

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФЛАВОНОИДОВ МАНЖЕТКИ ПРЯМОВОЛОСОЙ (*ALCHEMILLA ORTOTRICHA* ROTHM.)

И. И. Бочкарева, В. В. Артемьева, И. Н. Дьякова

ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»

Поступила в редакцию 19.09.2016 г.

Аннотация. В работе представлены результаты качественного анализа флавоноидов манжетки прямоволосой. При исследовании сырья манжетки прямоволосой (травы и корневища с корнями) выявлены основные классы изучаемых соединений (флавонолы и флавонол-3-гликозиды, производные катехинов), и индивидуальные вещества - кверцетин и рутин.

Ключевые слова: качественный анализ, флавоноиды, род *Alchemilla* L., манжетка прямоволосая.

Abstract. The article presents the results of the qualitative analysis of the flavonoids of *Alchemilla ortotricha* Rothm. The analysis of the herbal raw materials of *Alchemilla ortotricha* Rothm. (the herb and rhizomes with roots) has identified the basic classes of the studied compounds (flavonols and flavonol-3-glycosides, derivatives of catechins), and individual substances – quercetin and rutinum.

Keywords: qualitative analysis, flavonoids, genus *Alchemilla* L., *Alchemilla ortotricha*.

Целебное действие лекарственных растений обусловлено присутствием в них биологически активных веществ (алкалоиды, изопреноиды и фенольные соединения, в том числе флавоноиды), относящихся к продуктам вторичного обмена [1].

Флавоноиды – природные кислородсодержащие гетероциклические соединения, широко распространенные в высших растениях и обладающие разносторонним фармакологическим спектром действия. К семействам, наиболее богатым данными веществами относят бобовые, астровые, сельдерейные, яснотковые, розоцветные [2].

Представители указанных семейств являются основой лекарственной флоры Северо-Западного Кавказа, включающего большую часть Краснодарского края и Республики Адыгея. Особый интерес в качестве источников указанной группы соединений представляют растения семейства Rosaceae (Розоцветные). К семейству Rosaceae относится род *Alchemilla* L.

Род манжетка (*Alchemilla* L.) включает в себя более 1000 видов встречающихся по всему земному шару. Род изучали и описывали в монографиях многие ученые: Р. Бузер (Швейцария), С.В. Юзепчук (Россия), Б. Павловски (Польша), В. Ротмалер (Германия), Г. Самуэльсон (Швеция) [3].

Виды манжеток содержат богатый комплекс биологически активных веществ (БАВ), среди которых преобладают полифенольные соединения.

Наиболее изученными в фармакогностическом отношении являются манжетка обыкновенная, манжетка тринадцатиллопастная [4, 5, 6, 7]. Установлено, что в них содержится вещества фенольной природы (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, дубильные вещества), полисахариды, аминокислоты. Среди флавоноидов идентифицированы: кверцетин, апигенин, лютеолин, рутин, апигенин-7-глюкозид, лютеолин-7-глюкозид [5, 6].

Некоторые виды рода Манжетка входят в фармакопеи Болгарии, Югославии, Франции, Германии и Британской травяной фармакопеи [4].

Манжетка прямоволосая - *Alchemilla ortotricha* Rothm. – один из Северо-Кавказских видов рода манжетка – *Alchemilla* L., семейства Розоцветные. В литературе отсутствуют фармакогностическое описание манжетки прямоволосой.

Цель исследования – изучение качественного состава флавоноидов манжетки прямоволосой для установления перспектив ее использования в фармации.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования - высушенные воздушно-теневым способом образцы цельного сырья (травы и корневища с корнями) манжетки прямоволосой (*Alchemilla ortotricha* Rothm.), собранные в период второго цветения в конце августа 2015 г с субальпийского увлажненного луга Лаго-Накского нагорья Северо-Западного Кавказа на высоте 1600 м над уровнем моря.

Для осуществления качественных реакций на флавоноиды проводили их извлечение из травы и корневищ с корнями манжетки по следующей методике: 2 г сухого измельченного сырья (0,3 мм) предварительно обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение часа для удаления пигментов. Смесь фильтровали, хлороформ испаряли на водяной бане. Обработанную навеску помещали в колбу вместимостью 100 мл со шлифом и заливали 20 мл 70% этанола. Колбу соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения жидкость фильтровали [8]. С извлечением проводили качественные реакции на флавоноиды: цианидиновую реакцию, борно-лимонную реакцию, реакции с раствором щелочи, реакцию Вильсона, со спиртовым раствором $AlCl_3$, с раствором железа хлорного, с раствором ацетата свинца основным, раствором ванилина в серной кислоте, реакцию азосочетания.

Хроматографические методы анализа использовались для разделения и идентификации индивидуальных флавоноидов из исходных и гидролизованных в 10% растворе H_2SO_4 извлечений. Полученное описанным выше способом спирто-водное извлечение из сырья разделяли на фракции методом избирательной экстракции. Извлечение упаривали досуха, разбавляли горячей водой, фильтровали и дополнительно удаляли липофильные вещества (жирные масла, смолы, хлорофилл) из водной фазы делительной воронки дихлорэтаном. Затем из водной фазы последовательно извлекали агликоны флавоноидов – диэ-

тиловым эфиром, монозиды – этилацетатом, биозиды – н-бутанолом. Обработка растворителями осуществлялась дважды. Растворители отгоняли на водяной бане, сухие остатки растворяли в 96% этиловом спирте [5]. Водный остаток после экстракции также высушивали, растворяли в этиловом спирте и использовали все спиртовые растворы для дальнейшего качественного анализа. Подбор системы растворителей для тонкослойной хроматографии осуществлялся на основе литературных и опытных данных пробных экспериментов с учетом лучшего разделения сумм флавоноидов, четкости пятен индивидуальных веществ [9]. Хроматографирование проводили восходящим способом в следующих условиях: хроматографическая камера, хроматографическая пластинка «Сорбфил», система растворителей н-бутанол-ЛУК-вода (4:1:1), СО рутина и кверцетина, обработка высушенной хроматограммы 5% спиртовым раствором алюминия хлорида при нагревании до 105°C. Просматривали хроматограммы в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм до и после обработки реактивом.

Метод прямой УФ спектрофотометрии использовался для изучения качественного состава флавоноидов. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 в кюветках с толщиной слоя 10 мм в диапазоне волн от 200 до 450 нм. Растворами сравнения служили СО рутина и кверцетина в аналогичных условиях.

Работа проводилась на базе фармацевтического факультета Майкопского Государственного Технологического Университета.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Качественные реакции проводили, используя общепринятые методики [2, 8]. Результаты качественного обнаружения флавоноидов представлены в таблице 1.

В траве манжетки возможно присутствие групп флавоноидов: флавонолы и флавонол-3-гликозиды, флавоноиды, имеющие две оксигруппы в С3 и С5 положениях, 5-оксифлавонолы, флавоноиды с диоксигруппировкой в кольце В, флавоноиды со свободной 7-оксигруппой, гидролизуемые дубильные вещества.

В корневище с корнями манжетки возможно присутствие групп флавоноидов: флавонолы и флавонол-3-гликозиды, флавоноиды, имеющие две оксигруппы в С3 и С5 положениях, вещества с диоксигруппировкой в кольце В, 5-оксифлавонолы, флавоноиды со свободной 7-оксигруппой,

возможно гидролизуемые дубильные вещества и конденсируемые дубильные вещества, производные катехинов и лейкоантоцианидинов.

Проводили хроматографический анализ этанольных растворов фракций агликонов, монозидов, биозидов, водного остатка, а также гидролизованных в 10% растворе H_2SO_4 исходных

извлечений из травы и корневищ с корнями. Наличие веществ флавоноидной природы определяли по характерной окраске пятен в УФ-свете до и после обработки 5% спиртовым раствором алюминия хлорида при длине волны 254 нм и 365 нм (соответственно). Результаты хроматографирования представлены в таблице 2.

Таблица 1

Обнаруженные флавоноидов в извлечениях из травы и корневищ с корнями манжетки прямоволосой

Качественные реакции	Аналитические эффекты реакций (окрашивание или осадок)	
	Трава	Корневище с корнями
Цианидиновая проба	бордово-красное (с магнием), розовое (с цинком), темно-красное (контроль)	оранжево-красное (с магнием), желто-оранжевое (с цинком), темно-красное (контроль)
С раствором натрия гидроксида	желтое, при нагревании переходящее в красно-коричневое	
С алюминия хлоридом	желтое с флуоресценцией, усиливающейся в УФ-свете	светло коричневое
Реакция Вильсона	желтое	
С хлоридом железа (III)	черно-синее	черное-сине-зеленое
С ацетатом свинца основным	желтый аморфный осадок.	
Реакция азосочетания	интенсивно-красное	
С раствором ванилина в серной кислоте	реакция отрицательная	интенсивно-красное

Таблица 2

Результаты хроматографии исследуемых растворов

Исследуемые растворы	Окраска пятен в УФ-свете (характер флуоресценции)		R _f (среднее значение)
	254 нм	365 нм	
СО рутина	коричневая	желтая	0.59
СО кверцетина	желто-коричневая	желто-зеленая	0.88
Трава			
Этанольный экстракт	5-6 пятен пятно коричневое*	желтая	0.57
Раствор после гидролиза	1 пятно слабо желто-коричневое	бледно желто-зеленая	0.88
Агликоны	1-2 пятна пятно слабо желто-коричневое *	бледно желто-зеленая	0.86
Монозиды	4 пятна пятно светло-коричневое	бледно желтая	0.71
Биозиды	1 коричневое пятно* 6 небольших пятен более слабой окраски	желтая бледно желто-зеленая	0.54
Водный остаток	1 коричневое 3-4 небольших	желтая бледно желто-зеленая	0.56
Корневище с корнями			
Этанольный экстракт	5 пятен пятно слабо желто-коричневое *	желто-зеленая	0.85
Раствор после гидролиза	3 пятна пятно слабо желто-коричневое пятно светло-желтое*	желто-зеленая бесцветная	0.87 0.90
Агликоны	2 пятна пятно слабо желто-коричневое *	бледно желто-зеленая	0.86
Монозиды	1 серое пятно 1 небольшое	бледно желтая	0.81
Биозиды	6 пятен, серое пятно*	коричневая	0.80
Водный остаток	отсутствуют	-	-

Примечание: * доминирующее пятно

В результате проведения ТСХ было показана многокомпонентность флавоноидных извлечений и установлено наличие в агликоновых фракциях травы и корневища с корнями, в гидролизном растворе травы и корневища с корнями, этанольном экстракте корневища с корнями кверцетина ($R_f=0.86; 0.88; 0.87; 0.85$ соответственно), во фракции биозидов травы, водном остатке травы, этанольном экстракте травы – рутин ($R_f=0.54; 0.56; 0.57$ соответственно).

В ходе спектрофотометрии определяли собственные максимумы поглощения для исследуемых растворов (таб.3).

Таблица 3
Результаты спектрофотометрии исследуемых растворов

Исследуемые растворы	Максимумы / минимумы поглощения (нм)	
	I полоса (max)	II полоса (max)
СО рутин	360.5	258.1
СО кверцетин	374.9	255.9
Трава		
Этанольное извлечение	361.3	258.1
После гидролиза	370.7	256.9
Агликоны	372.7	256.9
Монозиды	360.2	255.9
Биозиды	360.2	257.1
Водный остаток	359.3	257.1
Корневище с корнями		
Этанольное извлечение	278.9 / 257.6	
После гидролиза	371.3	255.8
Агликоны	373.3	255.8
Монозиды	278.3 / 256.0	
Биозиды	278.9 / 257.0	
Водный остаток	278.0 / 262.0	

Все полученные фракции из травы манжетки прямоволосой дают характерные для флавоноидов I и II полосы поглощения. При этом спектры поглощения соответствуют: в этанольной фракции, фракции биозидов, водном остатке – рутину; во фракции агликонов и после гидролиза – кверцетину. Спектр фракции монозидов предположительно соответствует соединению из класса флавонолов.

Спектры извлечений корневища с корнями (этанольное, монозиды, биозиды, водный остаток) близки к спектрам полиоксифенолов (лейкоантоцианидинов – флавандиолы-3,4 и катехинов – флаванолы-3) с максимумом поглощения 280 нм и соответствуют спектрам катехинов с максимумом 275-280 нм и минимумом 255-260 нм. Спектры гидролизной и агликоновой фракций соответствуют спектру кверцетина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании сырья манжетки прямоволосой с применением химических и физико-химических методов обнаружения и идентификации флавоноидов выявлены основные классы изучаемых соединений (флавонолы, флавонол-3-гликозиды, производные катехинов), а также индивидуальные вещества - кверцетин и рутин. Отмечено преобладание в подземной части растения дубильных веществ конденсированной природы, затрудняющих качественное определение флавоноидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пасешниченко В.А. Растения-продукты биологически активных веществ / В.А. Пасешниченко // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Том 7, № 8. — С. 13–19.
2. Ладыгина Е.Я. Химический анализ лекарственных растений: учеб, пособие для фармацевтических вузов / Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова — М.: Высш. школа. — 1983. — 176 с.
3. Boruz Violeta Speciile de Alchemilla l. din carpații meridionali, cu referire specială la masivul parâng / Teză de doctorat doctorand biolog București. — 2008. — 23с.
4. Бабаян М.С. Изучение химического состава травы манжетки тринадцатилепестной / М.С. Бабаян // Научное обозрение. — 2009. — № 2. — С. 40-44.
5. Андреева В.Ю. Исследование химического состава надземной части манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинин // Химия растительного сырья. — 2000. — №2. — С. 79-85.
6. Баева В. М. Полифенолы травы манжетки / В.М. Баева, С.А. Сасов // Фармация. — 2007. — № 8. — С. 9-10.
7. Зорина Е.В. Исследования по разработке нормативной документации на траву манжетки / Е.В. Зорина, Г.И. Олешко, А.Б. Седова // Фармация (Фармацевтическая химия и фармакогнозия). — 2009. — № 1. — С. 11–15.
8. Фитохимический и товароведческий анализ лекарственного растительного сырья: методические указания к лабораторным занятиям по фармакогнозии / под ред. Л.С. Теслова. — 3-е изд, исправ. — СПб.: Изд-во СПХФА, 2010. — 168 с.
9. Блажей А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый. — М.: Мир. 1977. — 235 с.

ФГБОУ ВО «Майкопский государственный
технологический университет»

Бочкарева И. И., кандидат фармацевтических
наук, доцент кафедры фармации

E-mail: bochkarevainna@gmail.com

Тел.: +7 918 421-10-92

Maykop State Technological University
Bochkareva I. I., Candidate of Pharmaceutical
Sciences, Associate Professor at the Department of
Pharmacy

E-mail: bochkarevainna@gmail.com

Ph.: 8(918)421-10-92

Артемьева В. В., старший преподаватель ка-
федры фармации

E-mail: denis7radnet.ru@mail.ru

Тел.: +7 903 465-93-13

Artem'eva V. V., Senior Lecturer at the Department
of Pharmacy

E-mail: denis7radnet.ru@mail.ru

Ph.: 8(903)465-93-13

Дьякова Ирина Николаевна кандидат биологи-
ческих наук, доцент кафедры фармации

E-mail: djakova_irina@rambler.ru

Тел.: +7 909 471-07-24

D'iakova I. N., Candidate of Biological Sciences,
Associate Professor at the Department of Pharmacy

E-mail: dyakov-vit@mail.ru

Ph.: 8(909)471-07-24