

УДК 615.322:582.683.2:547.814.5.6:543.51'544.5

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АГЛИКОНОВ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ И ЦВЕТКАХ СУРЕПКИ ДУГОВИДНОЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ/МС

Гаврилин М. В., Антюшин А. В., Орловская Т. В.

Пятигорский филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, Россия (353532, Ставропольский край, Пятигорск, Калинина, 11), e-mail: farmnauka@mail.ru

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием проведено изучение качественного состава агликонов цветков и листьев потенциально лекарственного растения сурепки обыкновенной (*Barbarea arcuata* Reichenb.). Для идентификации агликонов образцы сырья подвергали экстракции спиртом этиловым в сильно кислой среде, сочетая гидролиз гликозидов и экстракцию. Для обеспечения полноты гидролиза процесс проводили в течение часа при кипении смеси. Для идентификации агликонов, после соответствующей пробоподготовки извлечение анализировали методом ВЭЖХ/МС. Способ ионизации – электроспрей. Установлено, что и цветки, и листья содержат в качестве агликонов – кверцетин, кемпферол, изорамнетин и минорные количества лютеолина. Проведенные исследования впервые позволили достоверно идентифицировать агликоны флавоноидов цветков и листьев *Barbarea arcuata*, произрастающей в районе Кавказских Минеральных Вод. При этом установлено, что преобладающим агликоном листьев является кемпферол, а цветков – кверцетин. Полученные результаты позволяют считать надземную часть *Barbarea arcuata* перспективным лекарственным растением, способным оказывать диуретическое и нефропротекторное действие.

Ключевые слова: сурепка дуговидная, флавоноиды, масс-спектрометрия.

## IDENTIFICATION AGLYCONE FLAVONOIDS IN LEAVES AND FLOWERS BARBAREA ARCUATA BY HPLC / MS

Gavrilin M. V., Antyushin A. V., Orlovskaya T. V.

Pyatigorsk branch GBOU VPO «Volgograd State Medical University», Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia (353532, Stavropol, Pyatigorsk, Kalinina, 11), e-mail: farmnauka@mail.ru

By high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection studied the quality of the flowers and leaves of the aglycones potentially medicinal plant bittercress ordinary (*Barbarea arcuata* Reichenb.). To identify the aglycones samples of raw materials were extracted with ethyl alcohol in a highly acidic environment, combining the hydrolysis of glycosides and extraction. To ensure a complete hydrolysis process was carried out for one hour at boiling mixture. To identify the aglycones, after appropriate sample preparation method of extracting analiztrovali HPLC/MS. The method of ionization – electrospray. Established, that the flowers and leaves contain as aglycones – quercetin, kaempferol, isoramnethin, and minor amounts of luteolin. The research for the first time allowed the positive identification of flavonoid aglycones of flowers and leaves *Barbarea arcuata*, growing in the region of Caucasian Mineral Waters. It was found that the leaf is the predominant aglycone kaempferol, quercetin and flowers. These results suggest the aerial parts *Barbarea arcuata* promising medicinal plant that can have a diuretic effect and nephroprotective.

Key words: *Barbarea arcuata* Reichenb., flavonoids, mass spectrometry.

### Введение

Химический состав растений рода *Barbarea* R. Br. разнообразен, но к настоящему времени изучен недостаточно. Растения данного рода накапливают тритерпеновые сапонины, глюкозинолаты [9, 10], тиогликозиды [2] и флавоноиды [7]. В надземной части растения присутствует значительное количество дериватов феруловой и изоферуловой кислот, а также кофейной кислоты, характерных и для других растений семейства Brassicaceae [8].

Среди перечисленного разнообразия классов природных соединений особо следует выделить группу флавоноидов. В работе [6] указывается на то, что для всех видов сем.

Brassicaceae характерно накопление гликозидов кемпферола, кверцетина, лютеолина и апигенина, при этом род *Barbarea R. Br.* является среди всего семейства одним из исключений, так как одновременно накапливает гликозиды и флавонов, и флавонолов, в то время как для большинства родов данного семейства характерно накопление флавонолов [1, 4].

В связи с тем, что надземная часть данного растения накапливает значительный комплекс биологически активных соединений, следует предположить и наличие существенной фармакологической активности, основанием для этого могут служить работы [3, 5], при этом особый интерес может представлять нефропротекторное действие биологически активных веществ.

Объектом исследования являлась надземная часть двулетнего травянистого растения сурепки дуговидной (с. обыкновенной) – *Barbarea arcuata Reichenb. (B. vulgaris auct.)* сем. капустных (*Brassicaceae*), заготовленная в районе Кавказских Минеральных Вод (Ставропольский край) в период цветения (2010–2012 гг.).

Данный вид из рода Сурепка является наиболее распространенным в дикорастущей флоре и введен в культуру, т.к. имеет сельскохозяйственное значение, что и предопределяет его достаточную ресурсную базу.

В связи со сложностью химического состава данного растения на первом этапе исследований проводили изучение спектра агликонов флавоноидов.

### **Экспериментальная часть**

Для проведения исследования точную навеску сырья (около 1 г) помещали в колбу с обратным холодильником и экстрагировали при умеренном кипении 50 мл смеси спирта этилового 95 % и кислоты хлороводородной, разведенной 7:3 в течение 1 часа. При этом происходит экстракция и гидролиз всех флавоноидов, находящихся в гликозилированной форме, затем извлечение декантировали в мерную колбу вместимостью 50 мл, охлаждали и доводили спиртом этиловым до метки. После перемешивания 2 мл извлечения осторожно упаривали в токе воздуха и растворяли в 2 мл диметилформамида, полученный раствор после центрифугирования использовался для ВЭЖХ анализа.

В работе использовали систему для ВЭЖХ UltiMate 3000 (Dionex), сопряженную с МС детектором AmaZon SL (Bruker), ионизация – электрораспылением. Хроматографирование вели в градиенте от 5 до 60 % ацетонитрила за 40 минут, при скорости потока 0,3 мл/мин, в качестве второго компонента подвижной фазы использовали раствор кислоты муравьиной в воде (2 г/л), для разделения использовали колонку 150×4,6 мм, заполненную обращеннофазным сорбентом с привитыми октадецильными остатками.

### **Результаты и обсуждение**

При этом установлено, что на хроматограмме извлечения из цветков и листьев, полученных с применением детектирования при 360 нм, отмечаются 3 основных пика, которые могут быть отнесены к агликонам флавоноидов, и ряд минорных пиков (рис. 1–2).

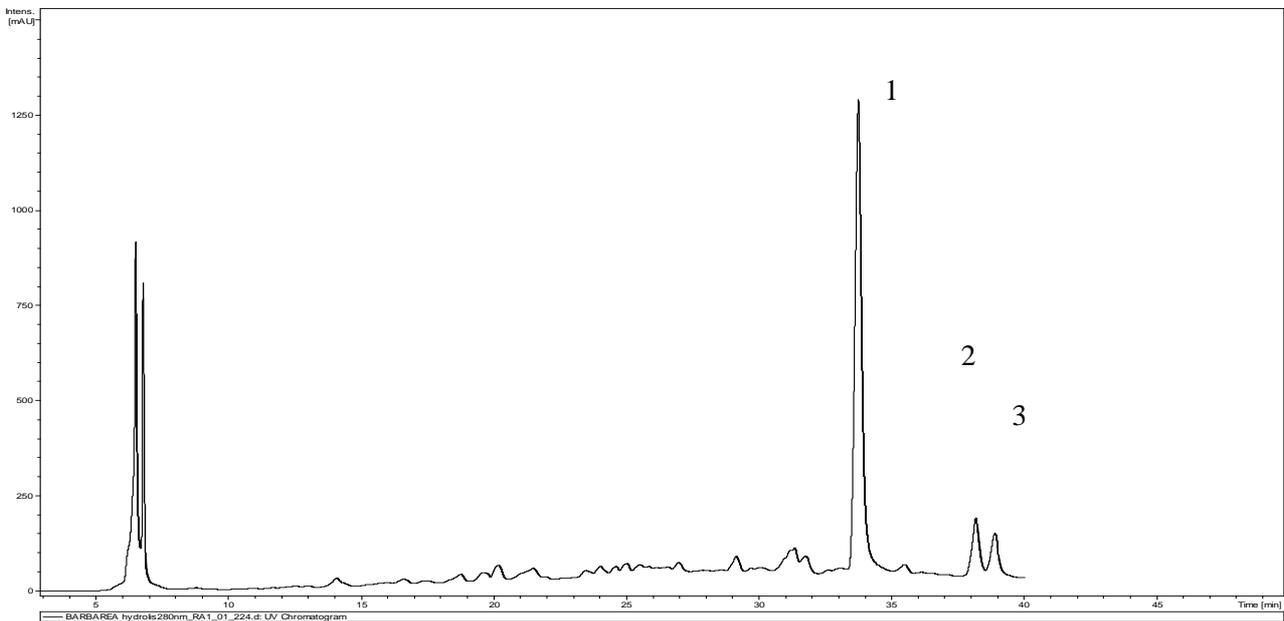


Рис. 1. Хроматограмма суммы биологически активных веществ цветков *Barbarea arcuata* после кислотного гидролиза, пик 1 – кверцетин, пик 2 – кемпферол, пик 3 – изорамнетин

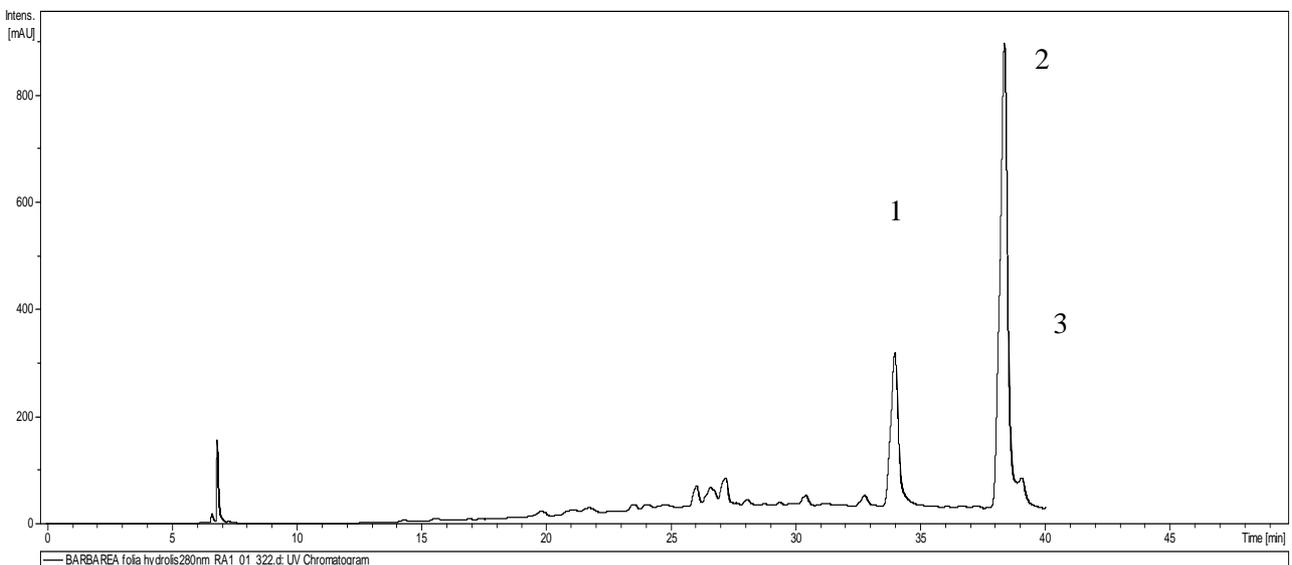


Рис 2. Хроматограмма суммы биологически активных веществ листьев *Barbarea arcuata* после кислотного гидролиза, пик 1 – кверцетин, пик 2 – кемпферол, пик 3 – изорамнетин

Анализ масс-спектров основных пиков показал наличие ионов с массами ( $m/z^+$ ) 303,2<sup>+</sup>; 317,1<sup>+</sup>; 287,2<sup>+</sup>. При этом основному пику на хроматограмме извлечения из цветков соответствует величина  $m/z^+$  равная 303,2, что соответствует флавоноиду с молекулярной массой 302,1. Полученные результаты и анализ литературных данных позволяет

предположить наличие в цветках кверцетина в качестве основного агликона, а также изорамнетина (рис. 3, 4).

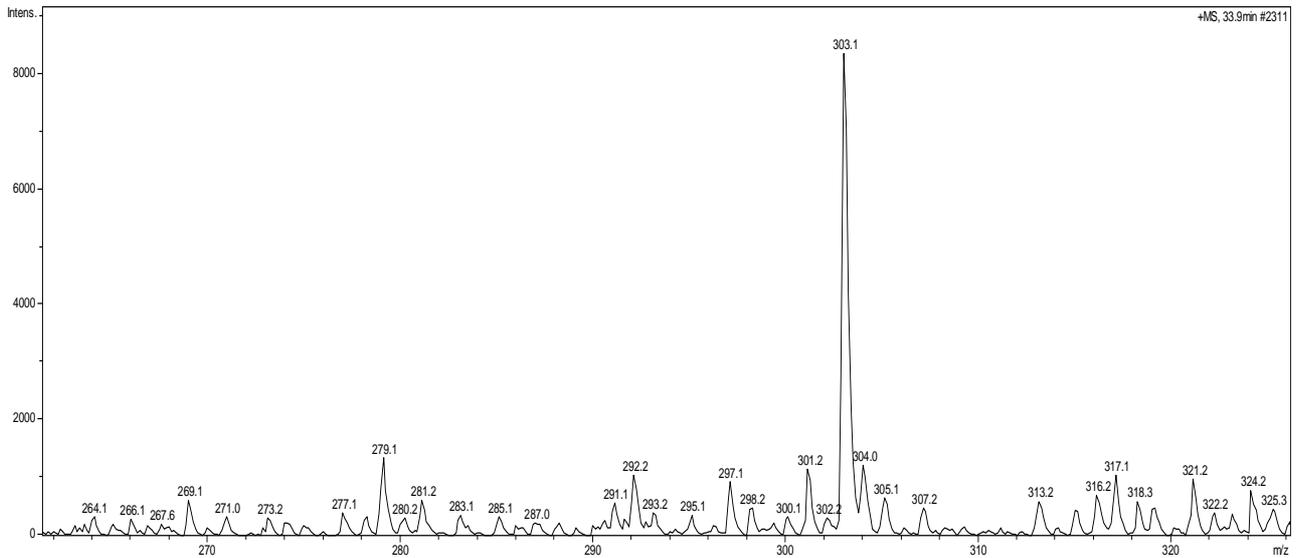
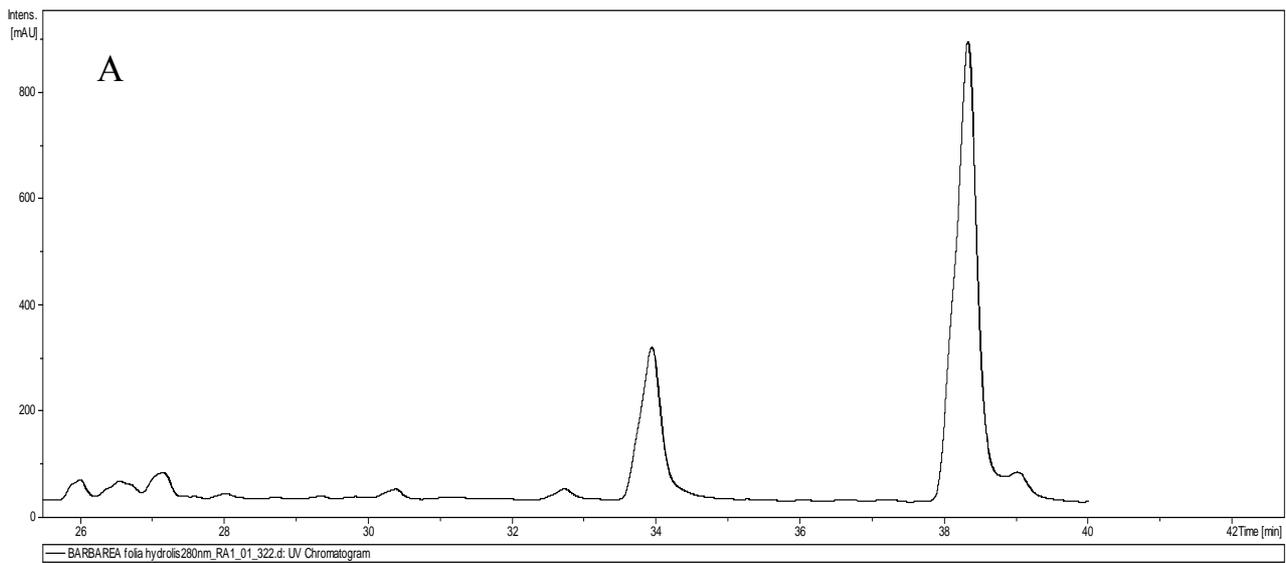


Рис. 3. Фрагмент хроматограммы извлечения из листьев *Barbarea arcuata* с  
и масс-спектром кверцетина ( $m/z^+$  - 303,1)



Б

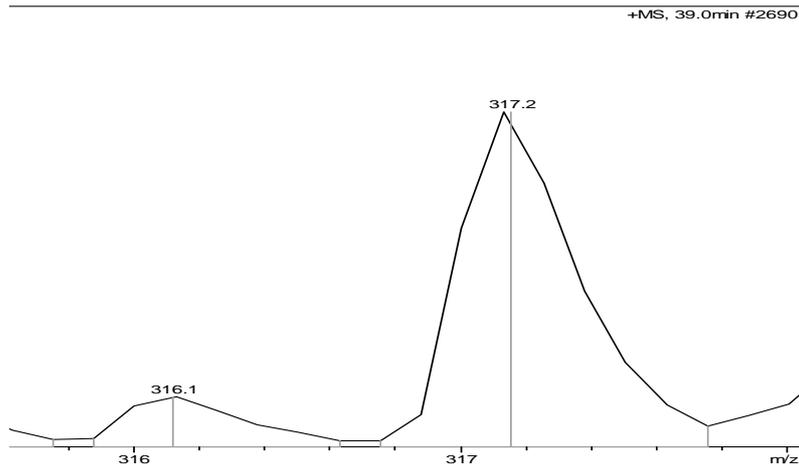
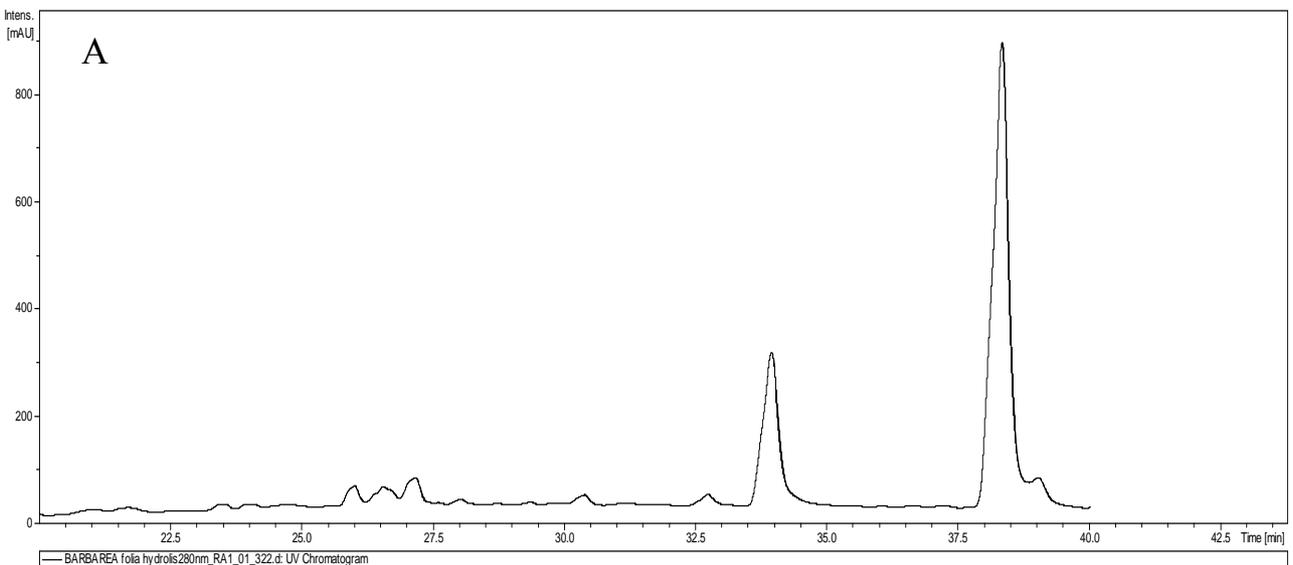


Рис. 4. Фрагмент хроматограммы извлечения из листьев *Barbarea arcuata* с пиком (А) и масс-спектром (Б) изорамнетина ( $m/z^+ - 317,1$ )

Сигнал с массовым числом  $278,2^+$  может быть характерен как для кемпферола, так и для лютеолина. В литературе имеются сведения о возможности наличия в данном сырье гликозидов лютеолина [6]. Анализ хроматограмм растворов стандартных образцов, полученных в аналогичных условиях, позволил отнести пик с временем удерживания около 38 минут к кемпферолу (рис. 5). В то же время на хроматограмме имеется минорный пик с временем удерживания около 26 минут, которому соответствует массовое число  $278,2^+$ , что может свидетельствовать о наличии лишь следовых количеств лютеолина.



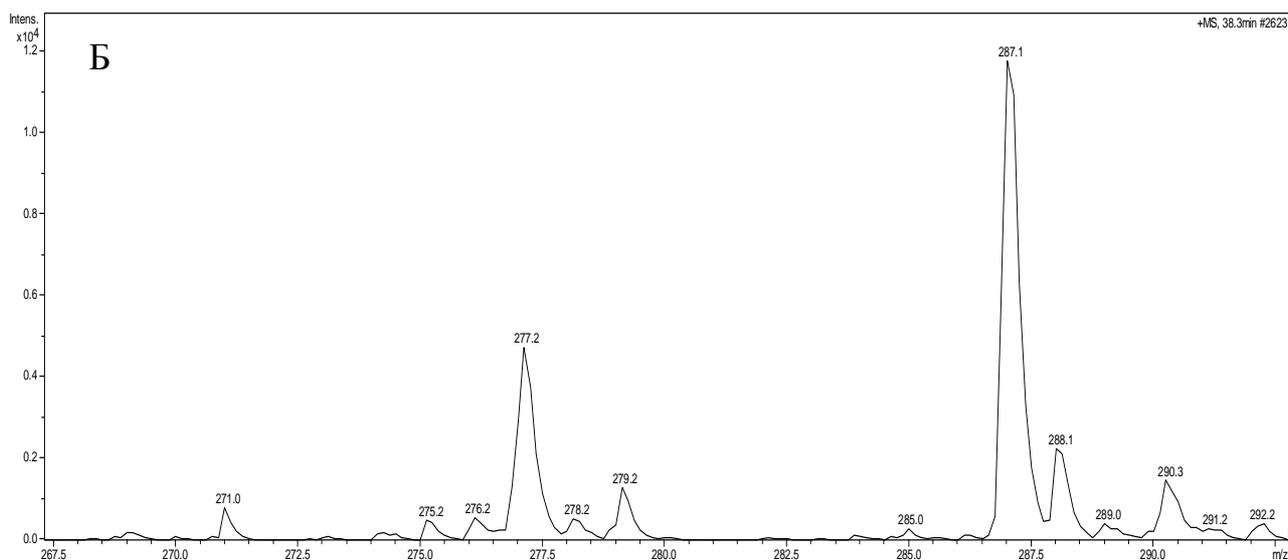


Рис. 5. Фрагмент хроматограммы извлечения из листьев *Barbarea arcuata* с пиком (А) и масс-спектром (Б) кемпферола ( $m/z^+$  - 287,1)

Таким образом, проведенные исследования позволили подтвердить присутствие в цветках кверцетина, кемпферола и изорамненина, при этом основным агликоном является кверцетин.

Следующим этапом исследования стало изучение качественного состава агликонов листьев. При этом установлено, что в листьях сурепки дуговидной накапливаются те же агликоны флавоноидов, но преобладающим соединением является кемпферол, при этом изорамнетин находится в минорных количествах. Следует отметить, что в листьях также присутствует лютеолин, но его содержание заметно больше чем в цветках и находится на уровне изорамненина.

Таким образом, проведенные исследования впервые позволили достоверно идентифицировать агликоны флавоноидов цветков и листьев *Barbarea arcuata*, произрастающей в районе Кавказских Минеральных Вод. При этом интересным является тот факт, что преобладающим агликоном листьев является кемпферол, а цветков – кверцетин.

Полученные результаты позволяют считать наземную часть *Barbarea arcuata* перспективным лекарственным растением, способным оказывать диуретическое и нефропротекторное действие.

### Список литературы

1. Гаврилин М. В., Съедин А. В. Количественное определение флавоноидов в наземной части рапса обыкновенного // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2010. – Вып. 65. – С. 298-300.

2. Изучение химического состава некоторых пищевых растений, культивируемых в Ставропольском крае / Челомбитько В. А. [и др.]. // Вопросы биол., мед. и фармац. химии. – 2012. – № 4. – С. 44-47.
3. Нефропротекторное действие растений семейства капустные / Терехов А. Ю. [и др.] // Фармация. – 2010. – № 1. – С. 46-49.
4. Орловская Т. В., Челомбитько В. А. Изучение фенольного комплекса *Lepidium sativum* // Химия природ. соединений. – 2007. – № 3. – С. 255-256.
5. Орловская Т. В., Гаврилин М. В., Челомбитько В. А. Новый взгляд на пищевые растения, как перспективные источники лекарственных средств. – Пятигорск: РИА «КМВ», 2011. – 240 с.
6. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2 Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae / отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – С. 95-130.
7. Сенченко С. П., Печенова А. В. ВЭЖХ и капиллярный электрофорез в анализе производных кемпферола в представителях семейства капустные // Фармация. – 2010. – № 1. – С. 5-8.
8. Agerbirk N., Olsen C. E. Isoferuloyl derivatives of five seed glucosinolates in the crucifer genus *Barbarea* // Phytochemistry. – 2011. – Vol. 72. – P. 610-623.
9. Agerbirk N., Orgaard M., Nielsen J. K. Glucosinolates, flea beetle resistance, and leaf pubescence as taxonomic characters in the genus *Barbarea* (Brassicaceae) // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 63. – P. 69-80.
10. *Barbarea vulgaris* linkage map and quantitative trait loci for saponins, glucosinolates, hairiness and resistance to the herbivore *Phyllotreta nemorum* / Kuzina V., Nielsen J. K., Augustin J. M., Torp A. M., Bak S., Andersen S. B // Phytochemistry. – 2011. – Vol. 72, № 2-3. – P.188-198.

**Рецензенты:**

Лазарян Джон Седракович, д.ф.н., профессор, зав. кафедрой токсикологической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Вергейчик Евгений Николаевич, д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.