

ХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 615.322

О. С. Игнатовец¹, О. Г. Совастей¹, Е. В. Феськова¹, В. Н. Леонтьев¹, В. В. Титок²

¹ Белорусский государственный технологический университет

² Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО (*DRACOCEPHALUM MOLDAVICA* L.)

В работе представлены результаты исследований по идентификации фенольных соединений змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Экспериментально установлено время экстракции комплекса фенольных соединений из лекарственного растения. Разработаны методики и проведено количественное определение суммы фенольных соединений, флаван-3-олов и флавонов в экстрактах змееголовника молдавского спектрофотометрическим методом. Концентрацию фенольных соединений определяли методом Фолина и Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси. Суммарное содержание флавонолов и флавонов устанавливали по реакции образования комплексных соединений с хлоридом алюминия. Количественное определение флавонолов в экстракте проводили путем определения оптической плотности продукта реакции вышеуказанных соединений с 2,4-динитрофенилгидразином при 495 нм. Разработана методика хроматографического анализа фенольных соединений экстракта указанного растения. На основании электронных и масс-спектров сделан вывод о присутствии розмариновой кислоты, лютеолина и кверцетина в исследуемом экстракте. Проведенные исследования позволяют рекомендовать змееголовник молдавский для использования в фармацевтической промышленности с целью создания фитопрепаратов на его основе.

Ключевые слова: фенольные соединения, флавонолы, флавоны, экстракция, змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.), хроматография, спектрофотометрия, электронный спектр, масс-спектр.

O. S. Ignatovets¹, O. G. Sovastey¹, A. Feskova¹, V. N. Leontiev¹, V. V. Titok²

¹ Belarusian State Technological University

² Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus

IDENTIFICATION OF THE PHENOLIC COMPOUNDS OF THE MOLDAVIAN DRAGONHEAD (*DRACOCEPHALUM MOLDAVICA* L.)

The paper presents the results of the studies of the phenolic compounds identification of the Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) from the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. The time of extraction of a complex of phenolic compounds from a medicinal plant was experimentally established. Methods were developed and the quantitative determination of the sum of phenolic compounds, flavan-3-ols and flavones in extracts of the Moldavian dragonhead was performed by spectrophotometric method. The concentration of phenolic compounds was determined by the method of Folin and Chocalteu in the modification of Singleton and Rossi. The total content of flavonols and flavones was determined by the reaction of the formation of complex compounds with aluminum chloride. Quantitative determination of flavonols in the extract was carried out by determining the optical density of the reaction product of the above compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine at 495 nm. A technique for the chromatographic analysis of phenolic compounds in the extract of the specified plant was developed. Based on the electronic and mass spectra, it was concluded that rosmarinic acid, luteolin and quercetin were present in the test extract. The conducted studies allow us to recommend the Moldovan dragonhead for use in the pharmaceutical industry in order to create herbal preparations based on it.

Keywords: phenolic compounds, flavonols, flavones, extraction, Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.), chromatography, spectrophotometry, electronic spectrum, mass spectrum.

Введение. Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) – травянистое растение рода Змееголовник (*Dracocephalum*) семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), имеющее широкий спектр биологически активных веществ и пользующееся большой популярностью в народной медицине. Начиная с 30-х годов прошлого столетия змееголовник выращивался как эфирномасличная культура и являлся сырьем для косметической промышленности. В настоящее время в отдельных европейских странах (Румыния, Венгрия, Германия) его выращивают в качестве лекарственного растения, заменителя Melissa лекарственной.

Содержание эфирного масла в свежем сырье составляет 0,25–0,58%. Оно представляет собой светло-желтую, легкоподвижную жидкость с выраженным лимонным ароматом. Основные компоненты эфирного масла – гераниол, геранилацетат и цитраль, представляющие собой монотерпены. Их соотношение меняется в зависимости от фазы развития растения [1].

Помимо эфирного масла, следует обратить внимание на флавоноидные соединения – лютеолин и апигенинпроизводные, проявляющие диуретическое, желчегонное и антитоксическое действие и снижающее содержание гликогена в крови [2].

В Германии разработаны стандарты на сухую траву змееголовника молдавского, методы испытания сырья на подлинность. Как показали проведенные исследования, змееголовник молдавский проявляет успокаивающее, спазмолитическое, адаптогенное, антисептическое, противовоспалительное, эстрогеноподобное действие, стимулирует деятельность коры надпочечников (это свойство проявляется в основном благодаря цитралю). Препараты растения благоприятно влияют при переутомлении и повышенной возбудимости, при дисфункции на фоне гиподисфункции яичников и заболеваниях, связанных с нарушением обмена веществ.

Семена змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) также содержат до 20% жирного масла, состоящего из ненасыщенных жирных кислот.

Состав биологически активных веществ (БАВ) любого лекарственного растения генетически детерминирован, однако соотношение компонентов зависит от климатических условий произрастания данного вида растений. В связи с этим актуальны исследования по количественному определению и идентификации комплекса БАВ змееголовника молдавского, культивируемого на территории Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (ЦБС).

Основная часть. Цель данной работы заключалась в определении суммы фенольных соединений, флавонов и флавонолов в экстрактах лекарственного растения, а также в разработке методики хроматографического и масс-спектрометрического анализа экстракта для идентификации указанных соединений. Объектом исследования являлся змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (ЦБС).

Экстракцию флавоноидов из лекарственного растительного сырья проводили 70%-ным этиловым спиртом в течение 1 ч, соотношение сырье : экстрагент составляло 1 : 100. Спиртовое извлечение количественно переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 6000 об/мин на протяжении 10 мин.

Суммарное содержание флавоноидов определяли при помощи реакции с реактивом Фолина – Чокальтеу [3]. При окислении в щелочной среде реактивом Фолина – Чокальтеу, представляющим собой фосфомолибдодовольфрамовые гетерополикомплексы флавонолы, флаван-3-олы и флавоны могут превращаться в хиноидные соединения, имеющие полосы поглощения в видимой области спектра. Например, кверцетин может окисляться следующим образом (рис. 1).

Взаимодействовать с $AlCl_3$ могут только флавонолы и флавоны, имеющие гидроксильные группы в положениях 3 и 5 (рис. 2).

В этом случае соли Al образуют комплексные соединения, имеющие характерные полосы поглощения в области 410–430 (рис. 3).

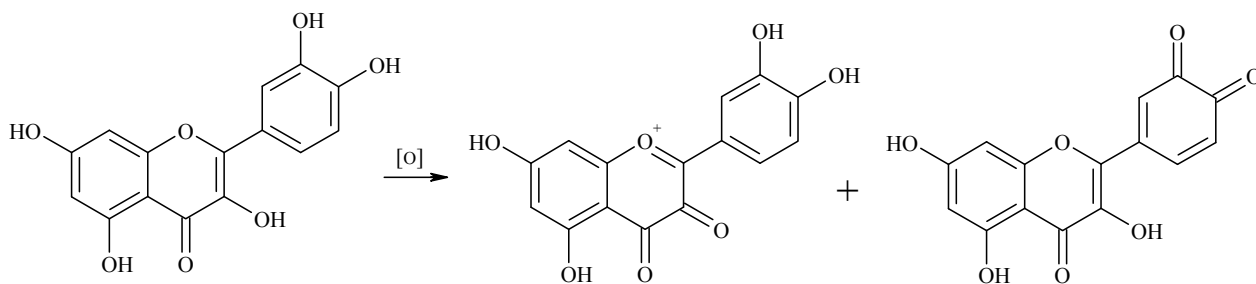


Рис. 1. Окисление кверцетина

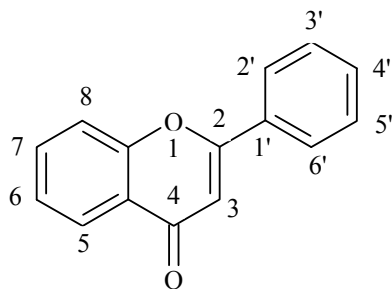


Рис. 2. Структура флавоноидов

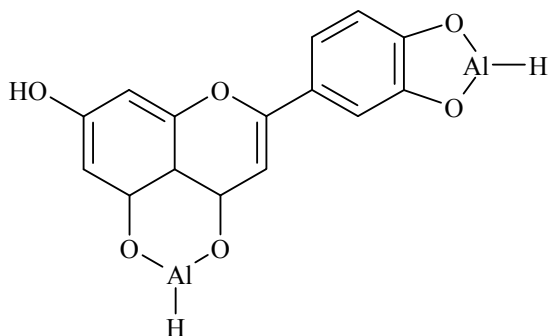


Рис. 3. Структурная формула комплексного соединения

2,4-динитрофенилгидразин взаимодействует только с флавонолами по уравнению реакции, представленному на рис. 4.

При этом образуются замещенные 2,4-динитрофенилгидразоны, имеющие максимумы поглощения при 495 нм.

Проведенные нами исследования показали, что общее содержание флавоноидов в экстракте змееголовника молдавского в пересчете на галловую кислоту составило $(0,38 \pm 0,05)$ мг/мг сухого экстракта. Содержание флавоноидов в пересчете на нарингин составило $(0,17 \pm 0,03)$ мг/мг сухого экстракта, а содержание флавонов и флавонолов оказалось равным $(0,31 \pm 0,03)$ мг/мг сухого экстракта змееголовника молдавского (таблица).

Представленные в таблице результаты позволяют сделать вывод о том, что в сухом экстракте змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) содержится флавонолов – 0,17 мг/мг, флавонов – 0,14 мг/мг, флаван-3-олов – 0,07 мг/мг.

Содержание фенольных веществ в экстракте змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.)

Фенольное соединение	Содержание, мг/мг
Флавонолы, флаван-3-олы, флавоны	$0,38 \pm 0,05$
Флавонолы, флавоны	$0,31 \pm 0,03$
Флавонолы	$0,17 \pm 0,03$

На следующем этапе были проведены исследования по идентификации индивидуальных соединений экстракта с помощью метода ВЭЖХ-МС. Водно-спиртовой экстракт анализировали при помощи хроматомасс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C₁₈ 250×4,6 мм, 5 мкм (Thermo Electron Corporation, США). Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспрей-ионизацией (ESI). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : вода с 1% муравьиной кислоты в соотношении 20 : 80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин. Регистрацию масс-спектров проводили в области отрицательных и положительных ионов. Параметры масс-спектрометрии были следующими: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура десольватации – 350°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/ч.

Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения Mass Lynx.

По результатам хроматографического анализа, можно сделать вывод, что в состав экстракта змееголовника молдавского входит порядка 9 компонентов (рис. 5).

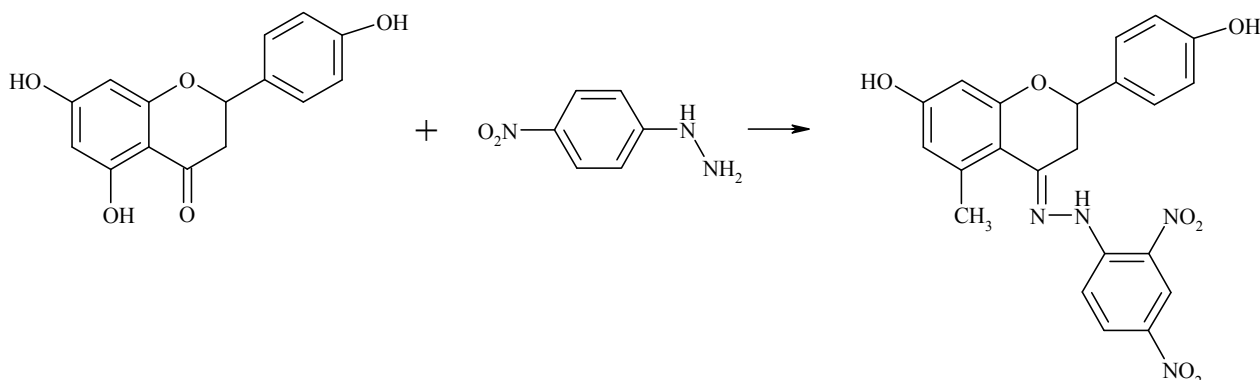


Рис. 4. Уравнение реакции взаимодействия 2,4-динитрофенилгидразина с флавонолами

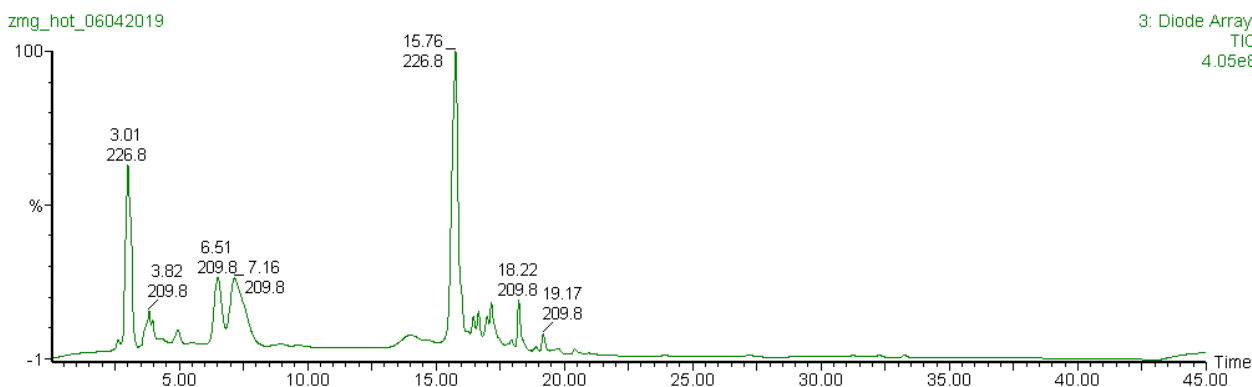


Рис. 5. Хроматограмма экстракта змеголовника молдавского

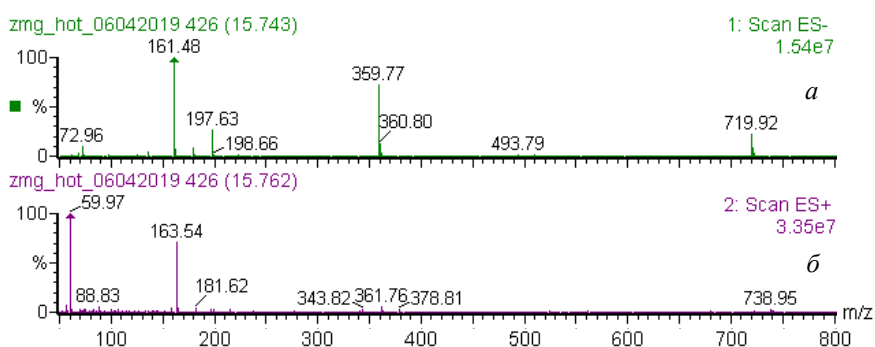


Рис. 6. Масс-спектры в области отрицательных ионов (а) и в области положительных ионов (б) компонента хроматографического пика с временем удерживания 15,76 мин

Идентификация индивидуальных веществ с помощью масс-спектрометрии позволила предположить, что пик со временем удерживания 15,76 мин принадлежит розмариновой кислоте. В масс-спектре вещества данного пика в области отрицательных ионов наблюдается молекулярный ион с m/z 359,77, соответствующий $[M - H]^-$, т. е. розмариновой кислоте, а также молекулярные ионы с m/z 161,48 и с m/z 719,92, относящиеся к $[M - C_9H_{10}O_5 - H]^-$ и $[2M - H]^-$ соответственно (рис. 6, а). В области положительных ионов наблюдаются молекулярные ионы: с m/z 361,76, соответствующий $[M + H]^+$, и с m/z 163,54, соответствующий $[M - C_9H_{10}O_5 + H]^+$ (рис. 6, б).

Указанное соединение обладает высокой противовоспалительной, антимутагенной, про-

тивоопухолевой, антипролиферативной и антициклооксигеназной, антиаллергенной, антидепрессантной, противовирусной активностью, в том числе против вируса иммунодефицита человека, является одним из эффективных натуральных антиоксидантов и может защищать от свободнорадикальных патологий, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания, лучевая болезнь [4–6].

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [4].

Пик с временем удерживания 7,16 мин принадлежит лютеолин-7-О-глюкорониду (молекулярная масса 462,36 г/моль), что подтверждается масс-спектрометрическим анализом (рис. 7).

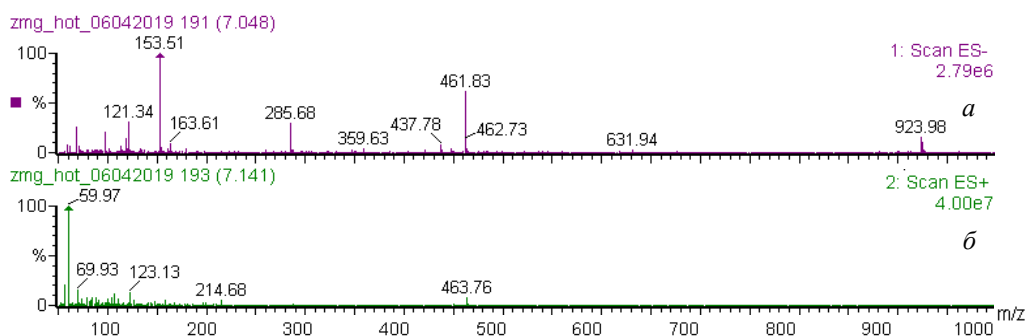


Рис. 7. Масс-спектры в области отрицательных ионов (а) и в области положительных ионов (б) компонента хроматографического пика с временем удерживания 7,16 мин

Для данного соединения в области отрицательных ионов идентифицируется молекулярный ион $[M - H]^-$ с m/z 461,83, молекулярный ион с m/z 285,68, соответствующий $[M - glu - H]^-$. В области положительных ионов в масс-спектре данного вещества наблюдается молекулярный ион с m/z 463,76, который относится к $[M + H]^+$.

Обладая множественными биологическими эффектами, такими как противовоспалительное, противоаллергическое и противоопухолевое действие, лутеолин и его гликозиды функционируют в клетках растений как антиоксиданты.

Заключение. Таким образом, на примере экстракта змееголовника молдавского отработана методика по определению содержания групп флавоноидов различной структуры. По результатам сделан вывод, что в сухом экстракте змеего-

ловника молдавского (*Dracocéphalum moldavica* L.) содержится флавонолов – 0,17 мг/мг, флавонов – 0,14 мг/мг, флаван-3-олов – 0,07 мг/мг.

С помощью метода хромато-масс-спектрометрии идентифицированы индивидуальные фенольные соединения в водно-спиртовом экстракте лекарственного растения. В результате сделан вывод о наличии розмариновой кислоты, как доминирующего фенольного компонента, а также лутеолина и кверцитина. Разработанная методика хроматографического разделения экстракта змееголовника лекарственного может быть использована и для анализа аналогичных экстрактов лекарственных растений для идентификации и определения количественного содержания индивидуальных биологически активных соединений.

Литература

1. Никитина А. С. Изучение основных групп биологически активных веществ травы змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.), культивируемого в условиях Ставропольского края // Санкт-Петербургские научные чтения: тез. докл. Междунар. молодеж. мед. конгр., 7–9 дек. 2005 г. СПб., 2005. С. 74.
2. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications / J. E. Brown [et al.]; eds. O. M. Andersen, K. R. Markham. Boca Raton: CRC Press, 2006. 1256 p.
3. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent // *Methods in Enzymology*. 1999. Vol. 299. P. 152–178.
4. Азарова О. В., Брюханов В. М., Зверев Я. Ф. Фармакологическая активность розмариновой кислоты // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. 2010. № 6. С. 3–8.
5. Буданцев А. Л., Лесиовская Е. Е. Розмариновая кислота: источники и биологическая активность // Растительные ресурсы. 2012. Т. 48, № 3. С. 453–468.
6. Ивашев М. Н., Чуклин Р. Е. Влияние оксикоричных кислот на систему мозгового кровообращения // Фармация и фармакология. 2013. № 1. С. 44–48.

References

1. Nikitina A. S. The study of the main groups of biologically active substances of Moldavian dragon-head grass (*Dracocephalum moldavica* L.), cultivated in the Stavropol territory. *Tezisy dokladov Mezhdunarodnogo molodezhnogo meditsinskogo kongressa "Sankt-Peterburgskiy nauchnyye chteniya"* [Abstracts of the reports of the International medical congress "Saint Petersburg scientific readings"]. St. Petersburg, 2005, p. 74 (In Russian).
2. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. J. E. Brown [et al.]; eds. O. M. Andersen, K. R. Markham. Boca Raton, CRC Press Publ., 2006. 1256 p.
3. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other Oxidation Substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152–178.
4. Azarova O. V., Bryukhanov V. M., Zverev Ja. F. Pharmacological activity of rosmarinic acid. *Voprosy biologii, meditsyny i farmatsevticheskoy khimii* [Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry], 2010, no. 6, pp. 3–8 (In Russian).
5. Budantsev A. L., Lesiovskaia Ye. Ye. Rosmarinic acid: sources and biological activity. *Rastitel'nyye resursy* [Plant resources], 2012, vol. 48, no. 3, pp. 453–468 (In Russian).
6. Ivashev, M. N. Chuklin R. Ye. The effect of oxycinnamic acids on the cerebral circulation. *Farmatsiya i farmakologiya* [Pharmacy and pharmacology], 2013, no. 1, pp. 44–48 (In Russian).

Информация об авторах

Игнатовец Ольга Степановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatovets@belstu.by

Совастей Ольга Григорьевна – научный сотрудник Центра физико-химических методов исследования. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: center@belstu.by

Феськова Елена Владимировна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Леонтьев Виктор Николаевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, доцент, директор Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, г. Минск, Сурганова, 2в, Республика Беларусь). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Information about the authors

Ignatovets Olga Stepanovna – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatovets@belstu.by

Sovastey Olga Grigor'yevna – Researcher, physical and chemical investigations methods center. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: center@belstu.by

Feskova Alena – PhD (Engineering), Senior Researcher, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Leontiev Viktor Nikolayevich – PhD (Chemistry), Associate Professor, Head of the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Titok Vladimir Vladimirovich – Corresponding Member National Academy of Sciences of Belarus, DSc (Biology), Associate Professor, Head of the Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus. Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surhanova str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Поступила 08.11.2019