

ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО COMARUM PALUSTRE L.

Витебский государственный
медицинский университет

В работе проведено исследование компонентного состава проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного. Исследование проводилось путем экстракции из исследуемого сырья суммы проантоцианидинов с помощью смеси ацетон-вода (7:3), и дальнейшего гидролитического расщепления проантоцианидиновых комплексов различной степени полимеризации с использованием флороглюцина. Идентификацию продуктов гидролитического расщепления осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии. Продукты гидролитического расщепления (катехин, эпикатехин) идентифицировали с помощью стандартных веществ. Проведение данной методики и хроматографическое исследование методами высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии продуктов гидролитического расщепления позволили идентифи-

цировать мономерные единицы: катехин, эпикатехин. Состав проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного можно представить следующими комбинациями мономерных единиц различной степени полимеризации: эпикатехин_n-(4β→8)-катехин, эпикатехин_n-(4β→8)-эпикатехин, катехин_n-(4β→8)-катехин, катехин_n-(4β→8)-эпикатехин.

ВВЕДЕНИЕ

Химический состав корневищ с корнями сабельника болотного представлен полифенольным комплексом, в котором преобладают дубильные вещества, главным образом, конденсированные [1-3]. В настоящее время конденсированные дубильные вещества рассматриваются как высокополимерные производные проантоцианидинов [4].

Проантоцианидиновые комплексы представлены соединениями с различным сочетанием и количеством входящих в их состав мономерных единиц флаван-3-ола: катехин, эпикатехин, галлокатехин и эпигаллокатехин. Так, например, катехин и эпикатехин – основополагающие мономерные единицы проантоцианидина, а галлокатехин и эпигаллокатехин – проантодельфинидина [5- 7]. В зависимости от этих сочетаний выделяют различные виды проантоцианидинов (табл. 1) [7].

Таблица 1 - Виды проантоцианидинов

Название проантоцианидина	Состав проантоцианидина
B ₁	эпикатехин-(4β→8)-катехин
B ₂	эпикатехин-(4β→8)-эпикатехин
B ₃	катехин-(4β→8)-катехин
B ₄	катехин-(4β→8)-эпикатехин
B ₅	эпикатехин-(4β→6)-эпикатехин
B ₆	катехин-(4β→6)-катехин
B ₇	эпикатехин-(4β→6)-катехин
B ₈	катехин-(4β→6)-эпикатехин

Катехиновые единицы в проантоцианидинах в основном связаны через атомы углерода, находящиеся в 4-м, 8-м или 6-м положениях. В зависимости от номера углеродного атома, участвующего в образовании связи, вы-

деляют различные типы проантоцианидинов (табл. 2). У проантоцианидинов А типа мономерные единицы связаны двумя связями (одной С-С и одной С-О) [5 - 7].

Таблица 2 - Типы проантоцианидинов

Тип проанто-цианидина	Связь	Название проантоцианидинов
В	4→6	B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₈
	4→8	B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₄
С	4→8, 4→8	C ₁ , C ₂
А	4→8, 2→7	A ₂

В свою очередь, составы проантоцианидинов представлены различными степенями полимеризации.

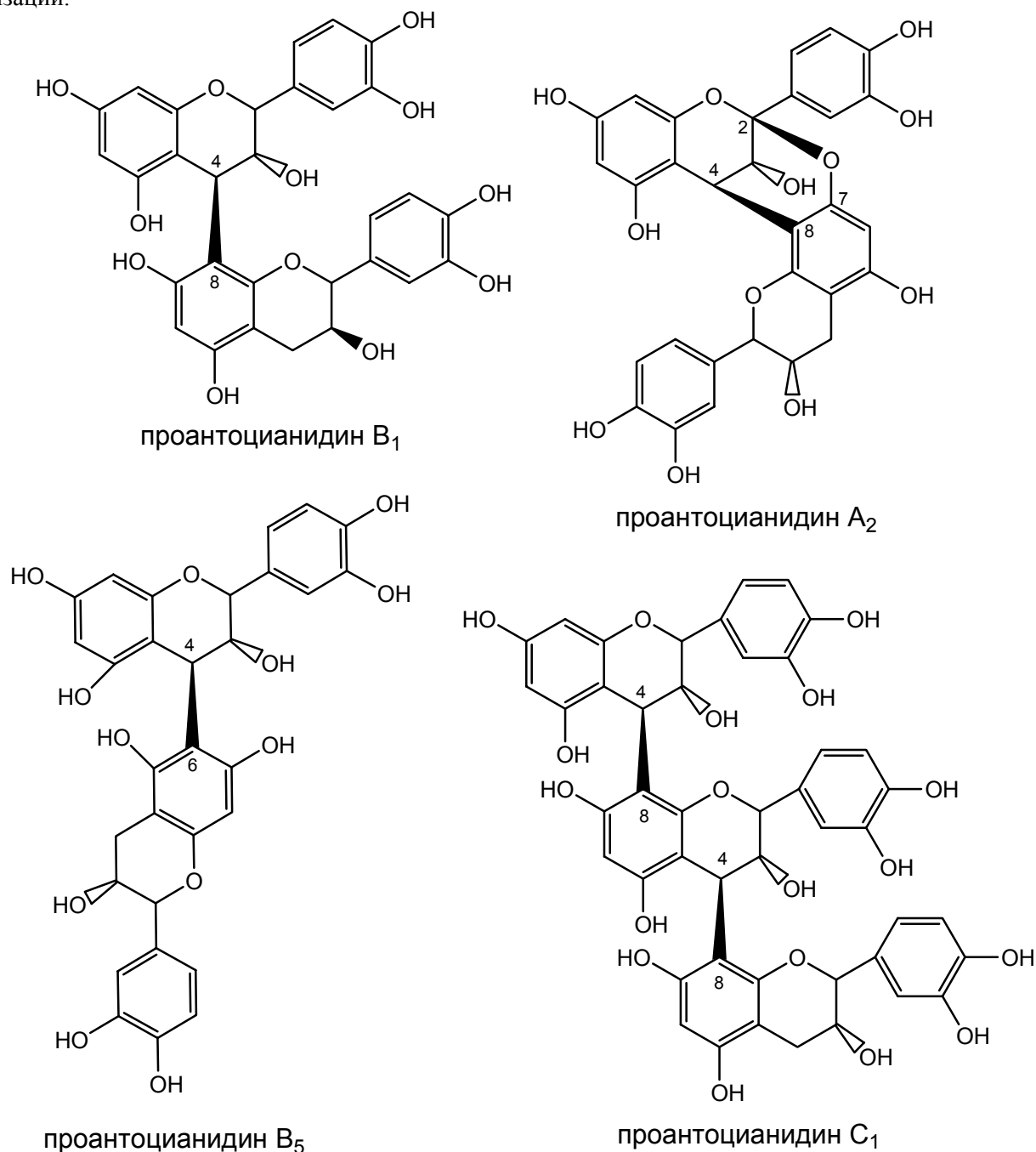


Рис. 1. Формулы проантоцианидинов

Так, проантоцианидины типа А и В являются димерами, типа С – тримерами [7]. Для примера на рисунке 1 представлены формулы некоторых проантоцианидинов: проантоцианидин В₁ (эпикатехин-(4β→8)-катехин) относится к типу В (димер), мономерные единицы связаны 4→8 углеродной связью; проантоцианидин В₅ (эпикатехин-(4β→6)-эпикатехин) относится к типу В (димер), мономерные единицы связаны 4→6 углеродной связью; проантоцианидин А₂ (эпикатехин-(2→7, 4→8)-эпикатехин) относится к типу А (димер), мономерные единицы связаны 4→8 углеродной

связью и 2→7 С-О связью; проантоцианидин С₁ (эпикатехин-(4→8, 4→8)-эпикатехин) относится к типу С (тример), мономерные единицы связаны 4→8, 4→8 углеродными связями. 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 [5].

Как правило, в растении одновременно находятся мономеры, димеры, тримеры, образующие далее тетрамеры, пентамеры, гексамеры, гептамеры и высокомолекулярные цепи

проантоцианидинов.

Целью данной работы является идентификация продуктов гидролитического расщепления проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно литературным данным, для установления продуктов гидролитического расщепления проантоцианидиновых комплексов с различной степенью полимеризации широко применяется методика с использованием

флороглюцина [4, 8, 9]. Проведение данной методики и хроматографическое исследование методами ВЭЖХ и ТСХ продуктов гидролитического расщепления позволяет идентифицировать мономерные единицы (катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин).

В качестве примера на рис. 2 показано гидролитическое расщепление проантоцианидина (эпикатехин₂-(4β→8)-катехин) в результате взаимодействия с флороглюцином.

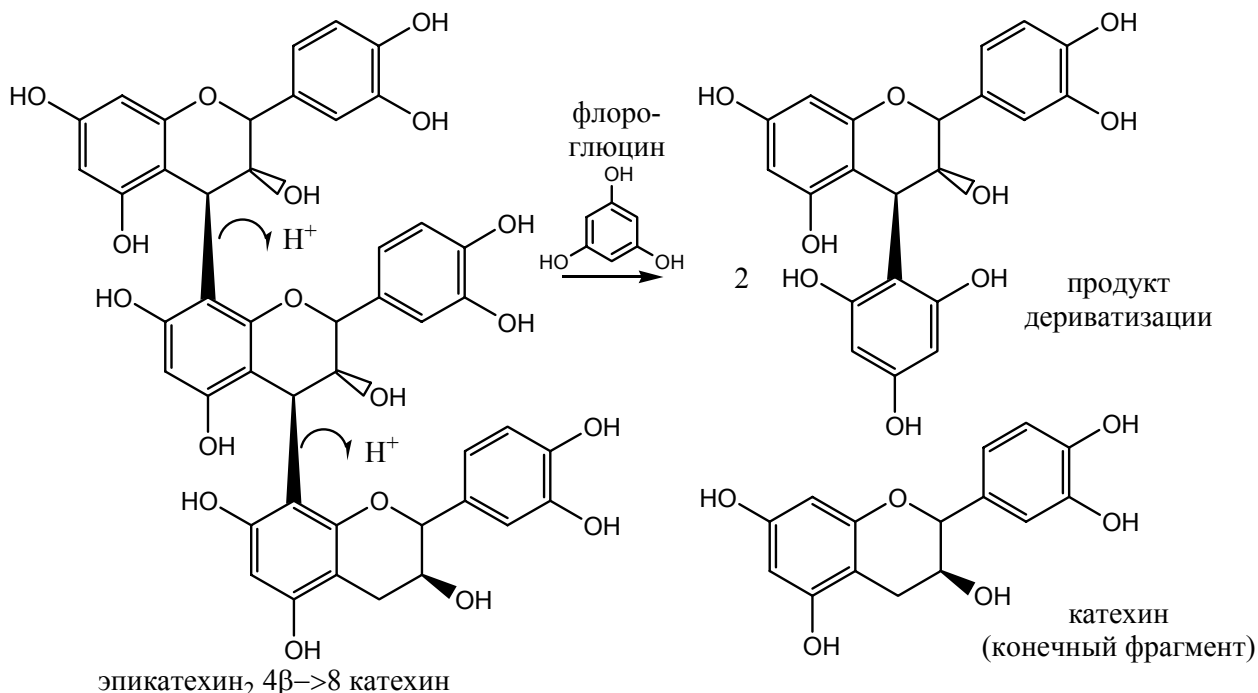


Рис. 2. Схема гидролиза проантоцианидина (эпикатехин₂-(4β→8)-катехин) в присутствии флороглюцина

Как видно на рис. 2, продуктами гидролитического расщепления данного проантоцианидина являются 2 молекулы продукта дериватизации, а именно: эпикатехин замещен в положении 4 на флороглюцин, и конечный фрагмент – немодифицированный катехин, который можно обнаружить хроматографическими методами [4, 8, 9].

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.

Около 0,5 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром 0,25 мм, экстрагировали 20 мл 70% водного ацетона на водяной бане в течение 20 минут. Готовое извлечение охлаждали и центрифугировали со скоростью

1000 об/мин в течение 15 минут.

Полученное извлечение выпаривали в токе азота, сухой остаток растворяли в 1 мл флороглюцинового реактива и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов. Полученный раствор упаривали в токе азота. Сухой остаток, полученный после упаривания, растворяли в 0,3 мл воды очищенной и экстрагировали трижды этилацетатом (на одну экстракцию израсходовали 0,3 мл этилацетата). Полученные этилацетатные фракции объединяли и упаривали. Полученный остаток растворяли в 1 мл 70% водного метанола.

Параллельно готовили раствор сравнения: 1 мл флороглюцинового реактива упаривали в токе азота. Сухой остаток, полученный после упаривания, растворяли в 0,3 мл воды очищенной и экстрагировали трижды этилацетатом (на одну экстракцию израсходовали 0,3 мл этилацетата). Полученные этилацетатные фракции объединяли и упаривали. Получен-

ный остаток растворяли в 1 мл 70% водного метанола. В качестве стандартных образцов использовали катехин и эпикатехин, растворенные в 1 мл 70% водного метанола.

Реагенты:

1. Кислый этанол: 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной в мерной колбе вместимостью 100 мл доводят до метки абсолютным этанолом.

2. Флороглюциновый реактив: 5 мг/мл флороглюцина в кислом этаноле. Раствор готовится ежедневно.

3. Раствор 70% водного метанола.

Исследования проводили на хроматографе Agilent HP 1100. В работе применяли обращеннофазный метод: неподвижная фаза - колонка Zorbax SB-C₁₈ (4,6×250 мм), подвижная фаза:

Растворитель А: 1% водный раствор уксусной кислоты;

Растворитель В: метанол: растворитель А (60:40).

Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме (табл. 3).

Таблица 3 - Градиентный режим хроматографического анализа

Время анализа, мин	Градиент подвижной фазы
0	100% состава А
60	40% состава А: 60% состава В
65	100% состава В

Хроматографический анализ проводили при 20°C со скоростью подачи элюента 1 мл/мин. Для детектирования применяли УФ-детектор ($\lambda=280$ нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для идентификации хроматографических пиков, полученных при взаимодействии проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного с различной степенью полимеризации с флороглюцином, нами был проведен хроматографический анализ в градиентном режиме следующих стандартных веществ: катехина, эпикатехина, флороглюцина.

На рис. 3 приведена хроматограмма проанализированных стандартных веществ: хроматографический пик 1 со временем удерживания 7,3 – флороглюцин, хроматографиче-

ский пик 3 со временем удерживания 33,6 – катехин, хроматографический пик 4 со временем удерживания 43,6 – эпикатехин.

На рис. 4 представлена хроматограмма ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного до проведения реакции с флороглюцином (часть В) и после проведения реакции с флороглюцином (часть А). После проведения реакции с флороглюцином на хроматограмме (рис. 4 часть А) появляются новые хроматографические пики, соответствующие флороглюцину (1): время удерживания 7,3; продукту дериватизации, а именно, флороглюцину, связанному с катехином и эпикатехином (2): время удерживания 20,3; катехину (3): время удерживания 33,6 и эпикатехину (4): время удерживания 43,6.

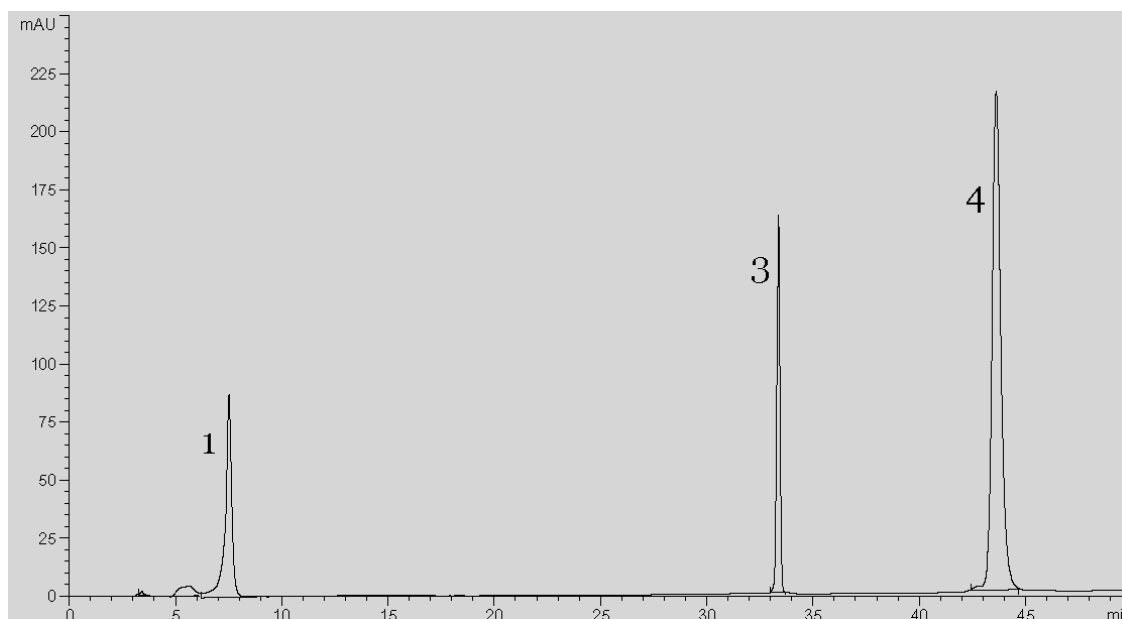


Рис. 3. Хроматограмма стандартных веществ

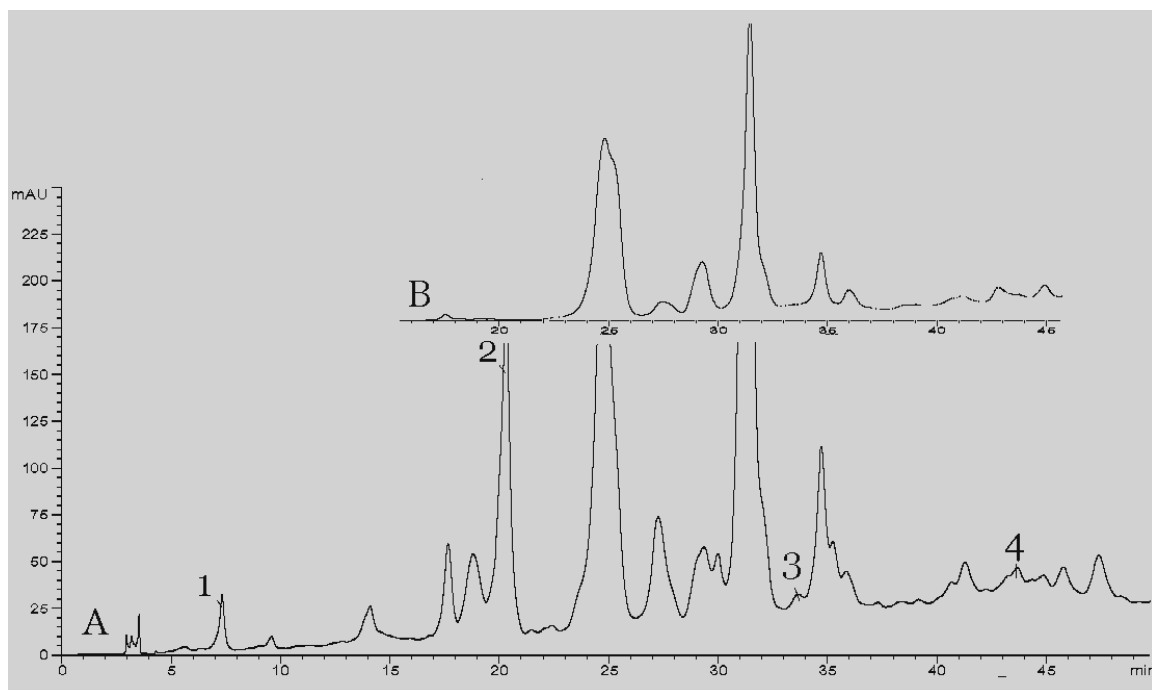


Рис. 4. Хроматограмма ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного до (часть В) и после (часть А) проведения реакции с флороглюцином

Появление новых хроматографических пиков 3 и 4 (рис. 4, часть А), соответствующих по времени удерживания стандартным веществам катехина и эпикатехина, свидетельствует, что продуктами гидролитического расщепления проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного являются катехин и эпикатехин.

Хроматографическое исследование методом ТСХ

Хроматографическое исследование методом ТСХ ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного до и после проведения реакции с флороглюцином проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ-В» и в тонком слое целлюлозы.

На линию старта пластинок «Сорбфил ПТСХ-В» и целлюлозы наносили стандартные вещества катехина, эпикатехина, флороглюцина, а также ацетоновое извлечение корневищ с корнями сабельника болотного до и после проведения реакции с флороглюцином.

Хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-В» 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 хроматографической системы был нами установлен в ходе предварительных исследований.

Хроматографическую пластинку с тонким слоем целлюлозы помещали в камеру, которую предварительно насыщали в течение 2 часов смесью растворителей бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:2). Состав данной хроматографической системы был нами установлен в ходе предварительных исследований.

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

Для обнаружения проантоцианидинов хроматограммы опрыскивали 1 % раствором ванилина в этиловом спирте, затем погружали на 1-2 мин в 10% раствор кислоты серной в этиловом спирте и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 5 минут.

На хроматографических пластинках «Сорбфил ПТСХ-В» хроматографические пятна стандартных веществ имели следующие значения R_f : катехин ($R_f=78-80$), эпикатехин ($R_f=84-86$), флороглюцин ($R_f=87-89$).

В таблице 4 приведены значения R_f хроматографических пятен, полученных на пластинках «Сорбфил ПТСХ-В», ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного после проведения реакции с флороглюцином.

Таблица 4 - Значения R_f хроматографических пятен, полученных на пластинках «Сорбфил ПТСХ-В», ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного после проведения реакции с флороглюцином

№ хромато-графического пятна	R_f
1	87-89
2	84-86
3	78-80
4	64-66

При сравнении значений R_f хроматографических пятен, полученных на пластинках «Сорбфил ПТСХ-В», ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного после проведения реакции с флороглюцином со значениями R_f стандартных веществ можно идентифицировать следующие хроматографические пятна: пятно № 1, соответствующее флороглюцину ($R_f=87-89$), пятно № 2, соответствующее эпикатехину ($R_f=84-86$), пятно № 3, соответствующее катехину ($R_f=78-80$).

Хроматографическое пятно № 4 ($R_f=64-66$) соответствует продукту дериватизации проантоцианидинов корневищ с корня-

ми сабельника болотного, а именно, флороглюцину, связанному с катехином и эпикатехином.

В тонком слое целлюлозы хроматографические пятна стандартных веществ имели следующие значения R_f : катехин ($R_f=48-50$), эпикатехин ($R_f=52-55$), флороглюцин ($R_f=65-68$).

В табл. 5 приведены значения R_f хроматографических пятен, полученных в тонком слое целлюлозы, ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного после проведения реакции с флороглюцином.

Таблица 5 - Значения R_f хроматографических пятен, полученных в тонком слое целлюлозы, ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного после проведения реакции с флороглюцином

№ хромато-графического пятна	R_f
1	65-68
2	53-55
3	48-50
4	34-37

При сравнении значений R_f хроматографических пятен, полученных в тонком слое целлюлозы, ацетонового извлечения корневищ с корнями сабельника болотного после проведения реакции с флороглюцином со значениями R_f стандартных веществ можно идентифицировать следующие хроматографические пятна: пятно № 1, соответствующее флороглюцину ($R_f=65-68$), пятно № 2, соответствующее эпикатехину ($R_f=53-55$), пятно № 3, соответствующее катехину ($R_f=48-50$). Хроматографическое пятно № 4 ($R_f=34-37$) соответствует продукту дериватизации проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного, а именно, флороглюцину, связанному с катехином и эпикатехином.

Таким образом, хроматографическое исследование методом ТСХ на пластинках «Сорбфил ПТСХ-В» и в тонком слое целлюлозы доказало, что продуктами гидролитическо-

го расщепления проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного являются катехин и эпикатехин.

ВЫВОДЫ

1. Хроматографическое исследование методами ТСХ и ВЭЖХ доказало, что мономерными единицами проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного являются катехин и эпикатехин.
2. Состав проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного можно представить следующими комбинациями мономерных единиц различной степени полимеризации: эпикатехин_n-(4 β →8)-катехин, эпикатехин_n-(4 β →8)-эпикатехин, катехин_n-(4 β →8)-катехин, катехин_n-(4 β →8)-эпикатехин.

SUMMARY

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

This research is devoted to examine the components of. The research has been conducted by ways of extraction from the raw material the sum of proantocyanidins using the mix of acetone: water (7:3) and further hydrolytical split of the proantocyanidins complexes of different degree of polymerization using phloroglucinol. The identification of hydrolytical split products has been exercised using the high. The products of the hydrolytical split (catechin, epicatechin) have been identified using standard substances. The usage of current methods along with chromatographic research by methods of high performance liquid and thin layer chromatography of products of hydrolytic split have allowed to identify monomeric units: catechin, epicatechin.

The composition of the proantocyanidins of the rhizomes with roots of Comarum palustre can be represented in the following: combinations of monomeric units of different degree of polymerization: epicatechin_n-(4β→8)-catechin, epicatechin_n-(4β→8)-epicatechin, catechin_n-(4β→8)-catechin, catechin_n-(4β→8)-epicatechin.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лантратова, А.С. Сезонное развитие сабельника болотного и багульника болотного в южной Карелии и динамика содержания минеральных и органических веществ в их растительном сырье / А.С. Лантратова [и др.] // Сезонная ритмика и продуктивность дикорастущих лекарственных растений. – М., 1988. – С. 62-73.
2. Люкшенкова, Е.Я. Фармакологическое изучение сабельника болотного (Comarum palustre L.) / Е.Я. Люкшенкова, М. Георгиу, Э.А. Бурдыкина-Шехтер // Аптечное дело. – 1962. – № 2. – С. 34-44.
3. Наумчик, Г.Н. Фитохимическое исследование сабельника болотного и приготовление из него некоторых лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Ленинградский хим. фарм. институт. – Л., 1964. – 17 с.
4. 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.

5. Спрыгин, В.Г. Природные олигомерные проантоцианидины – перспективные регуляторы метаболических нарушений / В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова // Вестник ДВО РАН. – 2006. – №2. – С. 81-90.
6. USDA Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods / Prepared by Nutrient Data Laboratory Beltsville Human Nutrition Research Center Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture. – Ocean Spray Cranberries, Inc. Lakeville, MA, August 2004. – P. 33.
7. Anne Marie Fine, Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications / Anne Marie Fine // Alternative Medicine Review. – 2000. – Vol. 5. № 2. – P. 8.
8. Early Steps in Proanthocyanidin Biosynthesis in the Model Legume Medicago truncatula / Yongzhen Pang [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 145. – P. 601–615.
9. McCALLUM, J. A. Proanthocyanidins in Wheat Bran / J. A. McCALLUM, J. R. L. WALKER // Cereal Chem. – 1990. – №3. – Vol.67. – С. 282-285

Поступила 31.03.2008 г.

М. М. Коноплева

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В
ЛИСТЬЯХ ЗЕМЛЯНИКИ ЛЕСНОЙ

Витебский государственный
медицинский университет

Предложена методика количественного определения суммы фенольных соединений в листьях земляники лесной методом спектрофотометрии. В основе методики лежит реакция окисления фенольных соединений фосфорномолиб-деновоольфрамным реактивом. В ходе разработки методики определены оптимальные условия проведения реакции. Расчет содержания суммы фенольных соединений проводили с использованием удельного показателя поглощения галловой кислоты - 850. Относительная ошибка предложенной методики - 4,1%.