

ФАРМАКОГНОСТИЧНІ, ФІТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 615.322:582.998.1:581.192.08](477)

Я. В. ПОПОВА¹, здобувач, О. В. МАЗУЛІН¹, д-р фарм. наук, проф.,

Г. В. МАЗУЛІН¹, канд. фарм. наук, Т. В. ОПРОШАНСЬКА², канд. фарм. наук

¹ Запорізький державний медичний університет

² Національний фармацевтичний університет, м. Харків

ФІТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ТРАВИ *CIRSIIUM ARVENSE* (L.) SCOP. ФЛОРИ УКРАЇНИ

Ключові слова: осот польовий, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія

Перспективними джерелами для поглибленого фітохімічного дослідження з метою створення високоефективних лікарських засобів із протизапальною, антиоксидантною та гепатопротекторною дією є види роду *Cirsium* L. (Осот) род. *Asteraceae* (Айстрові). Вони нараховують у світовій флорі до 300 видів багаторічних трав'янистих рослин. Представники роду дуже широко розповсюджені по території країн Європи, Північної Африки, Північної та Центральної Америки. В Україні на сьогодні відомі понад 30 видів [1, 2, 3, 6].

Цікавим для дослідження та подальшого застосування в медицині України є осот польовий (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). Настій трави рослини (1:10) широко використовують у науковій та народній медицині багатьох країн як ефективні протизапальні, протипухлинні, гепатозахисні та гепатопротекторні засоби [1, 3, 4]. Встановлено, що біологічна активність лікарських засобів із рослинної сировини представників роду *Cirsium* L. пов'язана насамперед із накопиченням біологічно активних флавоноїдів та окремих гідроксикоричних кислот [3, 4, 5]. Флавоноїдам (похідним бензо- γ -пірону) притаманна висока й різноманітна біологічна активність: Р-вітамінна, антиоксидантна, антитоксична, протизапальна, протівірусна, протимікробна, репаративна, гіпоглікемічна, антисклеротична, гепатозахисна, гепатопротекторна, спазмолітична та ін. У видах роду *Cirsium* L. найчастіше ідентифікують похідні флавононів (лютеоліну, апігеніну), які виявляють протизапальну, сечогінну та спазмолітичну активність, та флавонолів (рутину, кверцетину, кемпферолу, квецетагетину) із вираженою Р-вітамінною, протизапальною, гіпоазотемічною та сечогінною дією [5, 7]. Гідроксикоричні кислоти присутні в рослинах сумісно із флавоноїдами. Вони містять у своїй структурі як карбоксильну, так фенольну та гідроксильну групи, що поєднані з ароматичним кільцем. Виявляють як виражену протизапальну, так і ранозагоювальну дію [3, 4]. Однак слід зазначити, що на сьогодні, за аналізом літератури, практично не проведено з допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) досліджень складу та накопичення цих важливих речовин у вегетаційний період *Cirsium arvense* (L.) Scop. Актуальною проблемою є також розроблення ефективних методів фізико-хімічного аналізу та стандартизації за вмістом переважаючих компонентів цієї рослини.

Осот польовий відомий як типовий смітник, що росте по полях, городах, лісових галявинах, уздовж доріг, у чагарниках. Це дворічна добре розвинута рослина заввишки 90–160 см. Має пряме, розгалужене стебло, вздовж вкрите волосками. Листя цілокрає, зубчасте, з міцними колочками по краях, перисторозсічене. Коренева система стрижнева, міцно розвинута. Розмножується насінням та кореневими паростками. Цвіте в червні–вересні. Відтворює типові для айстрових суцвіття кошики, зібрані у волоть, з яскравими рожевими квітками. Плід сім'янка, насіння обернено-яйцевидне чорно-бурого ко-

льору (2,5–4,5 x 0,7–1,0 x 1,7 мм) [1, 2]. Із трави рослини в сучасній народній та науковій медицині багатьох країн переважно виготовляють настій (1:10), який застосовують як протизапальний та ранозагоювальний засіб при лікуванні ран, фурункулів, гемороїдальних шишок [1]. Водночас необхідно зазначити, що хімічний склад трави *Cirsium arvense* (L.) Scop. флори України за складом та вмістом основних біологічно активних сполук слід віднести до маловивчених. Застосування в сучасній практиці фітохімічного аналізу методу ВЕРХ дає змогу успішно вирішувати завдання визначення флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у рослинній сировині й комплексних препаратах на її основі [8].

Метою цієї роботи було дослідження складу та кількісного вмісту поліфенольних сполук у траві *Cirsium arvense* (L.) Scop. флори України під час цвітіння, зібраній у м. Володимирівка Запорізької області (червень–липень, 2013–2015 рр.).

Матеріали та методи дослідження

Рослинну сировину, траву (суцвіття та прилегле листя) *Cirsium arvense* (L.) Scop., заготовлено під час цвітіння відповідно до загальноприйнятих вимог ДФУ [9]. Сушіння здійснювали у сушильній шафі за температури не більше 40 °С протягом 12 год.

Присутність флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у попередньо очищених відстоюванням (10 год за температури 15 °С) та фільтруванням концентрованих спиртових та водних витягах (1:5) із трави *Cirsium arvense* (L.) Scop. визначали специфічними хімічними реакціями та тонкошаровою хроматографією (ТШХ) на пластинках Aluminium oxide 150 F 254 (0,20 мм) (MERCCK, Німеччина). Одержані хроматограми висушували на сушарці УСП-2 фірми ООО «ИМИД» за температури 30 °С і проглядали в УФ-променях.

Флавоноїди ідентифікували в системах: бензол–етилацетат–кислота оцтова–формамід (70:30:2:1), етилацетат–кислота оцтова–вода очищена (10:2:3); гідроксикоричні кислоти: хлороформ–спирт етиловий (9:1), хлороформ–спирт етиловий–кислота оцтова–вода очищена (6:2:0,1:0,1). Паралельно здійснювали хроматографічний аналіз робочих стандартних зразків (РСЗ) досліджуваних флавоноїдів та гідроксикоричних кислот. Для підтвердження складу флавоноїдів та гідроксикоричних кислот і визначення їх кількісного вмісту використовували метод ВЕРХ на хроматографі Shimadzu LC-20 Prominence з УФ-детектором, Японія. Хроматографічна колонка Phenomenex Luna C18(2) завдовжки 250 мм із внутрішнім діаметром 4,6 мм, заповнена сорбентом ($d = 5$ мм). Ідентифікацію компонентів виконували за часом утримування та відповідністю УФ-спектрів стандартам.

Методика: 1,0 г (точна наважка) подрібненої рослинної сировини ($d = 0,1$ мм), вносили в колбу ємністю 100 мл, додавали 40 мл спирту метилового (70%), нагрівали зі зворотним холодильником на киплячій водяній бані 30 хв, екстракцію виконували двічі. Охолоджували, фільтрували в мірну колбу ємністю 100 мл крізь тефлоновий мембранний фільтр ($d = 0,45$ мкм) та доводили об'єм тим самим розчинником до позначки. 5 мкл отриманого розчину вводили до колонки приладу. Використовували рухомі фази: 0,1%-й розчин трифтороцтової кислоти у воді дистильованій, 0,1%-й розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі. Швидкість рухомої фази становила 1 мл/хв, робочий тиск елюента – 240–300 кПа, температура термостата – 35 °С. Фіксацію спектра здійснювали в інтервалі від 190 до 600 нм ($\lambda = 330$ нм).

Результати досліджень піддавали статистичному обробленню за допомогою «Microsoft Office Excel 2003». Достовірність одержаних відмінностей величин, що зіставляли, оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента. Виконано 6 визначень, для яких достовірними є відмінності з рівнем значущості більше 95% [7].

Результати дослідження та обговорення

Одержані дані наявності та визначення кількісного вмісту флавоноїдів та гідроксикоричних кислот в траві *Cirsium arvense* (L.) Scop. наведено на рисунку та в таблиці.

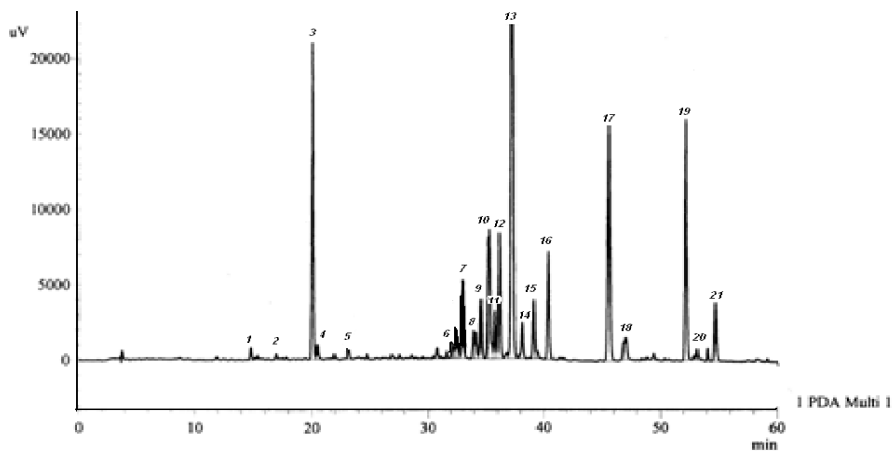


Рис. ВЕРХ поліфенольних сполук метанольного витягу з трави *Cirsium arvense* (1:100): 1 – кафтарова кислота; 2 – протокатехова кислота; 3 – хлорогенова кислота; 4 – неохлорогенова кислота; 5 – кавова кислота; 6 – рутин; 7 – гіперозид; 8 – апігенін-7-О-β-D-глюкопіранозид; 9 – кверцетин-3-глюкозид; 10 – кемпферол-3-О-метиловий ефір; 11 – кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозид; 12 – кверцетин; 13 – лінарин; 14 – лютеолін-5-О-β-D-глюкопіранозид; 15 – лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид; 16 – гіспідулін-7-О-β-D-глюкопіранозид; 17 – лютеолін; 18 – пектолінарин; 19 – апігенін; 20 – акацетин; 21 – кемпферол

Т а б л и ц я

Кількісний вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у траві *Cirsium arvense* (L.) Scop.

Найменування сполуки	Кількісний вміст, %	Вихід, (t) хв	λ_{\max} , нм
Кафтарова кислота	0,014 ± 0,001	14,93	290
Протокатехова кислота	0,006 ± 0,001	18,09	287
Хлорогенова (3-О-кавоїл-D-хінна) кислота	0,15 ± 0,011	20,78	218; 245; 300; 329
Неохлорогенова кислота (5-О-кавоїл-D-хінна)	0,01 ± 0,001	20,90	210; 246; 300; 330
Кавова (3,4-діоксикорична) кислота	0,03 ± 0,001	23,10	217; 234; 299
Рутин (5,7,3',4'-тетраокси-3-β-глюкопіранозил-α-L-рамнопіранозид)	0,10 ± 0,010	31,22	259; 266 пл.; 299 пл.; 300 пл.; 362
Гіперозид (3,5,3',4'-тетраокси-3-β-D-галактопіранозид)	0,11 ± 0,011	32,19	257; 269 пл.; 299 пл.; 362
Апігенін-7-О-β-D-глюкопіранозид	0,08 ± 0,007	35,10	268; 339
Кверцетин-3-глюкозид (3,5,3',4'-тетраокси-3'-О-β-D-глюкопіранозид)	0,14 ± 0,011	36,08	253; 325; 370
Кемпферол-3-О-метиловий ефір	0,18 ± 0,012	35,78	268; 351
Кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозид	0,14 ± 0,013	35,86	269; 355
Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонол)	0,18 ± 0,015	36,09	254; 268 пл.; 300 пл., 372
Лінарин (5-окси-4'-метокси-7-рутинозид)	0,72 ± 0,071	37,19	269; 325
Лютеолін-5-О-β-D-глюкопіранозид	0,12 ± 0,011	38,16	258; 262 пл.; 349
Лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид	0,20 ± 0,020	39,56	257; 268 пл.; 347
Гіспідулін-7-О-β-D-глюкопіранозид	0,18 ± 0,017	42,28	286; 338
Лютеолін (5,7,3',4'-тетраоксифлавонол)	0,36 ± 0,033	43,86	242 пл.; 253; 267; 291 пл., 349
Пектолінарин (5-окси,6,4'-диметокси-7-рутинозид)	0,03 ± 0,003	46,48	275; 330
Апігенін (5,7,4'-триоксифлавонол)	0,37 ± 0,033	52,09	267; 338
Акацетин (5,7-діокси-4'-метоксифлавонол)	0,01 ± 0,001	53,50	269; 303 пл.; 327
Кемпферол (3,5,7,4'-тетраоксифлавонол)	0,18 ± 0,017	54,00	267; 368
Сума флавоноїдів	3,10 ± 0,29	–	–
Сума гідроксикоричних кислот	0,21 ± 0,02	–	–

П р и м і т к а: $\mu = 6$.

Хімічними реакціями, ТПХ та ВЕРХ в траві *Cirsium arvense* (L.) Scop. під час цвітіння встановлено наявність 16 флавоноїдів та 5 гідроксикоричних кислот.

Одержані методом ВЕРХ дані свідчать про те, що під час цвітіння в траві *Cirsium arvense* (L.) Scop. накопичуються: лінарин (до $0,72 \pm 0,071\%$), апігенін (до $0,37 \pm 0,033\%$), лютеолін (до $0,36 \pm 0,033\%$), лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид (до $0,20 \pm 0,020\%$), кемпферол (до $0,18 \pm 0,012\%$), гіспідулін-7-О-β-D-глюкопіранозид (до $0,18 \pm 0,017\%$), кемпферол-3-О-метиловий ефір (до $0,18 \pm 0,012\%$), кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозид (до $0,14 \pm 0,013\%$), кверцетин-3-О-β-D-глюкопіранозид (до $0,14 \pm 0,011\%$), лютеолін-5-О-β-D-глюкопіранозид (до $0,12 \pm 0,011\%$), гіперозид (до $0,11 \pm 0,011\%$), рутин (до $0,10 \pm 0,010\%$), хлорогенова кислота (до $0,15 \pm 0,011\%$).

Вперше нами в траві досліджуваної рослини були ідентифіковані: гіспідулін-7-О-β-D-глюкопіранозид, кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопіранозид, лютеолін-5-О-β-D-глюкопіранозид, кафтарова, протокатехова та неохлорогенова кислоти.

Аналіз одержаних результатів свідчить про доцільність стандартизації трави *Cirsium arvense* (L.) Scop. за вмістом флавоноїдів (похідних лютеоліну) для оцінювання якості рослинної сировини під час її заготівлі.

Висновки

1. Методами хімічного аналізу, ВЕРХ і ТПХ встановлено накопичення в траві *Cirsium arvense* (L.) Scop. 16 флавоноїдів (до $3,10 \pm 0,29\%$) та 5 гідроксикоричних кислот (до $0,21 \pm 0,02\%$).

2. Вперше ідентифіковано гіспідулін-7-О-β-D-глюкопіранозид, кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопіранозид, лютеолін-5-О-β-D-глюкопіранозид, кафтарову, протокатехову та неохлорогенову кислоти.

3. Запропоновано методику для стандартизації трави *Cirsium arvense* (L.) Scop. за вмістом флавоноїдів – похідних лютеоліну.

Список використаної літератури

1. Кьосев П. А. Лекарственные растения: самый полный справочник. – М.: Эксмо-Пресс, 2011. – 939 с.
2. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту / Державна фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. центр». 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – С. 187–221.
3. Zia Ul., Haq K., Shafullah K. et al. In vitro antimicrobial activity of the Chemical Constituents of *Cirsium arvense* (L.) Scop. // J. Med. Plant Res. – 2013. – V. 7, N 25. – P. 1894–1898.
4. Nazaruk J. D., Wajs-Bonikowska A., Bonikowski R. Components and antioxidant activity of fruits of *Cirsium palustre* and *Cirsium rivulare* // Chemistry of Natural Compounds. – 2012. – V. 48, N 1. – P. 9–10.
5. Yauhua L., Ei S., Xiahua L. et al. Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of *Cirsium setosum* by LC // Chromatographia – 2009. – V. 70, N 1–2. – P. 125–130.
6. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). – СПб., 1995. – 992 с.
7. Чекман І. С. Флавоноїди – клініко-фармакологічний аспект // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 2. – С. 85–87.
8. Державна фармакопея України. Доп. 3, 1-е вид. – Харків: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2009. – 279 с.
9. Доброчаева Д. Н. и др. Определитель высших растений Украины / Под ред. Ю. Н. Прокудина. – К.: Наук. думка, 1987. – 548 с.
10. Gordon E. D. Tiley. Biological Flora of the British Isles: *Cirsium arvense* (L.) Scop. // J. Ecol. – 2010. – V. 98, N 4. – P. 938–983.

Надійшла до редакції 8 лютого 2016 року.

Я. В. Попова¹, А. В. Мазулін¹, Г. В. Мазулін¹, Т. В. Опрошанская²

¹ Запорожский государственный медицинский университет

² Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ТРАВЫ *CIRSIMUM ARVENSE* (L.) SCOP. ФЛОРЫ УКРАИНЫ

Ключевые слова: бодяк полевої, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, тонкослойная хроматографія, високоєфективна жидкостная хроматографія

АННОТАЦІЯ

Види роду *Cirsium* L. (бодяк) в мировій флорі налічують до 300 багаторічних трав'янистих рослин. Вони широко розповсюджені як звичайні представники біоценозів і сорняки на території

стран Европы, Северной Африки, Северной и Центральной Америки. На Украине в настоящее время идентифицировано свыше 30 представителей.

В народной медицине многих стран широкое применение находят эффективные лекарственные средства противовоспалительного, антиоксидантного и гепатопротекторного действия из надземной части бодяка полевого (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). Их выраженная фармакологическая активность связана с накоплением в этом растении биологически активных флавоноидов и отдельных гидроксикоричных кислот.

Учитывая неограниченную сырьевую базу, перспективным является изучение фитохимического состава растений с целью создания высокоэффективных лекарственных средств на их основе.

Целью этой работы было изучение состава и количественного содержания полифенольных соединений в траве *Cirsium arvense* (L.) Scop. флоры Украины в период цветения.

Определение осуществляли характерными химическими реакциями, тонкослойной хроматографией на пластинках Aluminium oxide 150 F 254 (0,20 мм) (Merck, Германия). Уточнение компонентного состава флавоноидов, гидроксикоричных кислот и определение их количественного содержания выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с УФ-детектором (Япония). Хроматографическая колонка Phenomenex Luna C18(2) ($l = 250$ мм, $d = 4,6$ мм), заполненная сорбентом ($d = 5$ мкм). Идентификацию компонентов проводили по времени удерживания и соответствию УФ-спектров стандартным образцам.

Установлено накопление 16 флавоноидов (до $3,10 \pm 0,29\%$) и 5 гидроксикоричных кислот (до $0,21 \pm 0,02\%$).

Впервые идентифицированы гиспидулин-7-О-β-D-глюко-пиранозид, кемпферол-3-О-β-D-глюкопиранозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, лютеолин-5-О-β-D-глюкопиранозид, каftarо-вая, протокатехова и неохлорогеновая кислоты.

Предложен метод стандартизации травы *Cirsium arvense* (L.) Scop. по содержанию флавоноидов – производных лютеолина. Травя *Cirsium arvense* (L.) Scop. перспективна для получения лекарственных средств с выраженной противовоспалительной, антиоксидантной и гепатопротекторной активностью.

Y. V. Popova¹, O. V. Mazulin¹, G. V. Mazulin¹, T. V. Oproshanska²

¹Zaporizhzhia State Medical University

²National University of Pharmacy, Kharkiv

THE PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF POLYPHENOLIC COMPOSITION OF HERBS *CIRSIMUM ARVENSE* (L.) SCOP. OF UKRAINE FLORA

Key words: *Cirsium arvense* (L.) Scop., flavonoids, hydroxycinnamic acids, thin layer chromatography, high-performance chromatography

А Б С Т Р А К Т

There are about 300 perennial herbaceous plants in the flora of the world which refers to species of the genus *Cirsium* L. (thistle). They are widely distributed as ordinary representatives of biocenoses and weeds, in the countries of Europe, North Africa, North and Central America. In Ukraine, currently, was identified more than 30 representatives. Many countries in folk medicine widely use effective drugs with anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective action of the above-ground parts of creeping thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). Their expressive pharmacological activity is associated with the accumulation in it of biologically active flavonoids and selected hydroxycinnamic acids. Considering the unlimited source of raw materials, it is a promising study of phytochemical composition of plants to create highly effective medicines based on them.

The aim of the work was to study the composition and quantitative content of polyphenolic compounds the *Cirsium arvense* (L.) Scop. grass of Ukrainian flora in flowering period. A detection was conducted by typical chemical reactions and thin layer chromatography on Aluminium oxide 150 F 254 (0.20 mm) (Merck, Germany) plates. A clarification of the component composition of flavonoids, hydroxycinnamic acids and their quantitative contents was conducted by HPLC chromatograph Shimadzu LC-20 Prominence, the Japan. The chromatographic column Phenomenex Luna C18(2) ($l = 250$ мм, $d = 4,6$ мм), was filled with sorbent ($d = 5$ мкм).

It was established 16 flavonoids (up to $3,10 \pm 0,29\%$) and 5 hydroxycinnamic acids ($0,21 \pm 0,02\%$). Gispidulin-7-О-β-D-glucopyranoside, kampherol-3-О-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-О-β-D-glucopyranoside, lutelin-5-О-β-D-glucopiranoside, caftaric, protocatechuic and neochlorogenic acids were identified firstly. The method of *Cirsium arvense* (L.) Scop. grass standardization by content of the main flavonoid luteolin derivatives was proposed. The *Cirsium arvense* (L.) Scop. grass can be discovered to finding drugs with a pronounced anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective activity.

Електронна адреса для листування з авторами: yana.popova.zsmu@gmail.com