professor Ann E. Hagerman. – Tannin Chemistry. – Oxford, 2002. – mode of access: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>. – Date of access: 1.10.2006.

SUMMARY

O.A. Yorshyk, G.N. Buzuk
FRACTIONING OF
PROANTHOCYANIDINS COMPLEXES
OF RHIZOMES WITH ROOTS OF
COMARUM PALUSTRE L.

The article is devoted to the methods of fractioning of proanthocyanidins complexes of rhizomes with roots of Comarum palustre, which do not require sophisticated equipment. The fractioning was conducted according to two methodics: on a stand – pipe with polyamid and on a stand – pipe with sorbent «Disorb – 100 – C16». Each of the obtained fractions was quantitatively assessed, and on the basis of the received data the dominating group of proanthocyanidins complexes with a certain level of polymerization was defined. A chromatographic investigation by methods TLC (Thin Layer Chromatography) and HPLC (High Performance Liquid Chromatography) of fractions, received on a stand – pipe with polyamid, confirmed the presence in each chromatographic zone of just one substance, which confirms the effectiveness of fractioning. By times of keeping the chromatographic zones, the obtained substances were discovered in whole fractions, obtained on polyamid. The dominating group of proanthocyanidins in rhizomes with roots of Comarum palustre was defined as follows: «oligomeric proanthocyanidins with the degree of polymerization 2-8 (fractioning through polyamide), low molecular proanthocyanidins with the degree of polymerization less than 5 (fractioning through C16 – silicagel).

Поступила 09.01.2008 г.

А.А. Карусевич, Д.В. Моисеев, Г.Н. Бузук

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ НАКОПЛЕНИЯ 20- ГИДРОКСИЭКДИЗОНА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ ЗАГОТОВКИ ЛИСТЬЕВ ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ

Витебский государственный
медицинский университет

*Изучена динамика накопления 20-гидроксиэкдизона в листьях левзеи сафлоровидной (*Rharrhena carthamoides*) по фазам вегетации. Оценка количественного содержания фитостероида в водно-спиртовом экстракте листьев *Rharrhena carthamoides* проводили методом ВЭЖХ (колонка Waters Spherisorb ODS-2 250x4,6 мм, 5 мкм) с изократическим режимом элюирования подвижной фазы (ПФ). Оптимальный период заготовки листьев левзеи сафлоровидной – первая и вторая декады июня.*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой интерес с научной точки зрения представляют полиоксигидроксилированные стероиды, выделенные из различных объектов животного и растительного происхождения – так называемые экдистероиды [1,2]. Структурно идентичные гормонам линьки и метаморфоза насекомых, они обладают выраженными фармакологическими свойствами, наиболее значимые из которых – повышение физической работоспособности и выносливости, стимулирующее действие на центральную нервную систему (ЦНС), анаболический эффект [3]. Изучение этого класса соединений открывает новые перспективы в фармакологии.

Соединения класса экдистероидов широко распространены в природе. В растительном мире они найдены более чем в 80 семействах [4]. Основное содержание при этом приходится на α -экдизон и β -экдизон (так называемый 20-