

УДК 615:322:547.56:577.114

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ПОЛИСАХАРИДЫ ФИАЛКИ СОБАЧЬЕЙ

© 2004 г. Р.А. Бубенчиков

Курский государственный медицинский университет

В статье приведены результаты исследования фенольных соединений и полисахаридов надземной части *Viola canina* L. методами бумажной хроматографии, тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ. В исследуемом виде обнаружено 43 вещества фенольной природы, которые в основном представлены флавоноидами, кумаринами, фенолкарбонowymi кислотами. Фенольные соединения в фиалке собачьей идентифицированы впервые. Установлено, что углеводный комплекс надземной части *Viola canina* L. представлен водорастворимыми полисахаридами, пектиновыми веществами, гемицеллюлозами; установлен их моносахаридный состав. Полисахаридный состав травы фиалки собачьей выделен и исследован впервые.

Растения рода Фиалка во флоре Центрального Черноземья представлены 20 видами [4]. Из них наибольшее распространение имеют фиалка полевая, фиалка собачья, фиалка опушенная, фиалка удивительная [4].

Химический состав их практически не изучен, в той или степени он изучен только у фиалки полевой [8].

Основными группами биологически активных веществ растений рода фиалка являются фенольные соединения и полисахариды, обладающие разносторонней биологической активностью. Полисахариды оказывают отхаркивающее, противовоспалительное, противоязвенное действие. Фенольные соединения проявляют противовоспалительную, антиоксидантную, ранозаживляющую активность. Химический состав фиалки собачьей практически не изучен.

Целью нашей работы было изучение фенольного и полисахаридного состава фиалки собачьей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила воздушно-сухая измельченная надземная часть фиалки собачьей, заготовленная в 2001-2003 гг. в Курской области (окр. г. Курска, ур. Знаменская роща; заповедник “Стрелецкая степь”) в период массового цветения растений.

Для выделения полифенольных соединений воздушно-сухое сырье фиалки собачьей измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. 100 г сырья экстрагировали 70% спиртом этиловым при соотношении сырье-экстрагент (1:5) путем нагревания на кипящей водяной бане в колбе с обратным холодильником до полного истощения сырья. Объединенные извлечения упаривали под вакуумом до водного остатка, охлаждали, фильтровали (для отделения хлорофилла и смол).

Фильтрат использовали для последовательной жидкостной экстракции органическими растворителями: хлороформом, этилацетатом, бутанолом. Водный остаток спирто-водного извлечения обрабатывали 7-8 раз в делительной воронке равным объемом хлороформа. Объединенные хлороформные извлечения упаривали (хлороформная фракция). Водные остатки после экстракции хлороформом нагревали на водяной бане для удаления хлороформа, охлаждали и обрабатывали этилацетатом. Аналогично получали этилацетатную и бутанольную фракции.

Для обнаружения фенольных соединений анализировали хлороформную, этилацетатную, бутанольную фракции, а также водный остаток с помощью качественных реакций и хроматографическими методами.

Обнаружение кумаринов проводили в хлороформных фракциях спирто-водных извлечений методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Силуфол” с использованием в качестве подвижной фазы системы растворителей: бензол-этилацетат (2:1). Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки их специфическими реактивами (пары аммиака, 10% раствор калия гидроксида в спирте этиловом) [5].

Наличие флавоноидов определяли в этилацетатных фракциях и водном остатке извлечения из травы фиалки опушенной с помощью характерных качественных реакций (цианидиновой пробы и цианидиновой пробы по Брианту, с 2% раствором алюминия хлорида, с 10% раствором натрия гидроксида) [2,12,13]. Положительные реакции свидетельствуют о присутствии флавоноидов в исследуемом сырье.

Для обнаружения фенолкарбонowych кислот использовали этилацетатную фракцию. Определение проводили путем хроматографирования на бумаге

восходящим способом в системе растворителей: 2% раствор кислоты уксусной. Хроматограммы обрабатывали специфическими реактивами: парами аммиака, 1% спиртовым раствором хлорида окисного железа, диазотированным п-нитроанилином [1, 10].

Также нами была использована хроматография на бумаге в системах растворителей: 15% раствор кислоты уксусной, бензол-этилацетат-уксусная кислота (50:50:1) с использованием для проявления специфических реактивов (пары аммиака, 10% раствор натрия гидроксида в спирте этиловом, 2% раствор циркония хлорокси в спирте метиловом) [10]. Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами.

Для детального изучения компонентного состава фенольных соединений надземной части фиалки собачьей применяли метод ВЭЖХ. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы "GILSTON" (Франция) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы "МультиХром для Windows". В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 4.6x250 мм PLATINUM EPS C 18 100 А. В качестве подвижной фазы использовали смесь: ацетонитрил-вода-концентрированная фосфорная кислота в соотношении 400:600:5. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0.8 мл/мин. Продолжительность анализа 109.22 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм.

Для исследования надземную часть фиалки собачьей измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм по ГОСТ 214-83. 10,0 г сырья помещали в колбу объемом 250 мл, прибавляли 50 мл 70% спирта этилового, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов с момента закипания спирто-водной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем 70% спиртом этиловым до метки (исследуемый раствор). Параллельно готовили серию 0.05% растворов сравнения флавоноидных соединений, кумаринов и фенолкарбоновых кислот в спирте метиловом. Объем вводимой пробы элюата и растворов сравнения 1 мкл. Идентификацию проводили путем сопоставления времен удерживания компонентов смеси и растворов сравнения.

Из шрота, оставшегося после получения полифенольных соединений, последовательно выделяли полисахариды: водорастворимые полисахаридные комплексы, затем пектиновые вещества и гемицеллюлозы (ГЦ А, ГЦ Б).

Для получения водорастворимых полисахаридных комплексов (ВРПС) использовали воздушно-сухой шрот сырья после экстракции полифенольных соединений 70% спиртом этиловым [3]. 200 г воздушно-сухого шрота экстрагировали 4 л горячей воды при нагревании до 95°C в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Повторное извлечение полисахаридов проводили дважды при соотношении сырье-экстрагент 1:10. Растительный материал отделяли центрифугированием, а объединенные экстракты упаривали до 1/5 первоначального объема. Полисахариды осаждали трехкратным (по отношению к извлечению) объемом 96% спирта этилового при комнатной температуре. Выпавшие плотные осадки отфильтровывали, промывали спиртом этиловым, ацетоном, затем высушивали и взвешивали.

Из шрота, оставшегося после получения ВРПС, выделяли пектиновые вещества (ПВ). Экстракцию сырья проводили трехкратно смесью 0.5% растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) в соотношении 1:20 при 80-85°C в течение 2 часов. Объединенные экстракты концентрировали и осаждали пятикратным объемом 96% спирта этилового. Полученные осадки отфильтровывали, промывали спиртом этиловым, высушивали и взвешивали.

Из шрота, оставшегося после выделения пектиновых веществ, выделили гемицеллюлозы А и Б (ГЦ А и ГЦ Б). Экстракцию проводили 10% раствором натрия гидроксида в соотношении 1:5 при комнатной температуре в течение 12 часов. При добавлении ледяной уксусной кислоты образовался осадок ГЦ А, который отфильтровывали, высушивали и взвешивали. К фильтрату добавляли двукратный объем 96% спирта этилового, при этом образовывался осадок ГЦ Б, который промывали спиртом, высушивали и взвешивали [6].

Для установления моносахаридного состава ВРПС, ПВ, ГЦ проводили их гидролиз серной кислотой (1 моль/л) [9].

Моносахариды определяли в гидролизатах методом хроматографии на бумаге в системах растворителей: н.бутанол-пиридин-вода (6:4:3) и этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (18:3:1:4) параллельно с достоверными образцами моносахаридов. Хроматограммы после высушивания на воздухе, обрабатывали анилинфталатным реактивом и нагревали в сушильном шкафу при 100-105°C; моносахариды проявлялись в виде красновато-коричневых пятен.

Определение количественного содержания сахаров в гидролизатах выделенных ВРПС и ПВ проводили денситометрически после хроматографии в тонком слое сорбента [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате хроматографического анализа в надземной части фиалки собачьей обнаружено 4 соединения в виде пятен с голубой флуоресценцией, отнесенные к соединениям кумариновой природы, 5 веществ в виде пятен с голубой и голубовато-фиолетовой флуоресценцией в УФ-свете, отнесенные к фенолкарбонным кислотам, 12 веществ в виде пятен с желтой и темной флуоресценцией, отнесенные к флавоноидным соединениям.

В траве фиалки собачьей методом ВЭЖХ было установлено наличие 43 соединений фенольной природы, которые в основном представлены флавоноидами, кумаринами и фенолкарбонными кислотами. По времени удерживания стандартных растворов 15 веществ были идентифицированы как лютеолин, апигенин, кверцетин, феруловая кислота, витексин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, 4-оксикумарин, скополетин, рутин, робинин, гиперозид, гесперидин, эллаговая кислота, арбутин (табл. 1). Методом внутренней нормализации определено, что среди кислот преобладает феруловая кислота, среди флавоноидов – рутин, из кумаринов – 4-оксикумарин.

В траве фиалки собачьей все фенольные соединения: лютеолин, апигенин, кверцетин, феруловая кислота, витексин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, 4-оксикумарин, скополетин, рутин, робинин, гиперозид, гесперидин, эллаговая кислота, арбутин идентифицированы впервые.

В результате проведенных исследований были выделены ВРПС, ПВ, ГЦ А, ГЦ Б. Выход ВРПС со-

ставил 10,7%, ПВ – 16,8 %, ГЦ А – 4,2%, ГЦ Б – 4,7% от воздушно-сухого сырья (табл. 2).

ВРПС, выделенный из изучаемого растения, представляет собой аморфный порошок коричневого цвета; при растворении в воде образует опалесцирующий раствор (рН 1% водного раствора находится в пределах 5-6); растворяется также в водных растворах кислот и щелочей и не растворяется в органических растворителях. Полисахаридный комплекс дает положительные реакции осаждения со спиртом, ацетоном, реакцию с реактивом Фелинга после кислотного расщепления полисахаридов [9].

ПВ из исследуемого растения представляет собой аморфный порошок светло-серого цвета, хорошо растворим в воде с образованием вязких растворов (рН 1% водного раствора находится в пределах 3-4). Водный раствор пектиновых веществ осаждается 1% раствором алюминия сульфата с образованием пектатов [7].

Методом хроматографии на бумаге параллельно с достоверными образцами сахаров в исследуемом ВРПС идентифицировали глюкозу, галактозу, арабинозу, рамнозу, ксилозу и глюкуроновую кислоту. В выделенных ПВ преобладающей является галактуроновая кислота (87,15%), кроме того, в них обнаружены и нейтральные моносахариды – галактоза, арабиноза, рамноза (табл. 2).

Гемиллюлозы (ГЦ А и ГЦ Б) представляют собой аморфные порошки желтовато-коричневого цвета. В гидролизате ГЦ А и ГЦ Б обнаружены ксилоза, рамноза, арабиноза, глюкоза и галактоза. По величине пятен и интенсивности их окраски преобла-

Таблица 1

Характеристика веществ, выделенных из травы фиалки собачьей

Вещество	Время удерживания, сек.	Количественное соотношение, %
Лютеолин	0,15	0,01
Арбутин	70,52	5,94
Феруловая кислота	127,34	10,73
Хлорогеновая кислота	36,63	3,09
Кофейная кислота	44,07	3,71
Эллаговая кислота	0,43	0,04
Витексин	96,12	8,10
Апигенин	63,05	5,31
Гиперозид	50,90	4,29
4-оксикумарин	109,44	9,22
Гесперидин	74,38	6,27
Кверцетин	0,15	0,01
Рутин	382,28	32,22
Робинин	0,40	0,03
Скополетин	2,39	0,20

Характеристика полисахаридов, выделенных из травы фиалки собачьей

Полисахариды	Выход, % от воздушно-сухого Сырья	Моносахаридный состав, % к полисахаридному комплексу						
		Глюкоза	Галактоза	Ксилоза	Арабиноза	Рамноза	Галактуроновая кислота	Глюкуроновая кислота
ВРПС	10,7	8,35	27,68	0,49	29,71	2,14	-	8,34
ПВ	16,8	-	3,05	-	2,83	0,11	87,15	-
ГЦ А	4,2	+	+	+	+	+	-	-
ГЦ Б	4,7	+	+	+	+	+	-	-

Примечание: “+” – присутствие моносахарида; “-” – отсутствие моносахарида.

дающим моносахаридом является ксилоза, что указывает на наличие полисахаридов типа ксиланов.

ВЫВОДЫ

1. Изучен компонентный состав фенольных соединений в траве фиалки собачьей *Viola canina L.* методами бумажной хроматографии, ТСХ и ВЭЖХ.

2. Методом ВЭЖХ обнаружено 43 вещества фенольной природы, которые в основном представлены флавоноидами, кумаринами и фенолкарбоновыми кислотами. Из них 15 веществ были идентифицированы как лютеолин, апигенин, кверцетин, феруловая кислота, витексин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, 4-оксикумарин, скополетин, рутин, робинин, гиперозид, гесперидин, эллаговая кислота, арбутин. Все указанные соединения в траве фиалки собачьей обнаружены впервые.

3. Установлено, что в траве фиалки собачьей среди кислот преобладают феруловая кислота, среди флавоноидов – рутин, из кумаринов – 4-оксикумарин.

4. Выделены полисахариды из травы фиалки собачьей. Установлено, что углеводный комплекс данного растения представлен ВРПС, ПВ, ГЦ; установлен их моносахаридный состав. Полисахариды из травы фиалки собачьей выделены и исследованы впервые.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бандюкова В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды // Химия природ. соединен. 1983. – №3. – С. 263-273.

2. Бандюкова В.А., Шинкаренко А.А., Казаков А.Л. Методы исследования природных флавоноидов. Пятигорск, 1977. – 72 с.

3. Бубенчикова В.Н. Фармакогностическое изучение некоторых видов семейства Астровых и перспектива их практического использования Автореф. ... дис. д-ра фармац. наук. Пятигорск, 1993. – 40 с.

4. Камышев Н.С. Флора Центрального Черноземья и ее анализ. Воронеж, 1978. – 116 с.

5. Королев В.А. Фармакогностическое изучение представителей рода Донник: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. Пермь, 1996. – 26 с.

6. Кочетков Н.К. Химия биологически активных природных соединений. М., 1970. – 378 с.

7. Лигай Л.В., Рахимов Д.А., Бандюкова В.А. Изучение углеводов *Malva neglecta L.* // Химия природ. соединен. 1989. №2. – С. 280-281.

8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Raeoniaceae – Thymelaeaceae*. Л., 1985. – 336 с.

9. Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов / Полисахариды /. М., 1978. – 256 с.

10. Хроматография на бумаге / Под ред. И.М. Хайца, К. Мацека. М., 1962. – 851 с.

11. Филиппов М.П. Колориметрическое определение уронидной части в пектиновых веществах // Изв. АН МССР: Сер. биол. и хим. наук. 1973. №3. С. 76-79.

12. Briant E.T. // J. Amer. Pharm. Assoc. 1950. Vol. 39, №8. P. 480-488.

13. Geissman T.A. Chemistry of flavonoid compounds. Oxford, 1962.