

Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту з пагонів *Ledum palustre*

Т.В.Упир, М.А.Комісаренко, А.М.Ковальова, О.М.Кошовий

Національний фармацевтичний університет
Харків, України

Досліджено склад фенольних сполук спиртового екстракту з пагонів багна звичайного, зокрема ідентифіковано арбутин, три фенолкарбонові кислоти — галову, елагову та протокатехову, гідроксикоричні кислоти — хлорогенову та кумарову, чотири кумарини, три флавоноїдні аглікони — кверцетин, лютеолін та кемпферол, гало- та елаготаніни. Встановлено вміст похідних гідроксикоричної кислоти ($2,56 \pm 0,02\%$), арбутину ($7,92 \pm 0,02\%$), флавоноїдів ($2,77 \pm 0,01\%$) та поліфенольних сполук ($21,83 \pm 0,02\%$) в густому спиртовому екстракті з пагонів багна звичайного.

Ключові слова: *Ledum palustre*, густий екстракт, спирт, фенольні сполуки.

ВСТУП

Багно звичайне (*Ledum palustre*, родина Вересових (Ericaceae) поширене в лісовій і тундровій зонах Східної Європи, Сибіру і Далекого Сходу [1]. В усіх частинах рослини, за винятком коренів, міститься ефірна олія, до складу якої входять: геранілацетат, палюстрол, ледол і вуглеводні. Крім того, листя містять еріколін, андромедотоксин, флавоноїди та дубильні речовини, які відносяться до похідних катехинів [1, 2]. У медицині настій багна застосовується як відхаркувальний засіб при гострих і хронічних бронхітах, а також при спастичних ентероколітах [2, 3]. Багно звичайне використовується як інсектицид [1]. На території України зареєстрований лише один препарат із цієї рослини — «Ледін», який застосовується як протикашльовий засіб. Фармацевтичною промисловістю використовується лише терпеноїдний екстракт, тоді як ця рослина багата й іншими класами БАР, зокрема фенольними сполуками.

Метою дослідження було дослідити хімічний склад густого спиртового екстракту з пагонів багна звичайного, зокрема фенольних сполук для створення нового лікарського засобу.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

Об'єктом дослідження був густий спиртовий екстракт з пагонів багна звичайного, отриманий екстракцією 96% спиртом у співвідношенні 1:10 при кімнатній температурі протягом доби. Аналіз отриманого екстракту проводили згідно з ДФУ [10] та віднесли його до густих екстрактів.

Попередній хімічний аналіз отриманого екстракту проводили загальнопринятими методами — якісними реакціями, паперовою хроматографією (ПХ) та хроматографією в тонкому шарі сорбенту (ТШХ). Екстракт розчиняли в спирті та хроматографували на папері марки «FN-12» в системах розчинників: I напрям — 15% оцтова кислота, II напрям — «н-бутанол — оцтова кислота — вода» у співвідношенні 4:1:2. Детектування фенольних сполук на хроматограмах проводили в УФ-світлі до і після обробки спиртовими розчинами натрію гідроксиду, алюмінію хлориду та діазореактивом [4].

Арбутин. Ідентифікацію арбутину в досліджуваному екстракті проводили методом ТШХ у порівнянні з достовірним зразком. Для цього 0,05 г екстракту розчиняли в 1 мл 96% етанолу. Пластинку з нанесеними пробами висушували на повітрі, поміщали в камеру, попередньо насичену сумішшю розчинників хлороформ-етанол (6:4) і хроматографували висхідним способом. Пластинку виймали, сушили та обробляли 10% спиртовим розчином гідроксиду натрію та реактивом Паулі. Арбутин проявляється у вигляді червоно-помаранчевої плями на рівні достовірного зразка. При цьому на хроматограмі виявляються плями інших фенольних сполук [10].

Кумарини. Для виявлення кумаринових сполук розчин густого екстракту хроматографува-

ли на папері в системах хлороформ (формамід 25%), гексан (формамід 25%) та на пластинках Silicagel 60 F 254 (Merck) в системі «бензол — етилацетат» (3:2). При перегляді хроматограм у фільтрованому УФ-світлі та обробці 10% спиртовим розчином калію гідроксиду та діазореактивом виявлено не менше 4 речовин кумаринової природи.

Флавоноїди. Після обробки двовірної хроматограми парами аміаку та 2% спиртовим розчином алюмінію хлориду плями агліконів набули яскраво-жовтої флуоресценції, а темно-коричневі плями стали жовто-зеленими, що характерно для флавонових глікозидів. У спиртовому екстракті було ідентифіковано не менше 7 речовин флавоноїдної природи. Для встановлення їхньої природи проводили кислотний гідроліз 8% хлористоводневою кислотою [4, 5].

За характерною флуоресценцією, величиною R_f та забарвленням плям на хроматограмі після обробки парами аміаку та розчином алюмінію хлориду в порівнянні з достовірними зразками аглікони флавоноїдів ідентифіковані як кверцетин (II- $R_f=0,76$), лютеолін (II- $R_f=0,83$), кемпферол (II- $R_f=0,91$).

Похідні гідроксикоричної кислоти. Розчин густого екстракту хроматографували з достовірними зразками похідних гідроксикоричної кислоти в системах: I — «н-бутанол — кислота оцтова — вода» (4:1:2) і II — 15% кислота оцтова з наступною обробкою хроматограм парами аміаку та діазореактивом. Встановили, що в екстракті міститься хлорогенова (I — $R_s=0,62$; II — $R_s=0,70$) та кумарова (I — $R_s=0,90$; II — $R_s=0,60$) кислоти.

Фенолокислоти досліджували методом хроматографії на папері в 2% оцтової кислоти висхідним способом. Детектування кислот проводили в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм [5, 7].

При детектуванні фенолокислот в УФ-світлі виявлено кілька плям з блакитною, блакитно-зеленою та блакитно-фіолетовою флуоресценцією, які після прояву хроматограми реактивом Паулі набували забарвлення у видимому світлі. За хроматографічною поведінкою (забарвленням плям в УФ-світлі, за значенням R_f при порівнянні зі стандартами) були ідентифіковані галова ($R_f=0,61$) і протокатехова ($R_f=0,71$) кислоти.

Поліфенольні сполуки. У результаті хроматографічного вивчення спиртового екстракту та продуктів його гідролізу (5% сірчаною кислотою) за допомогою ПХ в системах: I — «н-бутанол — кислота оцтова — вода» (4:1:2), II — 5%, III — 30% та IV — 60% кислота оцтова

з використанням 1% спиртового розчину заліза хлориду (III) як хромогенного реактиву встановили наявність галової та елагової кислот та гало-, елаготанінів.

Кількісне визначення груп БАР в екстракті листя толокнянки.

Кількісне визначення похідних гідроксикоричної кислоти, флавоноїдів та поліфенольних сполук проводили спектрофотометричним методом. Оптичну густину вимірювали в кюветі з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі Specol 1500 (Швейцарія) при відповідній довжині хвилі [11]. Виміри проводили 5 разів. Статистичну обробку результатів проводили згідно з вимогами ДФУ [10].

Арбутин. Вміст арбутину в екстракті проводили титриметричним методом згідно з ГФ XI [12].

0,5 г густого екстракту (точна наважка) кількісно переносили в колбу ємністю 100,0 мл додали 90 мл води та нагрівали, підтримуючи слабе кипіння протягом 30 хв., гарячий розчин фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу ємністю 100 мл, потім до розчину додавали 3 мл розчину свинцю ацетату основного, перемішували та після охолодження доводили об'єм фільтрату водою до мітки. Колбу поміщали в киплячу водяну баню та витримували до повної коагуляції осаду. Гарячу рідину фільтрували в суху колбу крізь паперовий фільтр, прикриваючи воронку годинниковим склом. Після охолодження до фільтрату додавали 1 мл концентрованої сірчаної кислоти, колбу зважували з помилкою $\pm 0,01$ г, приєднували до зворотного холодильника та нагрівали протягом 1,5 год., підтримуючи рівномірне та слабе кипіння.

Колбу з вмістом охолоджували, доводили до початкової маси водою та рідину повністю фільтрували в суху колбу крізь паперовий фільтр. До фільтрату додавали 0,1 г цинкового пилу і струшували протягом 5 хв. Потім рідину нейтралізували за лакмусовим папером натрію гідрокарбонатом, додавали ще 2 г натрію гідрокарбонату та після його розчинення фільтрували в суху колбу крізь паперовий фільтр.

50 мл фільтрату переносили в плоскодонну колбу ємністю 500 мл, додавали 200 мл води та відразу титрували з мікробюретки розчином йоду (0,1 моль/л) при струшуванні до появи синього забарвлення, яке не зникало протягом 1 хв. (індикатор — крохмаль).

Вміст арбутину в перерахунку на абсолютного сухий екстракт у відсотках (X) обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V \cdot 0,01361 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 50 \cdot (100 - w)}$$

де 0,01361 — кількість арбутину, відповідна 1 мл розчину йоду (0,1 моль/л), г.; V — об'єм розчину йоду (0,1 моль/л), витраченого на титрування, мл; m — маса екстракту, г; W — втрата в масі при висушуванні екстракту, %.

Після статистичної обробки встановили, що в екстракті міститься $7,92 \pm 0,02\%$ арбутину.

Похідні гідроксикоричної кислоти. Вміст похідних гідроксикоричних кислот визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту. Максимум поглинання РСЗ хлорогенової кислоти відбувається при 327 нм, тому виміри проводили при цій довжині хвилі [9, 11].

1,0 г густого екстракту (точна наважка) кількісно поміщали в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в 96% спирті етиловому, доводили об'єм до мітки тим же розчинником та перемішували (розчин А). 1,0 мл розчину А поміщали у мірну колбу ємністю 25,0 мл, доводили об'єм до мітки 20% спиртовим розчином, перемішували. 1,0 мл розчину поміщали у мірну колбу ємністю 10,0 мл, доводили об'єм до мітки 20% спиртовим розчином і фільтрували та вимірювали оптичну густина. Паралельно 0,05 г (точна наважка) хлорогенової кислоти (РОТУ 6-09-14-66) поміщали в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в 20% спирті етиловому, доводили об'єм тим же розчинником до мітки. 1,0 мл отриманого розчину поміщали в мірну колбу ємністю 50,0 мл, доводили об'єм до мітки 20% етиловим спиртом, перемішували та вимірювали оптичну густина в таких же умовах, як і досліджуваній розчин. Розчином порівняння служив 20% спирт етиловий.

Вміст суми похідних гідроксикоричної кислоти в екстракті з багна звичайного у відсотках (X) у перерахунку на хлорогенову кислоту обчислювали за формулою:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot a_1 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - w)}$$

де D_1 — оптична густина досліджуваного розчину; D_0 — оптична густина розчину РСЗ хлорогенової кислоти; a_1 — наважка екстракту, г; a_0 — наважка РСЗ хлорогенової кислоти, г; w — втрата в масі при висушуванні, %.

Після статистичної обробки встановили, що в екстракті міститься $2,56 \pm 0,02\%$ похідних гідроксикоричних кислот.

Флавоноїди. Вміст суми флавоноїдів визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на рутин після утворення комплексу з

$AlCl_3$, тому що попередні дослідження показали наявність у сировині флавоноїдних сполук похідних кверцетину [9, 11].

1,0 мл розчину А поміщали в мірну колбу ємністю 10,0 мл, додавали 1,0 мл 3% алюмінію хлориду в 96% спирті етиловому, доводили об'єм 70% спиртом до мітки та перемішували. Через 30 хв. розчин фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату, та вимірювали оптичну густина при довжині хвилі 417 нм. Розчином порівняння служив розчин, що містить 1,0 мл розчину А, доведений у мірній колбі ємністю 10,0 мл до мітки 70% спиртом [9, 11]. Паралельно в тих же умовах проводили дослід з РСЗ рутину: 0,01 г (точна наважка) рутину (ФС 42-2508-87), висушеного при температурі $135^\circ C$ до постійної маси, поміщали в мірну колбу ємністю 25,0 мл, розчиняли в 96% спирті етиловому, доводили об'єм до мітки і перемішували. До 1 мл отриманого розчину РСЗ рутину додавали 1,0 мл 3% алюмінію хлориду і доводили 70% спиртом до 25,0 мл [9, 11]. Як розчин порівняння використовували розчин РСЗ рутину, доведений у мірній колбі ємністю 25,0 мл до мітки 70% етиловим спиртом. Перед виміром оптичної густини розчини фільтрували через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату.

Вміст суми флавоноїдів в екстракті в перерахунку на рутин обчислювали у відсотках за формулою:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot a_1 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 10 \cdot (100 - w)}$$

де D_1 — оптична густина випробуваного розчину; D_0 — оптична густина розчину комплексу РСЗ рутину з алюмінію хлоридом; a_1 — наважка екстракту, г; a_0 — наважка РСЗ рутину; w — втрата в масі при висушуванні, %. Після статистичної обробки встановили, що в екстракті міститься $2,77 \pm 0,01\%$ суми флавоноїдів.

Поліфенольні сполуки. Вміст суми поліфенольних сполук визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на галову кислоту, тому що вона є їх основним компонентом. Максимум поглинання РСЗ галової кислоти відбувається при 214 та 270 нм. Виміри доцільніше проводити при 270 нм, тому що при цьому вплив супутніх речовин на результати вимірювання менший [9, 11].

1,0 мл розчину А поміщали в мірну колбу ємністю 25,0 мл, доводили об'єм 40% етиловим спиртом до мітки та перемішували. 1,0 мл отриманого розчину вносили в мірну колбу ємністю 10,0 мл та доводили об'єм тим же розчинником до мітки. Перед виміром оптичної густини роз-

чини фільтрували. Як розчин порівняння використували 40% спирт етиловий [9, 11].

Вміст суми поліфенольних сполук (X) у перерахунку на кислоту галову обчислювали у відсотках за формулою:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 100}{540 \cdot m \cdot 1 \cdot 1 \cdot (100 - w)},$$

де D — оптична густина випробуваного розчину; m — маса наважки екстракту, г; 540 — коефіцієнт питомого поглинання розчину кислоти галової у 40% спирті при довжині хвилі 270 нм; w — втрата в масі при висушуванні сировини у відсотках.

Після статистичної обробки встановили, що в екстракті міститься $21,83 \pm 0,01\%$ поліфенольних сполук.

ВИСНОВКИ

Досліджено склад фенольних сполук спиртового екстракту з пагонів багна звичайного, зокрема ідентифіковано арбутин, три фенолкарбонові кислоти — галову, елагову та протокатехову, гідроксикоричні кислоти — хлорогенову та кумарову, чотири кумарини, три флавоноїдні аглікони — кверцетин, лютеолін та кемпферол, гало- та елаготаніни.

Встановлено вміст похідних гідроксикоричної кислоти ($2,56 \pm 0,02\%$), арбутину ($7,92 \pm 0,02\%$), флавоноїдів ($2,77 \pm 0,01\%$) та поліфенольних сполук ($21,83 \pm 0,02\%$) у густому спиртовому екстракті з листя пагонів багна звичайного, що буде використано для його подальшої стандартизації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Гл. ред. П.С.Чиков. — М.: ГУТК, 1976 — 340 с.
2. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник / Під ред. А.М.Гродзинського. — К.: Українська енциклопедія ім. Бажана, 1992. — С. 49.
3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейства *Raeoniaceae* — *Thymeliaceae*. — Л.: Наука, 1985 — 336 с.
4. Применение цветных реакций для обнаружения флавоноидов путем хроматографии на бумаге / В.А.Бандюкова // Растительные ресурсы. — 1965. — Т.1, №4. — С. 591-597.
5. Гринкевич Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И.Гринкевич, Л.Н.Сафронич. — М., 1983. — 174 с.
6. Фенолоксиолы растений, их эфиры и гликозиды / В.А.Бандюкова // Химия природных соединений. — 1983. — №3. — С. 263-272.
7. Содержание арбутина в *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. из разных районов Народной Республики Болгарии / Г.М.Китанов, Е.М.Генова, В.М.Руменин

// Растительные ресурсы. — №3. — 1986. — С. 425-431.

8. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпта / О.М.Кошовий, А.М.Комісаренко, А.М.Ковальова, Л.М.Малоштан, І.М.Мудрик // Фармаком. — 2005. — №2/3. — С. 151-161.
9. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доп. 2. — Харків: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
10. Розробка метода стандартизації нового лікарського засобу піфламін / А.М.Ковальова, Г.В.Георгієвський, В.М.Ковальов [та ін.] // Фармаком. — №2. — 2002. — С. 92-97.
11. Государственная фармакопея СССР. — 11-е изд. Вып. I. — М.: Медицина, 1987. — 334 с.

Т.В.Упыр, Н.А.Комиссаренко, А.М.Ковалева, О.Н.Кошевой. Исследование фенольных соединений спиртового экстракта из побегов *Ledum palustre*. Харьков, Украина.

Ключевые слова: *Ledum palustre*, густой экстракт, спирт, фенольные соединения.

Исследован состав фенольных соединений спиртового экстракта из побегов багульника болотного, в частности идентифицированы арбутин, три фенолкарбоновых кислоты — галловая, элаговая и протокатеховая, гидроксикоричные кислоты — хлорогеновая и кумаровая, четыре кумарина, три флавоноидных агликона — кверцетин, лютеолин и кемпферол, гало- и элаготанины. Установлено содержание производных гидроксикоричной кислоты ($2,56 \pm 0,02\%$), арбутина ($7,92 \pm 0,02\%$), флавоноидов ($2,77 \pm 0,01\%$) и полифенольных соединений ($21,83 \pm 0,02\%$) в густом спиртовом экстракте из побегов багульника болотного.

T.V.Upyr, N.A.Komissarenko, A.M.Kovaleva, O.N.Koshevoy. The study of phenolic compounds of alcoholic extract from the leaves of bearberry. Kharkiv, Ukraine.

Key words: *Ledum palustre*, thick extract, alcohol, phenolic compounds.

The composition of phenolic compounds in the alcoholic extract from shoots of *ledum palustre*, was investigated three phenolcarbonic acid: gallic, ellagic and protocatehovic acid, chlorogenic acid, hydroxycinnamic acids: coumaric and chlorogenic acids, 4 coumarin, 3 ahlikon flavonoids: luteolin, kaempferol, quercetin; galo- and elahotanins were identified. Contents of phenolic compounds in the dense alcohol extract from the shoots *ledum palustre*: hydroxycinnamic acid derivatives are $2,56 \pm 0,02\%$, arbutin — $7,92 \pm 0,02\%$, flavonoids — $2,77 \pm 0,01\%$ and polyphenols compounds — $21,83 \pm 0,02\%$.

Надійшла до редакції 01.08.2012 р.