

## Исследование фенольных соединений хвоща лесного (*Equisetum sylvaticum* L.)

Бондарчук Р.А.<sup>1</sup>, Коломиец Н.Э.<sup>2</sup>

## Research of phenolic compound of a horsetail wood (*Equisetum sylvaticum* L.)

Bondarchuk R.A., Kolomiets N.E.

<sup>1</sup> 628-й Центр обеспечения медицинской и военной техникой Министерства обороны Российской Федерации, г. Киров

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Бондарчук Р.А., Коломиец Н.Э.

Представлены результаты исследования фенольных соединений надземной части хвоща лесного, произрастающего в Томской и Кировской областях. Содержание флавоноидов и фенолоксилов определяли спектрофотометрическим методом. Качественный состав фенольных соединений изучали хроматографически. Установлено, что сибирские образцы имеют более разнообразный состав флавоноидов и фенолоксилов. Определены девять константных фенольных соединений для хвоща лесного.

**Ключевые слова:** хвощ лесной, фенольные соединения, флавоноиды, фенолоксиловы, 5-флавоногликозиды.

The results of research of phenolic compounds in an elevated part of a horsetail wood, growing in Tomsk and Kirov Regions are presented. The quantitative estimation of flavonoids and phenolic acidsspent of spectrophotometric method. Qualitative structure of phenolic compoundsstudied by chromatography. It is established that the Siberian samples have more various structure flavonoids and phenolic acids. Nine constant substances for samples of a horsetail wood in independence of a growth place are defined.

**Key words:** horsetail wood, phenolic compounds, flavonoids, phenolic acids, 5-flavone-glycosides.

УДК 615.322:582.374.2:547.9:547.565.6

### Введение

Расширение сырьевой базы лекарственного растительного сырья является актуальной задачей. Ее решение возможно за счет введения в медицинскую практику систематически близких видов. С одной стороны, это позволяет расширить сырьевую базу официального растительного сырья и сохранять запасы дикорастущих видов, с другой стороны — решить задачу расширения ассортимента применяемых в медицинской практике лекарственных растений. С этой точки зрения заслуживают внимания растения рода хвощ. В медицинской практике в настоящее время используется только один вид хвоща — хвощ полевой (*Equisetum arvense* L.), все другие хвощи рассматриваются как примеси к официальному виду. Проведенное исследование хвощей флоры Сибири показало, что они представляют интерес для получения лекарственных средств различного

фармакологического действия: антибактериального, противогрибкового, гепатопротекторного, противовоспалительного, антимуутагенного [1, 3, 5]. Полученные данные явились основанием для более детального исследования химического состава перспективных видов рода хвощ, в частности хвоща лесного (*Equisetum sylvaticum* L.).

Хвощ лесной применяется в народной медицине разных стран для лечения заболеваний гепатобилиарной системы; входит в состав биологически активных добавок; используется в парфюмерно-косметических средствах [4]. Перспективность исследования хвоща лесного подтверждается его широким распространением на всей территории Российской Федерации и достаточной сырьевой базой [4, 6].

Цель данного исследования — хроматографическое изучение фенольных соединений и оценка их количественного содержания в надземной части хвоща лесного.

## Материал и методы

В качестве объектов исследования использовали образцы надземной части хвоща лесного *Equisetum sylvaticum* L., собранные в течение всего вегетационного периода 2009 г. в Томской и Кировской областях.

Сумму флавоноидов и сумму фенолокислот в надземной части хвоща лесного определяли спектрофотометрическим методом [2, 7, 8]. Анализ фенольных соединений проводили методами избирательной жидкостной экстракции, хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента, ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии [2, 7, 8].

Для хроматографического исследования фенольных соединений использовали извлечения, полученные из сырья экстракцией 70%-м этанолом на водяной бане при температуре 60–70 °С (соотношение сырья и экстрагента 1 : 10) и сгущенные под вакуумом.

Извлечения хроматографировали на бумаге марки FN-3, FN-12 (Германия), на пластинах на алюминиевой подложке MerckKGA (Германия) Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; на пластинах аналитических на полимерной и алюминиевой подложке «Сорбфил» (ЗАО «Сорбполимер», Россия).

В качестве растворителей для хроматографии на бумаге использовали: 2, 15, 60%-й растворы кислоты уксусной; н-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 2; 4 : 1 : 5); кислота уксусная—кислота хлористоводородная—вода (10 : 3 : 10). Хроматографию в тонком слое сорбента проводили в системах: хлороформ—этанол (10 : 1); хлороформ—кислота уксусная (9 : 1); хлороформ—метанол (3 : 1; 9 : 1).

Детектирование фенольных соединений выполняли в УФ-свете до и после проявления хроматограмм соответствующими реагентами (спиртовые растворы алюминия хлорида и натрия гидроксида, раствор аммиака, диазореактив Паули) при  $\lambda=254\text{--}365$  нм.

Идентификацию веществ при наложении пятен проводили методом препаративной хроматографии на бумаге. Индивидуальность всех идентифицированных веществ подтверждали методом двумерной хроматографии на бумаге.

Для установления природы флавоноидных гликозидов проводили их кислотный гидролиз. Для этого с хроматограммы вырезали неразделяющиеся пятна темно-коричневой флюоресценции, измельчали, заливали 8%-й кислотой хлористоводородной и нагревали на водяной бане. Ход гидролиза контролировали с помощью хроматографии на бумаге в системе раствори-

телей: н-бутанол—кислота уксусная—вода (4 : 1 : 2) и системе Форесталя (кислота уксусная—кислота хлористоводородная—вода (30 : 3 : 10)). Для идентификации агликонов флавоноидов, элюированных с хроматограмм до и после гидролиза, использовали характер свечения в УФ-свете, величины R<sub>f</sub>, окраску пятен на хроматограммах после проявления парами аммиака и раствором алюминия хлорида в сравнении с достоверными образцами и данными литературы. Углеводы, образующиеся в результате гидролиза флавоноидных гликозидов, анализировали методом хроматографии на бумаге в системе растворителей ацетон—бутанол—кислота уксусная—вода (7 : 2 : 2 : 2). Детектирование углеводов проводили бутанольным раствором анилинфталата с последующим прогреванием хроматограмм в сушильном шкафу при температуре 105 °С до проявления пятен. Идентификацию проводили с использованием достоверных образцов углеводов.

Электронные спектры в УФ и видимой областях снимали на приборе СФ-2000 в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Для идентификации углеводов, фенолокислот и флавоноидов были использованы известные образцы индивидуальных веществ производства Sigma-Aldrich, Fluka (США).

## Результаты

Проведенные исследования показали, что в надземной части хвоща лесного, собранной как в Томской, так и в Кировской областях, содержание флавоноидов составляет 0,91–1,03%; фенолокислот — 0,50–0,59%.

По результатам хроматографического анализа спиртовых экстрактов хвоща лесного было установлено, что данный вид, произрастающий в Томской области, содержит не менее 15 веществ фенольной природы, а в европейской части России (Кировская область) — не менее 10 веществ. Результаты анализа фенольных соединений хвоща лесного методами хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента представлены в таблице. При детектировании хроматограмм в УФ-свете несколько зон адсорбции имели темно-желтую, темную или коричневую окраску, что характерно для гликозидов производных флавонов и флавонолов; пять веществ проявлялись в виде зон адсорбции с голубой, фиолетовой и сине-фиолетовой флюоресценцией — подобную окраску могут давать кумарины, фенолкарбоновые кислоты (ФКК) и некоторые флавоноиды (изофлавоны, флаван-5-гликозиды).

Результаты хроматографического исследования фенольных соединений хвоща лесного

Номер пятна	Значение R <sub>f</sub>				Окраска пятен			<i>E. sylvaticum</i>		Предполагаемое вещество
	БУВ (4 : 1 : 5)	15% CH <sub>3</sub> COOH	2% CH <sub>3</sub> COOH	Хлороформ-метанол 3 : 1	УФ	УФ + AlCl <sub>3</sub>	Диазореактив Паули	Томская область	Кировская область	
1	0,72	0,43	0,23		коричн.	темн./желт.		+	+	Гликозид кемпферола
2	0,58	0,32	0,18		желт./коричн.	желт.		+	+	Гликозид кверцетина
3	0,52		0,58	0,03	коричн.	желт./бур.		+	+	Кемпферол-софорозид
4	0,60	0,57	0,37		коричн.	темн./желт.		+	+	Кемпферол-рутинозид
5	0,52	0,67	0,48		сл./желт.	желт.		+	—	Кемпферол-глюкозид-рамнозид
6	0,45	0,51	0,32		коричн.	желт.		+	—	Кверцетин-рутинозид
7	0,42	0,49	0,25		коричн.	желт.		+	+	Кверцетин-диглюкозид
8	0,30	0,63	0,48		тем./желт.	желт.		+	+	Кемпферол-диглюкозид
9	0,41	0,57	0,37		коричн.	желт./бур.		+	—	Кверцетин-глюкозид-рамнозид
10	0,28	0,67	0,51		темная	желт./бур.		+	—	Кверцетин-рутинозид-рамнозид
11	0,15	0,67			коричн.	желт./бур.		+	—	Кемпферол-рутинозид-глюкозид
12	0,91	0,68	0,87		б/цв		роз./красн.	сл.	—	п-Оксибензойная кислота
13	0,71	0,40	0,74	0,80	син./фиол.		красн./коричн.	+	+	Протокатеховая кислота
14	0,89		0,47		фиол.		оранж.	+	+	п-Кумаровая кислота
15	0,80	0,35	0,30		голуб.		коричн.	+	+	Кофейная кислота

Примечание. «+» — вещество присутствует; «—» — вещество не обнаружено; сл. — следы. Флюоресценция: коричн. — коричневая; голуб. — голубая; темн./желт. — темно-желтая; син./фиол. — сине-фиолетовая; желт. — желтая; желт./бур. — желто-бурая; сл./желт. — слабо-желтая; желт./коричн. — желто-коричневая; роз./красн. — розово-красная; оранже. — оранжевая.

Для уточнения природы фенольных соединений пятна с хроматограмм вырезали, элюировали спиртом, фильтровали через стеклянный фильтр и снимали их электронный спектр. Полученные для разных пятен УФ-спектры представлены тремя основными типами по максимумам поглощения, характерными для фенолкарбоновых (ванилиновая, протокатеховая 235—270 и 290—305 нм) и гидроксикоричных кислот (кофейная, феруловая и других 230—240 и 290—320 нм), флавоноидов (флавонолов — кверцетина и кемпферола 250—270 и 352—390 нм). Следовательно, основными веществами исследуемого вида могут являться производные этих классов соединений. Вещества на хроматограммах, имеющие в УФ-свете темную, коричневую, слабо-желтую и темно-желтую флюоресценцию, отнесены к флавоноидам. После обработки хроматограмм 2%-м спиртовым раствором алюминия хлорида эти пятна приобретали окраску, характерную для гликозидированных флавонолов. Для установления их природы прово-

дили кислотный гидролиз. По хроматографическому поведению в сравнении с достоверными образцами и данными литературы агликоны флавоноидов идентифицированы как кверцетин и кемпферол. Углеводы, образующиеся в результате гидролиза флавоноидных гликозидов, идентифицированы как D-глюкоза и L-рамноза.

По характерной окраске пятен в УФ и видимом свете, значениям R<sub>f</sub> в сравнении с известными веществами в исследуемых образцах были идентифицированы кофейная, п-кумаровая, п-оксибензойная, ванилиновая и протокатеховая кислоты.

При дополнительном хроматографическом исследовании фенольных соединений в тонком слое сорбента (ТСХ) было подтверждено наличие некоторых флавоноидов и фенолокислот, а также установлено, что в хвоще лесном отсутствуют зоны адсорбции с ярко-голубой окраской, относящихся к 5-гидрокси-флавонам — веществам-маркерам, характерным для хвоща полевого.

## Обсуждение

Сравнительная оценка результатов количественного содержания флавоноидов и фенолокислот в образцах из разных регионов показывает, что место сбора сырья на их содержание практически не влияет. Это несколько противоречит данным литературы, согласно которым эколого-географический фактор оказывает существенное влияние на содержание биологически активных веществ даже в пределах одного вида [6].

В данном исследовании впервые определены константные фенольные вещества для хвоща лесного, произрастающего в разных регионах России. К ним отнесены моногликозиды кемпферола и кверцетина, по два дигликозида кемпферола и кверцетина, протокатеховая, кофейная и п-кумаровая кислоты. При этом более разнообразен состав ди- и тригликозидов кверцетина и кемпферола, а также фенолокислот зафиксирован в образцах хвоща лесного из Сибири. Аналогичный факт отмечен ранее для официального вида хвоща полевого. Так, было установлено отличие сибирских образцов хвоща полевого от европейских наличием 5-О-β-D-глюкопиранозидом лютеолина, что, вероятно, связано с эколого-географическим фактором, приводящим к образованию хемотипов [4]. Данное обстоятельство было учтено в новой фармакопейной статье «Хвоща полевого трава» 42-0209-07 при разработке методики определения подлинности сырья методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Для подтверждения полученных данных и более детального изучения химического состава фенольных соединений хвоща лесного в дальнейшем будет исполь-

зован метод высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

## Выводы

1. Установлено, что в надземной части хвоща лесного, собранной как в Томской, так и в Кировской областях, содержание флавоноидов составляет 0,91—1,03%; фенолокислот — 0,50—0,59%.

2. Константными фенольными веществами для хвоща лесного, произрастающего в разных регионах России, являются моно- и дигликозиды кемпферола и кверцетина, протокатеховая, кофейная и п-кумаровая кислоты.

## Литература

1. Дмитрук С.Е., Коломиец Н.Э., Дмитрук В.С., Мальцева О.А. Грибковые заболевания и альтернативные возможности фитотерапии // Бюл. СО РАМН. 2001. № 3. С. 9—14.
2. Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина А.С. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования). Алма-Ата: Наука, 1978. 220 с.
3. Коломиец Н.Э., Ефимов С.Н. Антимутагенные свойства растений рода хвощ // Фармация. 2005. № 5. С. 31—32.
4. Коломиец Н.Э., Калинин Г.И. Растения рода хвощ (*Equisetum* L.). Систематика, химический состав, перспективы использования в медицине. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2009. 88 с.
5. Коломиец Н.Э., Михалева Л.К., Шейкин В.В. Изучение гепатопротекторных свойств хвоща полевого // Фармация. 2005. № 4. С. 38—40.
6. Флора Сибири *Lycopodiaceae-Hydrocharitaceae* / сост. Кашина Л.И., Красноборов И.М., Шауло Д.Н и др. Новосибирск: Наука, 1988. 200 с.
7. Harborne J.V. Comparative biochemistry of the flavonoids. London; New York, 1967. 383 p.
8. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. The systematic identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

Поступила в редакцию 10.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

## Сведения об авторах

Р.А. Бондарчук — заместитель начальника 628-го Центра обеспечения медицинской и военной техникой МО РФ (г. Киров).

Н.Э. Коломиец — д-р фарм. наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ (г. Томск).

## Для корреспонденции

Коломиец Наталья Эдуардовна, тел. 8-960-973-2038; e-mail: borkol47@mail.ru