

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ *AGRIMONIA PILOSA* LEDEB¹

PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *AGRIMONIA PILOSA* LEDEB

T. Shaldayeva
V. Kostikova
G. Vysochina

Summary. The composition and content of the phenolic compounds and antioxidant activity of the flowers and leaves of *Agrimonia pilosa* Ledeb. were studied. Thirteen compounds — kaempferol, astragalol, kaempferol-3-O- β -rutinoside, hyperoside, rutin, quercitrin, apigenin, vitexin, luteolin-7-glucoside; ellagic, chlorogenic, caffeic and vanillic acid are identified. Rutin and ellagic acid are the dominant components. The maximum content of flavonoid substances (4,57% — in flowers and 2,53% — in leaves) and total antioxidant activity (0,70 mg/g and 0,38 mg/g, accordingly) was observed during the flowering phase of *A. pilosa*.

Keywords: *Agrimonia pilosa*, phenolic compounds, antioxidant activity.

Шалдаева Татьяна Михайловна

К.б.н., н.с., ФГБУН Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН
tshaldaeva@yandex.ru

Костикова Вера Андреевна

К.б.н., н.с., ФГБУН Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН
serebryakova-va@yandex.ru

Высочина Г. И.

Д.б.н., профессор, ФГБУН Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН
ysochina_galina@mail.ru

Аннотация. Проведено изучение состава и содержания соединений фенольного комплекса и антиоксидантной активности органов надземной части репейника волосистого *Agrimonia pilosa* Ledeb. Идентифицированы 13 соединений — кемпферол и его гликозиды астрагаллин, кемпферол-3-O- β -рутинозид, гликозиды кверцетина гиперозид, рутин, кверцитрин, флавоны апигенин и его С-гликозид витексин, лютеолин-7-глюкозид, а также эллаговая, хлорогеновая, кофейная и ванилиновая кислоты. Рутин и эллаговая кислота являются доминирующими компонентами. Максимальное содержание флавоноидов и суммарной антиоксидантной активности обнаружено в фазу цветения растений.

Ключевые слова: фенольные соединения, *Agrimonia pilosa*, антиоксидантная активность.

Введение

Аgrimonia pilosa Ledeb.— репейничек волосистый, многолетнее травянистое растение, широко распространенное на территории Сибири. Обитает в лесах, среди кустарников, на лугах, берегах озер и рек [1]. Трава репейника используется в нетрадиционной медицине при заболеваниях желчного пузыря, расстройствах желудка и кишечника, как мочегонное, при ревматизме, воспалительных заболеваниях горла, носа, при дерматитах и фурункулезе. Применяется в виде отваров, настоев, жидких экстрактов, чаев, спиртовых и масляных настоек [2]. Анализ водного и хлороформного извлечений и экстрактов, полученных на 20%, 40% и 70% этаноле, показал, что в траве *A. pilosa* содержится не менее 29 фенольных соединений, из них идентифицированы 11 соединений (4 флавоноида — рутин, кверцетин, рамнозид кверцетина, апигенин, 4 кумарина — эскулетин, эскулин, умбеллиферон и ско-

полетин, 3 гидроксикоричных кислоты — кофейная, хлорогеновая и транс-коричная). Характерно присутствие значительного количества эллаговой кислоты, а также рутина, который является доминирующим компонентом в сумме флавоноидов [3]. По данным T. Murayama et al. [4] трава репейника содержит противоопухолевое вещество агримонин.

Биологическая активность *A. pilosa* подтверждена экспериментальными исследованиями. В частности, установлено, что растения этого вида обладают гастропротективной, кардиотонической, диуретической, натрийуретической, антикоагулянтной, тромболитической, антифунгальной [5], цитотоксической (на клетках линии MV12), антимуtagenной, антиоксидантной, сосудорасширяющей, гепатопротекторной, противораковой, иммуномодулирующей, антибактериальной активностью, улучшают реологические свойства крови [6]. Учитывая широкий ареал, значительные запасы сырья

¹ Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами».

и широкий спектр биологической активности, проведение исследований *A. pilosa* актуально.

Цель исследования — изучение состава и содержания соединений фенольного комплекса и антиоксидантной активности органов надземной части *A. pilosa*.

Материал и методы

Материалом для исследований послужила надземная часть растений *A. pilosa* (листья, соцветия), собранных в 2017 г. в условиях естественного произрастания в Новосибирской области (около ЦСБС СО РАН). Образцы растений высушивали в тени в проветриваемом помещении и измельчали до размера частиц 1–2 мм.

Проводили исчерпывающую экстракцию 70% этиловым спиртом, контролируя полноту экстракции реакцией с 5% раствором NaOH (до исчезновения желтой окраски) [7]. Полученные извлечения объединяли и концентрировали выпариванием растворителя на водяной бане.

Для детального изучения фенольных соединений применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) как один из самых надежных при определении индивидуальных компонентов [8]. 1 мл экстракта разбавляли бидистиллированной водой до 5 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (ЗАО «БиоХимМак») для освобождения от примесей гидрофильной природы. Вещества смывали с патрона небольшим количеством (3 мл) 70% этанола, а затем 2 мл 96% этанола. Объединенный элюат пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Анализ проб выполняли на аналитической ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent 1200» с диодно-матричным детектором и системы для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. Диодно-матричный детектор позволил осуществить детектирование и запись спектров поглощения в диапазоне длин волн 255–370 нм. Разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C18 размером 4,6 × 150 мм с диаметром частиц 5 мкм при градиентном режиме элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 32 до 33% за 27 мин.; от 33 до 46% с 27 по 38 мин.; от 46 до 56% с 38 по 50 мин (система 1). Скорость потока элюента — 1 мл/мин. Объем вводимой пробы — 10 мкл. Температура колонки — 26 °С. Детектирование осуществляли при длинах волн $\lambda = 254, 270, 290, 340, 360$ и 370 нм. В качестве подвижных фаз использовали метанол, ортофосфорную кислоту, бидистиллированную воду. Для приготовления стандартных образцов применяли препараты фирмы «Fluka» и «Sigma». Количественное определение индивидуальных компонентов в образце

A. pilosa проводили по методу внешнего стандарта как наиболее оптимальному для хроматографического анализа многокомпонентных смесей [9]. Содержание индивидуальных компонентов (C_x) вычисляли по формуле (мг/г от массы воздушно-сухого сырья):

$$C_x = C_{\text{ст}} \times S_1 \times V_1 \times V_2 / S_2 \times M \times V_3 \times 1000,$$

где $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного вещества, мкг/мл; S_1 — площадь пика компонента в анализируемой пробе; е.о.п., S_2 — площадь пика стандартного вещества, е.о.п., V_1 — объем элюата после вымывания фенольных соединений с концентрирующего патрона, мл; V_2 — общий объем экстракта, мл; V_3 — объем экстракта, взятый на анализ, мл; M — масса навески, г; 1000 — пересчетный коэффициент.

Для определения состава агликонов проводили кислотный гидролиз исходного экстракта. Для проведения кислотного гидролиза к 0,5 мл водно-этанольного извлечения прибавляли 0,5 мл HCl (2н) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. После охлаждения разбавленный экстракт пропускали через концентрирующий патрон, агликоны смывали 96% этанолом. Далее проводили хроматографический анализ, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 45 до 48% за 18 минут (система 2). Детектирование осуществляли при длине волны $\lambda = 370$ нм.

Количественное определение суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом, в котором использована реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия [10]. Содержание флавоноидов в пробе рассчитывали по калибровочному графику, построенному по рутину.

Для определения суммарного содержания антиоксидантов (ССА) фенольного типа использовали оперативный амперометрический метод [11]. Измерения проводили на приборе «Цвет Яуза-01-АА» разработки НПО «Химавтоматика». Сущность данного метода заключается в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода при постоянном потенциале 1,3 В. При этом происходит окисление только — ОН природных антиоксидантов фенольного типа.

Для получения водного экстракта 1,0 г сырья заливали 50 мл кипящей бидистиллированной воды и настаивали в течение 10 мин без термостатирования, после чего тщательно отфильтровывали через бумажный фильтр «синяя лента». Для получения водно-спиртового экстракта 1,0 г сырья заливали 50 мл спирта (70%)

Таблица 1. Содержание фенольных соединений в надземных органах *A. pilosa* (в мг/г от массы воздушно — сухого сырья)

№ пика	Соединение	Время удерживания (t_R), мин	Спектральная характеристика λ_{max} , нм	Содержание, мг/г	
				соцветия	листья
Нативные экстракты (система 1)					
1	хлорогеновая кислота	3,4	244, 300 пл, 330	0,13	0,11
2	кофейная кислота	4,3	240, 295 пл, 325	0,10	0,17
3	ванилиновая кислота	5,7	260, 290	0,18	0,12
4	-	9,8	290	0	0,11
5	-	10,5	-	0,20	0
6	витексин	12,6	270, 296 пл, 340	0,31	0,54
7	-	13,5	265, 350	0,33	0,21
8	лютеолин-7-глюкозид	16,7	250, 265 пл, 350	0,39	0,34
9	гиперозид	17,9	255, 268 пл., 355	1,15	1,73
10	рутин	19,9	256, 358	4,54	1,55
11	эллаговая кислота	22,0	255, 300 пл, 370	4,12	2,26
12	-	24,1	-	0,60	0,38
13	-	27,8	-	0	0,23
14	-	29,9	265, 340	0,84	5,0
15	кверцитрин	31,3	270, 326	0	0,68
16	астрагалин	32,2	265, 300 пл., 350	0,24	0,26
17	кемпферол-3-О- β -рутинозид	33,7	265, 355	0,49	0,54
18	-	37,6	-	0	0,24
19	-	38,3	-	0,15	0,31
20	-	46,5	265,300 пл, 315	1,03	0,78
21	кемпферол	47,1	266, 370	0,38	0,14
22	апигенин	49,3	270, 340	0,13	0
Гидролизаты (система 2)					
1	кверцетин	6,4	255, 372	2,81	1,44
2	лютеолин	8,1	255, 270, 290 пл, 350	0,21	0,15
3	кемпферол	10,8	266, 370	1,09	0,71
4	апигенин	12,7	270, 340	0,30	0,24

Примечание. «-» — вещество не идентифицировано.

и встряхивали в течение одного часа на перемешивающем устройстве. Затем содержимое колбы фильтровали через бумажный фильтр.

Перед измерением строили градуировочную кривую зависимости сигнала образца сравнения (галловой кислоты) от его концентрации. С помощью полученной градуировки сравнивали сигналы от исследуемого экс-

тракта с сигналами галловой кислоты. Время измерения одного образца составляет 10–15 мин. Концентрацию подбирали в процессе измерения. За результат принимали среднее из данных трёх параллельных определений по каждому показателю.

Коэффициент корреляции (r) между содержанием биологически активных веществ в экстрактах *A. pilosa*

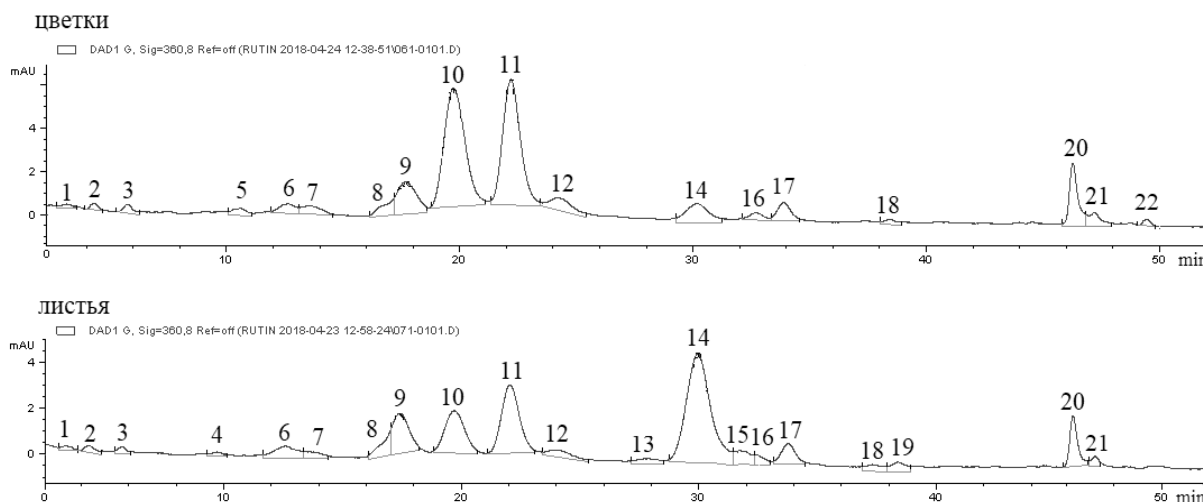


Рис. 1. ВЭЖХ — хроматограммы водно-этанольного экстракта из надземных органов *A. pilosa*: 1 — хлорогеновая кислота, 2 — кофейная кислота, 3 — ванилиновая кислота, 6 — витексин, 8 — лютеолин-7-глюкозид, 9 — гиперозид, 10 — рутин, 11 — эллаговая кислота, 15 — кверцитрин, 16 — астрагалин, 17 — кемпферол-3-О-β-рутинозид; 21 — кемпферол, 22 — апигенин; остальные вещества — не идентифицированные компоненты.

и их антиоксидантной активностью рассчитывали по методу Пирсона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [12].

Результаты и обсуждение

Исследование состава фенольных соединений методом ВЭЖХ показало, что водно-этанольные экстракты из листьев и соцветий *A. pilosa* содержат не менее 22 соединений (рис. 1). На основании полученных данных и сопоставления времен удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов со временем удерживания пиков стандартных образцов идентифицированы 5 флавонолов — кемпферол и его гликозиды (астрагалин, кемпферол-3-О-β-рутинозид), гликозиды кверцетина (кверцитрин, гиперозид, рутин), 3 флавона — апигенин и его С-гликозид (витексин), лютеолин-7-глюкозид; 4 фенолокислоты — хлорогеновая, кофейная, ванилиновая и эллаговая. Рутин и эллаговая кислота являются доминирующими компонентами в сумме фенольных соединений, остальные компоненты не идентифицированы, но в процессе хроматографирования в режиме «on-line» были зарегистрированы УФ-спектры некоторых из них. Для не идентифицированных компонентов характерны поглощения в УФ-видимой области спектра, при этом спектр поглощения практически всех соединений содержит две полосы, одна из которых находится в низковолновой (250–290 нм), другая — в длинноволновой области (340–380 нм.). На основании этих данных компоненты отнесены к флавоноидным структурам.

Сравнительный анализ хроматограмм водно-этанольных экстрактов из листьев и соцветий показал, что число компонентов, обнаруженных в экстрактах, неодинаково. В листьях нет апигенина и компонента № 5, а в соцветиях — кверцитрина и компонентов № 4, № 13, № 15 и № 18.

Суммарное содержание идентифицированных ФС в листьях составляет 8,76 мг/г, а в соцветиях — 8,27 мг/г, то есть различия в зависимости от органа растений незначительны. Анализ содержания отдельных компонентов в листьях и соцветиях выявил различия в их накоплении в зависимости от органа растений. Так, в соцветиях преобладают рутин (4,54 мг/г), гиперозид (1,15 мг/г) и соединение № 20 (1,03 мг/г). Содержание эллаговой кислоты почти в два раза выше в соцветиях по сравнению с листьями — 4,12 и 2,26 мг/г, соответственно. Кроме эллаговой кислоты, в листьях содержатся значительные количества соединения № 14 (5 мг/г), гиперозида (1,73 мг/г) и рутина (1,55 мг/г).

По результатам анализа агликонов, образующихся после кислотного гидролиза гликозидов, установлены четыре агликона (два флавонола и 2 флавона) — кверцетин, кемпферол, лютеолин и апигенин, количественно преобладал кверцетин (табл. 1). Следует отметить, что содержание всех агликонов в гидролизатах экстрактов соцветий выше по сравнению с листьями. Кемпферол больше в соцветиях растений в 1,5 раза (1,09 мг/г — в соцветиях и 0,71 мг/г — в листьях), а кверцетин — в 2 раза (2,81 и 1,44 мг/г, соответственно). Содержание в соцветиях

Таблица 2. Содержание флавоноидов и антиоксидантной активности *A. pilosa* по фазам развития (мг/г)

Фаза развития растения	Органы растения	Содержание флавоноидов (%)	ССА (мг/г)
отрастание	соцветия	нет	нет
	листья	1,57	0,28
бутонизация	соцветия	2,61	0,37
	листья	1,68	0,16
цветение	соцветия	4,57	0,70
	листья	2,53	0,38
плодоношение	соцветия	1,70	0,42
	листья	1,26	0,10

тиях и в листьях *A. pilosa* апигенина (0,30 и 0,24 мг/г) и лютеолина (0,21 и 0,15 мг/г) небольшое. В нативных экстрактах (до гидролиза) обнаружены только кемпферол (0,38 и 0,14 мг/г) и апигенин (0,13 и 0,00 мг/г).

Проведены исследования содержания флавоноидов и антиоксидантной активности (суммарного содержания антиоксидантов — ССА) в соцветиях и листьях *A. pilosa* по фазам вегетации. В период отрастания и бутонизации в листьях обнаружено почти равное количество флавоноидов — 1,57% и 1,68%, соответственно. В бутонах их в 1,5 раза больше — 2,61%. Наибольшее содержание флавоноидов отмечено в фазе цветения: в соцветиях — 4,57%, в листьях — 2,53% (табл. 2). В фазе плодоношения происходит уменьшение содержания флавоноидов — в 2,7 раз в соцветиях и в 2 раза в листьях. Суммарное содержание антиоксидантов значительно варьирует. Более высокая антиоксидантная активность на протяжении всего периода вегетации обнаружена в водно-спиртовых экстрактах соцветий *A. pilosa*, по сравнению с листьями. Максимальное значение ее наблюдается в фазе цветения — 0,7 мг/г в соцветиях и 0,38 мг/г в листьях, что согласуется с литературными данным о том, что значительная часть антиоксидантов представлена в растениях многочисленными соединениями фенольной и полифенольной природы. Корреляционный анализ на основе расчета коэффициента корреляции Пирсона между ССА и содержанием флавонолов в листьях и соцветиях показал, что ССА водно-этанольных экстрактов достоверно

положительно связана с содержанием флавонолов ($r = 0,90$).

Закключение

В надземной части репейничка волосистого *A. pilosa*, произрастающего на территории Новосибирской области, методами ВЭЖХ установлено наличие 22 фенольных соединений, из которых 13 идентифицированы. Рутин и эллаговая кислота являются доминирующими компонентами. В состав полифенолов входят также флавонолы кемпферол и его гликозиды астрагалин и кемпферол-3-О-β-рутинозид, гликозиды кверцетина кверцитрин и гиперозид, 3 флавонола — апигенин, его С-гликозид витексин и лютеолин-7-гликозид. Кроме эллаговой, обнаружены хлорогеновая, кофейная и ванилиновая кислоты. По результатам анализа агликонов, образующихся после кислотного гидролиза гликозидов, установлены четыре агликона — кверцетин, кемпферол, лютеолин и апигенин, среди которых преобладал кверцетин.

Наибольшее количество флавоноидов и максимальное суммарное содержание антиоксидантов обнаружено в фазу цветения *A. pilosa*.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами».

ЛИТЕРАТУРА

1. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. / Отв. ред. А. Л. Буданцев. СПб; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. С. 185—186.
2. Ханина М. Г. Фармакогностическое исследование травы репейничка волосистого (*Agrimonia pilosa* Ledeb.): автореф. дис.к.б.н. Самара. 2013. 16 с.
3. Kato H., Li W., Koike M., Wang Y., Koike K. Phenolic glycosides from *Agrimonia pilosa* // *Phytochemistry*. 2010. N. 71 (16). P. 1925—1929.
4. Murayama T., Kishi N., Koshiura R., Takagi K., Furucawa T., Miyamoto K. Agrimoniin, antitumor tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb., induces in interleukin-1 // *Anticancer Res*. 1992. Vol. 12. N. 5. P. 1471—1474.

5. Koshiura R., Miyamoto K., Ikeya Y., Taguchi H. Antitumor activity of methanol extract from roots of *Agrimonia pilosa* Ledeb. // *Jpn. J. Pharmacol.* 1985. N. 38 (1). P. 9—16.
6. Wang J.P., Hsu M. F., Teng C. M. Antihemostatic effect of Hsien-Ho-T'sao (*Agrimonia pilosa*) // *Am. J. Chin. Med.* 1984. Vol. 12. N. 1—4. P. 116—123.
7. Высочина Г. И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск: Наука, 2004. 240 с.
8. Верниковская Н. А. Хроматографическое определение фенольных соединений и флавоноидов: автореф. дис. канд. хим. наук. Краснодар. 2011. С. 24.
9. Van Beek T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts // *J. Chromat. A.* 2002. V. 967. N. 1. P. 21—35.
10. Беликов В.В., Шрайбер М. С. Методы анализа флавоноидных соединений // *Фармация.* 1970. Т. 19. № 1. С. 66—72.
11. Яшин Я.И., Рыжнев В. Ю., Яшин А. Я., Черноусова Н. И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М.: Транс Лит, 2009. 212 с.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: ИД «Практика», 1998. 459 с.

© Шалдаева Татьяна Михайловна (tshaldaeva@yandex.ru),

Костикова Вера Андреевна (serebryakova-va@yandex.ru), Высочина Г.И (ysochina_galina@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Центральный сибирский ботанический сад