

© Коллектив авторов, 2013

УДК: 618.3-06:616.45-008.1-053.1]-07

ОБНАРУЖЕНИЕ, АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭКДИСТЕРОИДОВ ТРАВЫ МЯГКОВОЛОСНИКА ВОДНОГО И ВОЛДЫРНИКА ЯПОНСКОГО

С.В. Дармограй, Н.С. Фурса, Н.С. Ерофеева

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

Ярославская государственная медицинская академия, г. Ярославль

При хроматографировании спиртовых извлечений травы мягковолосника водного и волдырника японского ТСХ выявлен разнообразный набор экдистероидов, доминирующие компоненты которых идентифицированы с экдистероном и полиподином В при сравнении с заведомо известными образцами и ВЭЖХ.

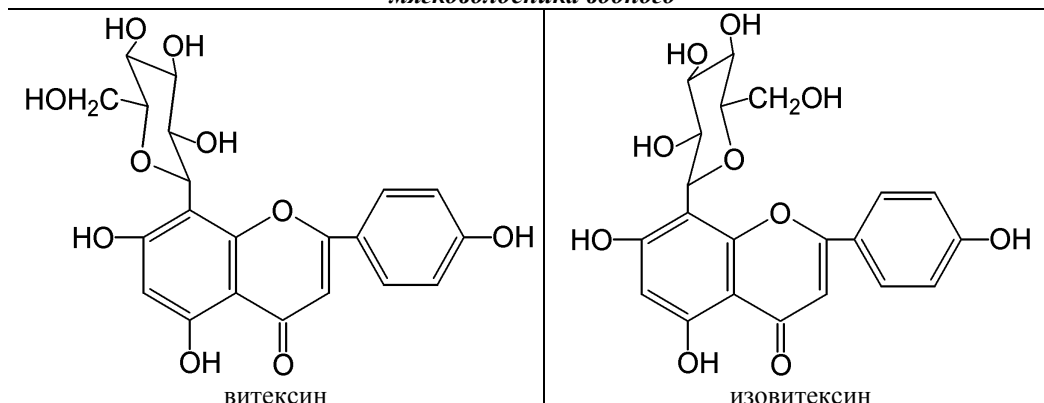
Ключевые слова: мягковолосник водный, волдырник японский, экдистероиды.

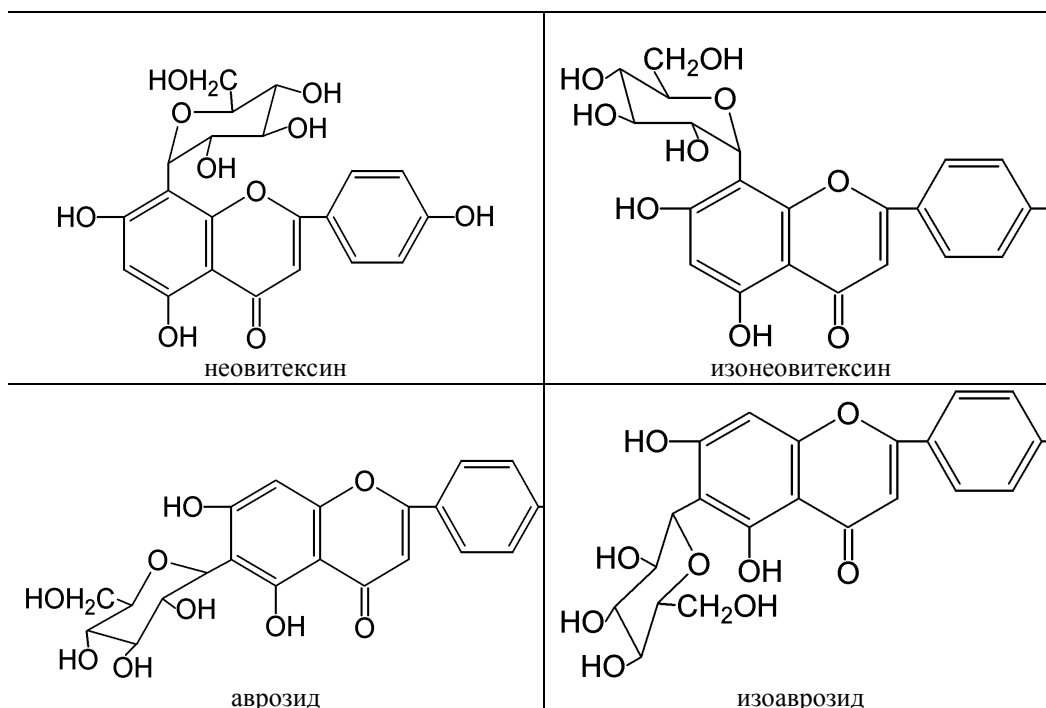
Объектами углубленных исследований в последние годы являются трава мягковолосника водного (*Myosoton aquaticum* (L.) Moench) и волдырника ягодного (*Cucubalus baccifer* L.) [1-4, 8-13, 15]. По жизненной форме они являются многолетними травянистыми растениями, произрастающими в Европейской части РФ, на Кавказе, в Западной Сибири, на Дальнем Востоке [6, 7]. В химическом отношении трава волдырника изучена

в большей мере, чем мягковолосника. В обоих растениях содержатся сапонины, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды. Так, в траве волдырника обнаружены моногидрат 3-гидрокси-5,7,4'-триметоксифлавона и 5,7,4'-тригидроксифлавоон [13, 15], а мягковолосника – разнообразные гликофлавоноиды апигенина, являющиеся ротационными изомерами, некоторые из них приведены в таблице 1 [6].

Таблица 1

**Структурные формулы ротационных изомеров С-моноголикозидов апигенина травы
мягковолосника водного**





В траве волдырника выявлены многие природные соединения, в частности 4-гидроксibenзойная кислота и 4-гидроксibenзальдегид [13], азотсодержащие соединения (кукубалактам, 6-метоксипиперидин-2-он, птеролактан, 4-гидроксibenзопропаниловая кислота) [11, 15], производные кукубалугенина А [8], разнообразный набор сескитерпеноидов, представленных, кукубалолом, кукубадиолом, кукубалдиолом, кукубалактоном, друммондолом и его 11-O-β-D-глюкопиранозидом, 5,7(E)-мегастигмадиен-3β, 4α, 9ε-триолом [10, 12]. Из природных соединений, характерных для гвоздичных, содержатся экистероиды (экистерон, 24(28)-экистерон, 22-дезоксизэкистерон, 25-гидроксипанустерон, рубростерон, 3-β-O-β-D-глюкопиранозид 2,22-дидезоксиэкистерона) [9].

В последние годы в траве обоих растений нами идентифицировано до 20 аминокислот, обнаружены свободные и связанные сахара, определено более 60 различных макро-, микро- и ультрамикроэлементов [3, 4].

Из приведенных данных видно, что химический состав мягковолосника вод-

ного недостаточно изучен, хотя его сырьевые ресурсы значительные. Он представляет собой многолетнее травянистое растение, высотой 20-70 см, в верхней части железисто-опушенное, в нижней – голое. Его стебель приподнимающийся, простой или чаще на верху ветвистый. Листья яйцевидные, 3-6 см длиной и 1-4 см шириной, верхние – сидячие, нижние – на коротких черешках. Соцветия – раскидистый полусонтик, прицветники зелёные, листовидные; цветоножки 1-2, 5 см длиной, лепестки белые в 1,5-2 раза длиннее чашечки, коробочки немного длиннее чашечки. Семена тёмно-коричневые, округло-почковидные, плоские. Цветёт в июне-ноябре [7].

Следует отметить, что виды семейства гвоздичных в настоящее время вызывают пристальный интерес как источники экистероидов, обладающих разнообразными фармакологическими свойствами [3-5]. Вместе с тем неоднозначно трактуется их обнаружение. Так, наличие этих соединений в недалеком прошлом отрицалось в траве мягковолосника водного [5]. Положительное решение этого вопро-

са позволит не только обозначить более определенно его положение в семействе гвоздичные. Оно имеет несомненную практическую значимость, заключающуюся в возможном более осмысленном применении этого растения в медицине.

Подобная ситуация сложилась и для видов волдырника. Не так давно наличие в них экистероидов тоже ставилось под сомнение [5, 14]. Вместе с тем еще в 1987 году сообщалось о выделении из травы волдырника ягодного экистерона, полиподина В, о наличии других минорных экистероидов [1]. В дальнейшем упомянутые данные не только были подтверждены, но и указывалось на выделение ряда новых природных соединений [8-13, 15]. Кроме того, в 2009 году мы сообщили о наличии экистероидов в траве волдырника японского (*Cucubalus japonicus* L.). Наряду с этим не предпринималось сравнительное исследование экистероидов мягковолосника водного, волдырника японского и в. ягодного. Тем более не приводились убедительные данные об обнаружении этих соединений.

Цель исследования: провести обнаружение, анализ качественного состава и идентификацию отдельных экистероидов травы мягковолосника водного и волдырника японского.

Материалы и методы

Надземную часть мягковолосника водного собрали в окрестностях г. Рязани в июне 2009 года, волдырника японского – на Дальнем Востоке.

Хроматографическое изучение спиртовых извлечений из них провели ТСХ на пластинках «Silufol UV 254» в системах хлороформ : спирт (1:2), (1:3), (1:5) и н-бутанол : кислота уксусная : вода (4:1:5, верхний слой), с последующей обработкой хроматограмм 1% кислотой ванилин-серной. В качестве достоверных образцов служили экистерон, и полипидин В, выделенные из смолёвки татарской.

Подготовку проб для анализа проводили следующим образом. Навеску сырья 2-3 г заливали 30 мл 96 % спирта этилового, настаивали при комнатной температуре в течение суток, извлечение

сливали, а сырьё повторно извлекали подобным образом ещё раз. Объединённые извлечения упаривали досуха, остаток обрабатывали 20 мл воды очищенной, фильтровали, фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в 20 мл 96 % спирта этилового, добавляли 10 г алюминия оксида. Этот порошок наносили на колонку с алюминия оксида (30 г) и вещества с колонки элюировали 70 % спиртом этиловым. Элюат использовали для хроматографирования.

После обработки хроматограмм 1 % раствором ванилина в кислоте серной, экистероиды проявлялись при дневном свете в виде бурых с зеленоватым оттенком пятен; в УФ-свете они флуоресцировали голубым с различными оттенками цветом. Такими же цветами флуоресцируют и различные фенолкарбоновые кислоты, что затрудняет детектирование экистероидов. Однако при выдерживании хроматограмм в течение 2-3 суток фенолкарбоновые кислоты практически обесцвечивались, а экистероиды (экистерон, полипидин В и др.) приобретали светло-лиловую окраску в УФ-свете. Изложенное позволяет объяснить, почему во многих случаях из-за трудности обнаружения их наличие в отдельных видах отрицалось, хотя они в них содержались.

При проведении исследований использовали так же жидкостный хроматограф Surveyor MSQ фирмы Thermo Finnigan (США). Условия хроматографирования: колонка Waters Xterra MS C18. 3,5 μ m 2,1x30 mm; навеска образца 0,5-1 мг, растворитель для образца 50 % ДМСО, 50 % ацетонитрила; подвижная фаза: А – 0,01 % раствор кислоты муравьиной, В – ацетонитрил. Температура колонки 25 °С. Скорость подвижной фазы – 1,5 мл в минуту. Время анализа – 4,5 мин.

Градиент.

Время, мин.	А %	В %
0,0	100	0
0,1	100	0
2,1	5	95
2,5	5	95
2,6	100	0
4	100	0

Детектирование осуществлялось с использованием диодной матрицы (PDA) «Agilent» в диапазоне длин волн 190-800 нм; масс-спектрального детектора – метод ионизации – АРСІ (химическая ионизация при атмосферном давлении, регистрация положительных и отрицательных ионов); детектора по светорассеиванию (ELSP).

Для детализации некоторых вопросов использовали также жидкостный хроматограф Waters Acquity UPLC (США) с обращено-фазовой колонкой ВЕН С18 1,7

um 2,1x50 mm; УФ-детектором (Photodiode Array Extended Lambda Detectors). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,03 % ТФУ с использованием программы градиента; длина волны: 242 нм.

Результаты и их обсуждение

Качественное обнаружение экидистероидов в траве мягковолосника водного, волдырника японского и в. ягодного провели с использованием ТСХ. Результаты исследований отражены на рисунках 1-4.

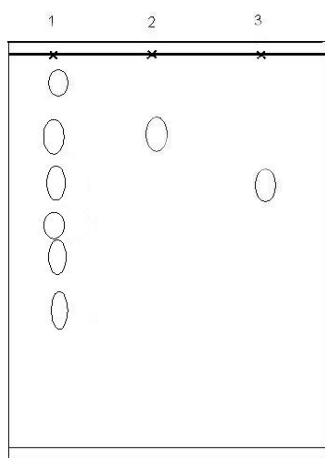


Рис.1. Схема хроматограммы спиртового извлечения травы мягковолосника водного. Система растворителей: хлороформ: спирт (3:1).

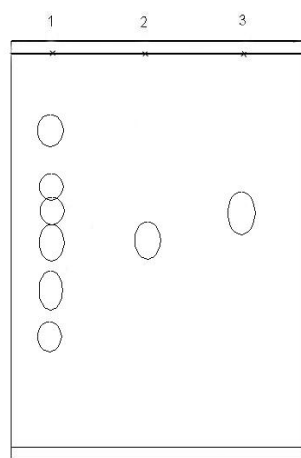


Рис. 2. То же. Система растворителей: н-бутанол: кислота уксусная : вода (4:1:5; верхний слой).

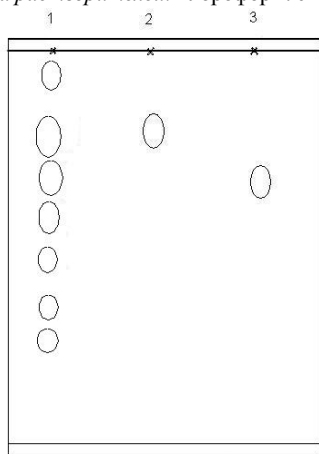


Рис. 3. Схема хроматограммы спиртового извлечения травы волдырника японского. Система растворителей: хлороформ: спирт (3:1)

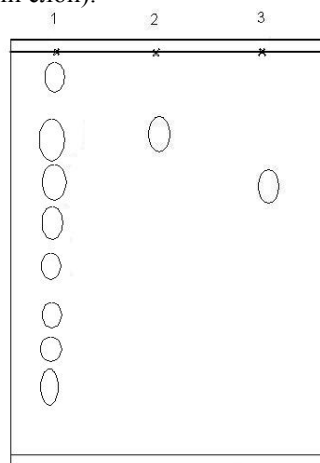


Рис. 4. Схема хроматограммы спиртового извлечения травы волдырника ягодного. Система растворителей: хлороформ : спирт (3:1)

Примечание: 1 – анализируемый экстракт, 2 – экидистерон, 3 – полипидин В.

Из приведенных выше схем хроматограмм следует, что в траве каждого из анализируемых растений содержалось не менее 7-8 соединений экидистероидной структуры, с преобладанием экидистерона

и полиподина В, которые удалось детектировать визуально,

Дальнейшее изучение экидистероидов объектов исследования проводили с использованием ВЭЖХ-МС. Результаты представлены на рисунках 5-9.

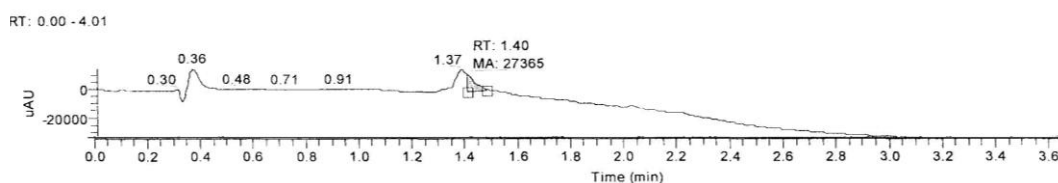


Рис. 5. Хроматограмма спиртового извлечения Мягковолосника водного

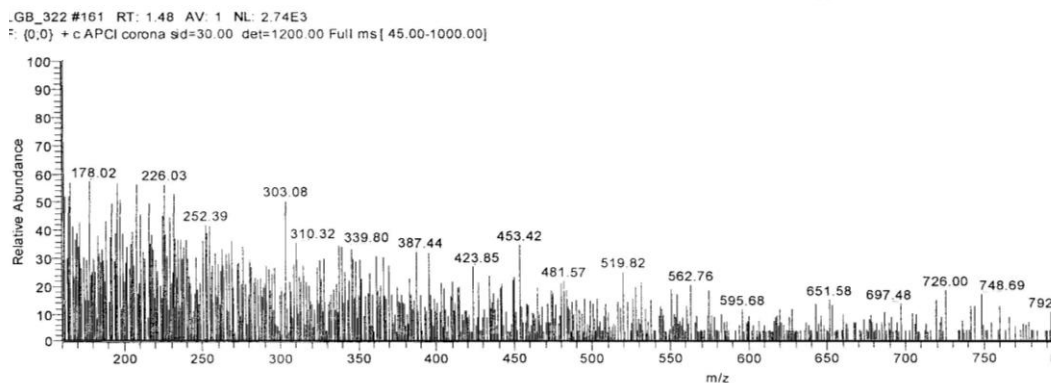


Рис. 6. Масс-спектр пика на хроматограмме со временем удерживания 1,48 мин.

Из анализа качественного состава экидистероидов следует, что оба вида содержали по несколько экидистероидных соединений, идентификацию мажорных компонентов которых проводили с помощью хроматографии в тонком слое в сравнении с эталонными экидистероидами, полученными в нашей лаборатории, а также в лаборатории гликозидов Института химии растительных веществ (г. Ташкент). Вместе с тем (рис. 5) видно, что добиться чёткого разделения пиков экидистероидных соединений не удалось, так как несколько веществ представлены одним растянутым неровным пиком. В масс-спектре (рис. 6) присутствовал молекулярный ион экидестерона

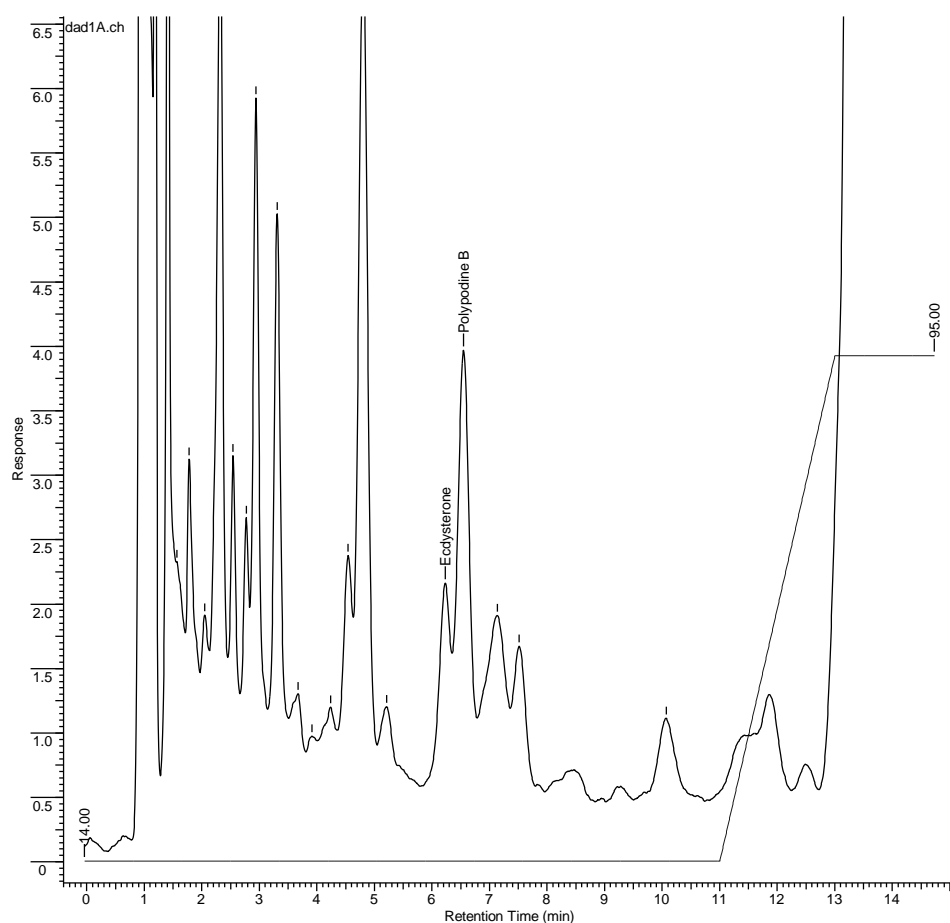
481,57 m/z. Кроме того, наличие пиков с m/z 445,05; 303,08; 226,03 позволило предположить, что эти пики принадлежали продуктам распада экидестерона, полиподина В, интегристерона А, экидизона и др., а пики с m/z 519,82; 562, 76; 595,68; 651,58; 726,00; 813,70 дали основание полагать, что они соответствуют гликозилированным или этерифицированным формам экидестероидов.

В другом случае, идентификация мажорных экидестероидов нами принята с помощью ВЭЖХ при сопоставлении с временем удерживания эталонных веществ – экидестерона и полиподина В (рис. 7-9).

SAMPLE 2 *Myosoton aquaticum*.

Навеска травы 1.0528 г. Влажность 3.335 %. Объем элюата 20 мл.

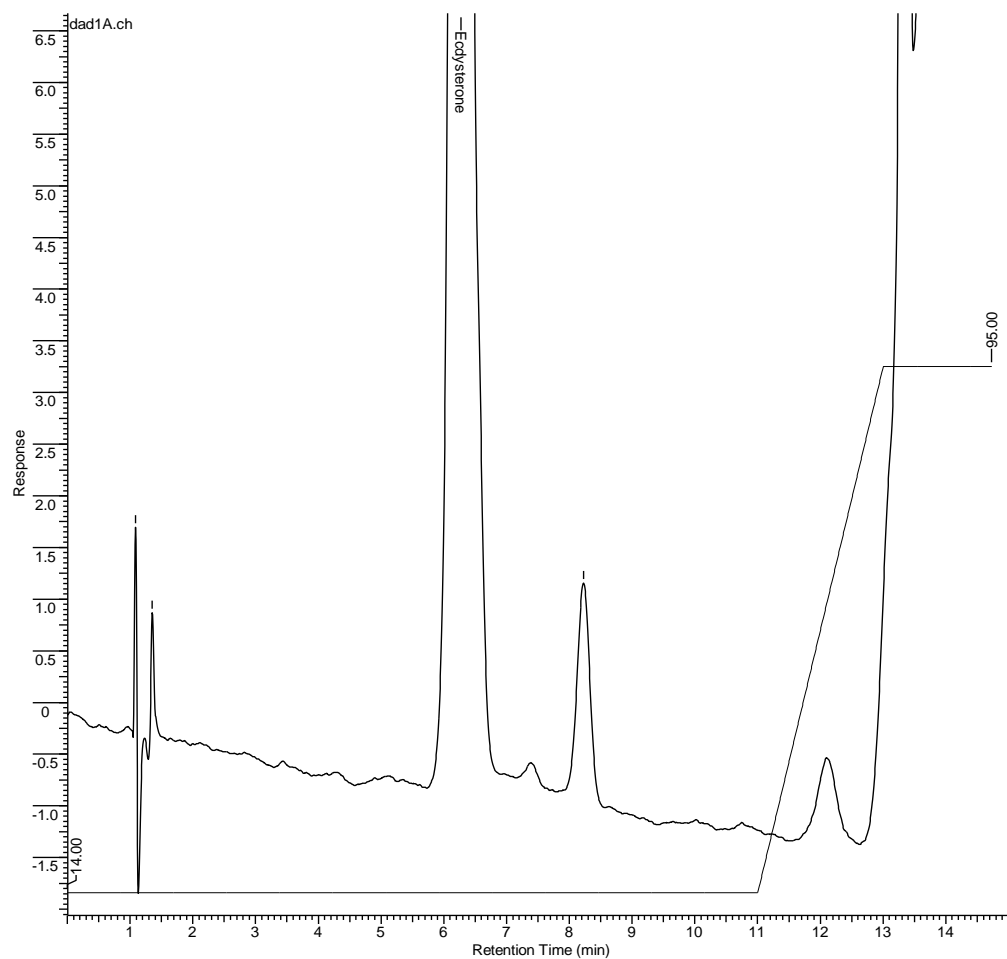
Содержание экдистерона – 0,019 %. Содержание полиподина В – 0,049 %.



No.	Name	tR Peak	Area (Y units)	Area Percent	Asymmetry	Resolutio
1	Ecdysterone	6.231	20265.840	2.804	1.069	0.840
2	Polypodine B	6.551	49380.074	6.832	0.924	1.155

Рис. 7. Хроматограмма спиртового извлечения травы мягковолосника водного

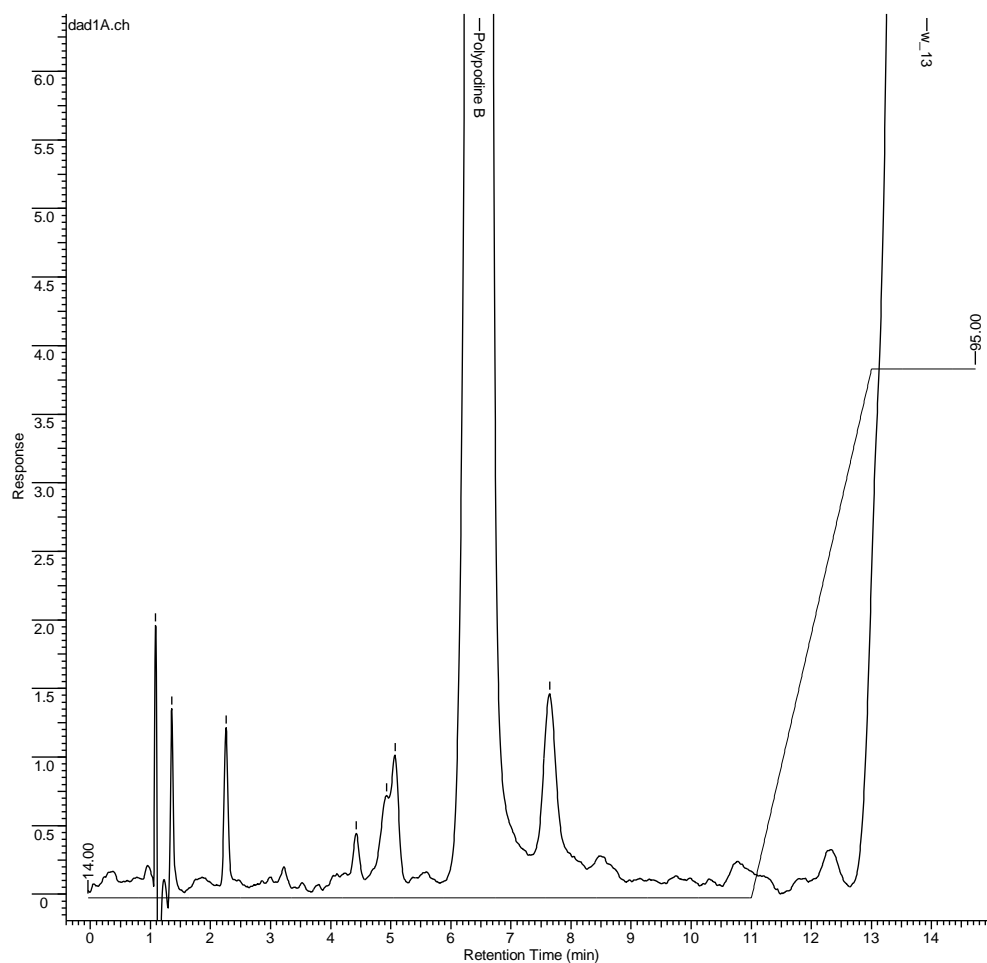
SAMPLE 3 Ecdysterone
0.004 мг в 4 мл MeOH



No.	Name	tR Peak	Area (Y units)	Area Percent	Asymmetry	Resolution	Plate Number
1	unknown	1.086	2070.193	0.097	1.033	3.805	4958.460
2	unknown	1.353	3709.888	0.175	1.405	25.589	4756.152
3	Ecdysterone	6.273	2047416.000	96.420	0.947	5.755	6721.409
4	unknown	8.226	29157.697	1.373	1.007	28.066	7792.162
5	unknown	14.446	41082.941	1.935	1.060	-	672236.563

Рис. 8. Хроматограмма экдистерона

SAMPLE 4 Polypodine B
0.0015 мг в 1 мл МеОН



No.	Name	tR Peak	Area (Y units)	Area Percent	Asymmetry	Resolution	Plate Nui
1	unknown	1.085	3614.734	0.116	1.190	4.215	6043.7
2	unknown	1.358	3406.249	0.110	0.938	9.405	5405.1
3	unknown	2.258	4954.642	0.159	1.047	15.147	5907.7
4	unknown	4.425	1834.627	0.059	0.989	2.015	11023.3
5	unknown	4.931	4440.231	0.143	1.000	0.477	3478.8
6	unknown	5.071	7925.210	0.255	0.751	4.941	6456.2
7	Polypodine B	6.478	2941715.750	94.609	1.011	3.398	6683.0
8	unknown	7.645	15595.992	0.502	0.993	26.067	6837.9

Рис. 9. Хроматограмма полиподина В

Концентрации этих соединений в спиртовом экстракте мягковолосника водного нами рассчитаны известным образом по площадям пиков.

Следует отметить, что состав экидистероидов травы волдырника ягодного и в. японского (рис. 3 и 4) если не в полной мере идентичен, то довольно близок.

Выводы

1. В результате проведенных исследований установлено наличие разнообразного набора экидистероидов с доминированием экидистероида и полиподина В в траве мягковолосника водного (*Myosoton aquaticum* (L.) Moench.) и волдырника японского (*Cucubalus japonicus* (Miq.) Worosch.).

2. Богатый состав природных соединений, представленный сахарами, заменимыми и незаменимыми аминокислотами, флавоноидами, макро-, микро- и ультрамикроэлементами, а также экидистероидами указывает на реальные предпосылки использования травы мягковолосника и волдырника в качестве сырья для разработки и создания новых лекарственных препаратов со специфическими фармакологическими свойствами.

Литература

1. Дармограй В.Н. Экидистероиды некоторых видов растений семейства гвоздичных / В.Н. Дармограй // Ресурсоведческое и фармакогностическое изучение лекарственной флоры СССР: науч. тр. ВНИИФ. – М., 1987. – Т. 25. – С. 111-114.
2. Дармограй В.Н. Экидистероиды волдырника ягодного (*Cucubalus baccifer* L.) / В.Н. Дармограй, Н.С. Фурса, С.В. Дармограй // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 5. – С. 95-98.
3. Дармограй С.В. Изучение элементного состава, свободных и связанных сахаров травы волдырника ягодного и мягковолосника водного / С.В. Дармограй, Н.С. Фурса // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2010. – № 1. – С. 148-155.
4. Дармограй С.В. Определение экологической чистоты, заменимых и незаменимых аминокислот в траве волдырника и мягковолосника / С.В. Дармограй, Н.С. Фурса // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2008. – № 4. – С. 130-136.
5. Зибарева Л.Н. Скрининг видов семейства *Caryophyllaceae* на присутствие фитоэкидистероидов / Л.Н. Зибарева, Л.Дайнен, В.И. Ерёмкина // Раст. ресурсы. – 2007. – Т. 43, вып. 4. – С. 66-74.
6. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Magnoliaceae-Limoniaceae* / под ред. Ал.А. Федорова. – Л.: Наука, 1985. – Т. 1. – 460 с.
7. Флора Восточной Европы / под ред. Н.Н. Цвелёва. – М.: СПб., 2004. – Т. 11. – 536 с.
8. *Cucubalugenin A*, a new triterpenoid from *Cucubais baccifer* / Y.X. Cheng [et al.] // *Fitoterapia*. – 2001. – Vol. 72, № 7. – P. 848-849.
9. *Phytoecdysterones* from *Cucubais baccifer* (*Caryophyllaceae*) / Y.X. Cheng [et al.] // *Acta Botanica Sinica*. – 2001. – Vol. 43, № 3. – P. 316-318.
10. Crystal structure of *cucubaldiol* a novel norsesquiterpenoid incorporating a bicyclo-[2.2.2]-octane ring system from *Cucubais baccifer* (*Caryophyllaceae*) / Y.X. Cheng [et al.] // *Helv. Chim. Acta*. – 2001. – Vol. 84, № 8. – P. 2343-2346.
11. *Cucubalactamand brachystemnin E*, two new compounds from *Caryophyllaceae* / Y.X. Cheng [et al.] // *Heterocycles*. – 2001. – Vol. 55, № 10. – P. 1943-1949.
12. New norsesquiterpenoids from *Cucubais baccifer* / Y.X. Cheng [et al.] // *Planta medica*. – 2002. – Vol. 168, № 1. – P. 91-94.
13. Chemical constituents from *Cucubais baccifer* / Y.X. Cheng [et al.] // *Zhongcaoyao*. – 2002. – Vol. 33, № 5. – P. 397-398.
14. Screening results of plants for phytoecdysteroids / S. Imai [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 1969. – Vol. 17. – P. 335-339.
15. Yu Q.L. 3-hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavone monohydrate from *Cucubais baccifer* L. / Q.L. Yu, H.Q. Duan, W.Y. Gao // *Acta Crystallogr.* – 2006. – Vol. 62. – P. 2910-2911.

**DISCLOSURE, ANALYSIS AND IDENTIFICATION
OF ECDYSTEROIDS IN MYOSOTON AQUATICUM
AND CUCUBALUS JAPONICUS**

S.V. Darmogray, N.S. Fursa, N.S. Erofeeva

By means of TLS of *Myosoton aquaticum* (L.) Moench. and *Cucubalus japonicus* L. herb ethanolic extracts a diverse assortment of ecdysteroids was revealed and their dominant components were identified with ecdysterones and polypodin B by the comparison with certainly known standards and HPLC-MS.

Key words: *myagkovolosnik water, voldyrnik Japanese, ecdysteroids.*

Дармограй С.В. – ассист. кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

E-mail: rzgmu@rzgmu.ru.