

УДК 577.13

Определение кумарина в *Melilotus officinalis* (L.) Pall. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Аттобрах Н.К. *, Хуснетдинова Л.З. *, Дубровная С.А. *, Акулов А.Н. **

*Казанский федеральный университет

**Казанский институт биохимии и биофизики - Казанский научный центр Российской академии наук

Аннотация

Исследовали содержание кумарина в различных вегетативных органах донника лекарственного, произрастающего в пяти различных районах республики Татарстан. Установили, что наибольшая концентрация кумарина в *Melilotus officinalis* L. содержится в цветках (0,19-0,48 % от сухой массы) независимо от местообитания. У донника лекарственного, произрастающего в Верхнеуслонском районе, отмечалось наибольшее содержание кумарина, что вероятнее всего связано с высоким уровнем инсоляции. В результате исследований выявлено, что на характер распределения веществ по морфологическим группам влияют условия произрастания *Melilotus officinalis*

Ключевые слова: ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, КУМАРИН, *MELILOTUS OFFICINALIS* L.

Введение

Донник лекарственный (*Melilotus officinalis* L.) – это однолетнее или двухлетнее лекарственное растение, принадлежащее к семейству бобовых (*Fabaceae*). Лекарственным сырьем служит надземная часть растения – трава и используется в народной медицине для лечения варикозного расширения вен и тромбообразования в венах, а также для облегчения заживления ран и язв [1]. Известно также, что *Melilotus officinalis* обладает

антиоксидантными свойствами [2] наряду с антибактериальной, противоопухолевой [3] и противовоспалительной активностью [4].

Согласно опубликованным данным, выделенные из *Melilotus officinalis* и идентифицированные соединения включают кумарины, такие как дикумарол, дигидрокумарин, флавоноиды, кверцетин гликозиды, кемпферол гликозиды [5]. Растение также содержит витамин С, аминокислоты, дубильные вещества, каротиноиды и минеральные соли [6].

Кумарин играет ключевую роль в фармацевтической промышленности. Основным предметом исследований в последнее время было производство антикоагулянтов на основе кумарина, анальгетиков, антиоксидантов, а также средств обладающих антимикробным (противовирусным, противогрибковым и антипаразитарным), противоопухолевым, противодиабетическим, антинейродегенеративным и противовоспалительным действием [7]. Препараты, изготовленные из соединений кумарина, обладают низкой токсичностью, малым спектром побочных эффектов и меньшей лекарственной устойчивостью [8].

Целью нашей работы явилось сравнение суммарного содержания кумарина в различных частях надземной части донника лекарственного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы

Образцы *Melilotus officinalis* были собраны в пяти районах Республики Татарстан – Дрожжановском, Зеленодольском, Бавлинском, Верхнеуслонском и Лаишевском.

Дрожжановский район приурочен к району западной Предволжской лесостепи. Почвы выщелоченные черноземы на элювиях нижнемеловых и юрских пород. Район характеризуется оптимальными климатическими показателями. Годовое количество осадков составляет 440-460 мм в год, на фоне высоких летних температур. Изотерам июля – +19,5 °С. Пробная площадь расположена между сельскохозяйственными угодьями и проселочной дорогой. Участок характеризовался целостным травянистым покровом.

Бавлинский район приурочен к юго-восточной Закамской лесостепи. Почвы – черноземные. Район отличается заметной континентальностью климата. Количество осадков в год – 420-440 мм в год, при максимальных летних температурах. Изотерма июля составляет +19,5 °С. Ценопопуляция донника приурочена к участку типчаковый степно-разнотравному лугу, примыкающего к грунтовой дороге. Проектное покрытие травянистого яруса – 70 %.

Зеленодольский район – северный район елово-пихтовых смешанных лесов. Район подзолистых почв на элювии пермских пород. Годовое количество осадков составляет 440-460 мм в год, изотерма июля – +18,5 °С. Сбор растений проводили на участке вдоль автомобильного полотна, где растения произрастали на обнаженных суглинках, обнажившихся в процессе срезки естественного грунта в ходе строительства дороги. Проектное покрытие травянистого яруса – 30 %.

Лаишевский район – южный район елово-пихтовых смешанных лесов. Район слабо-подзолистых почв. Годовое количество осадков составляет 420-440 мм в год, изотерма июля – +19,0 °С. Зарастающий участок пашни, прилегающий к грунтовой дороге. Травянистый покров восстановлен. Проектное покрытие травянистого яруса 90 %.

Верхне-Услонский район – западный предволжский район широколиственных лесов. Район слабоподзолистых почв на элювии пермских пород. Годовое количество осадков составляет 440-460 мм в год, изотерма июля – +19 °С. Участок экотонного сообщества, расположенный между широколиственным лесом и проселочной дорогой. Проектное покрытие травянистого яруса – 100 %.

Растения были высушены на воздухе в проветриваемом помещении. Определение кумарина проводили дифференцированно в различных частях побега, для этого, надземные побеги сегментировали на соцветия, листья и стебли. Подготовленное сырье измельчали и просеивали через сито с отверстиями диаметром 2 мм (соответствие ГОСТ 214-83). Около 10 г каждого образца помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл и экстрагируют 70 % водного раствора этанола (50 мл) путем кипячения с обратным холодильником в течение 2 часов на водяной бане. Экстракт после охлаждения фильтруют через фильтровальную бумагу в мерную колбу объемом 100 мл и доводят раствор до метки 70 % водным раствором этанола.

Количественный анализ содержания кумаринов определяли методом ВЭЖХ. Калибровочную кривую строили по известным концентрациям кумарина (Sigma, США). Разделение проводили на хроматографической системе высокого давления Breeze («Waters», США). Использовали оригинальную колонку Symmetry® C18, 100Å, 5 μм, 3,9 мм x 150 мм («Waters», США). Детекцию пиков осуществляли посредством двуволнового УФ ВЭЖХ детектора Waters 2489 («Waters», США) при длине волны 254 и 360 нм. Разделение проводили с использованием градиента ацетонитрила. В качестве раствора А использовали 0,3 % раствор ортофосфорной кислоты, в качестве раствора Б – 25 % ацетонитрила в 0,3 % ортофосфорной кислоте. Градиент ацетонитрила строили по следующей схеме: 0-1 мин, 5 % раствор Б; 1-6 мин, 5-100 % раствора Б; 6-20 мин, 100 % раствор Б; 20-22 мин, 5 % раствора Б. Скорость потока элюента 0,6 мл/мин. На колонку вносили по 20 мкл образца. Хроматографирование проводили при комнатной температуре (25±2 °С).

Результаты и обсуждение

При исследовании содержания кумарина в различных вегетативных органах растения (стебель, лист, цветок) было установлено, что наибольшая концентрация кумарина в *Melilotus officinalis* содержится в цветках (0,19-0,48 % от сухой массы), что соответствует литературным данным [9]. В растительных пробах из Верхнеуслонского района зафиксирована максимальная концентрация кумарина (0,48 % от сухой массы) в сравнении с пробами, взятыми из Дрожжановского, Бавлинского, Зеленодольского и Лаишевского районов Республики Татарстан (рис. 1).

Суммарное содержание кумарина изменялось в ряду различных местообитаний; у растений из Верхнеуслонского района отмечалась самая высокая концентрация кумарина (0,48 % от сухой массы), растения произраставшие в Бавлинском районе накапливали умеренную концентрацию кумарина (0,30 % от сухой массы), а у растений из Лаишевского района наблюдалась самая низкая концентрация кумарина (0,19 % от сухой массы).

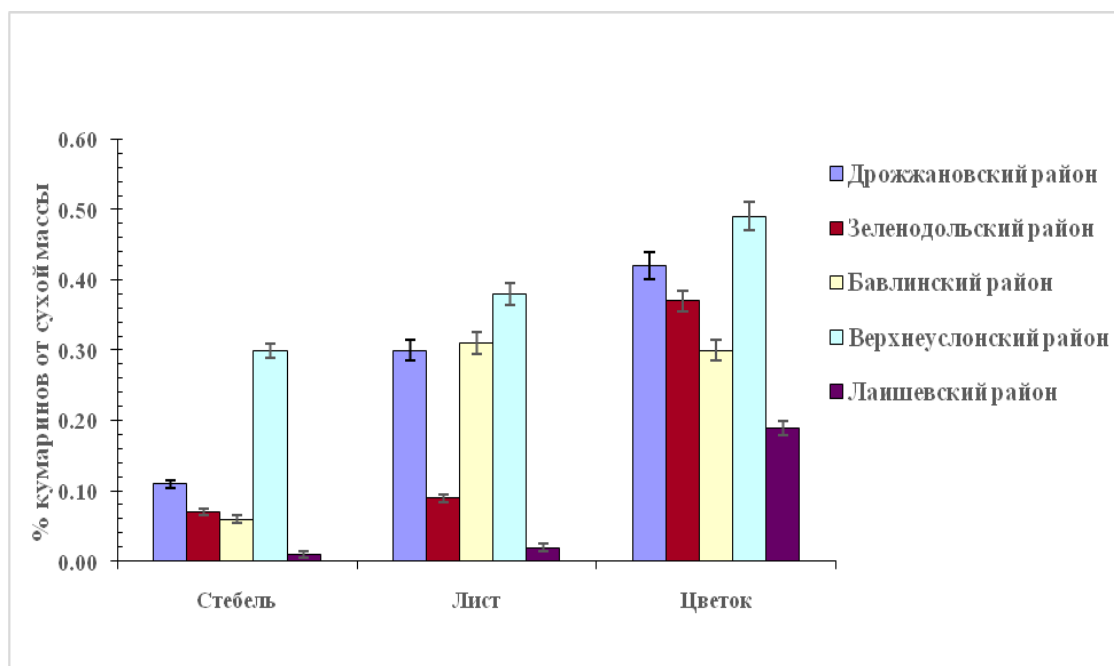


Рис. 1. Содержание кумарина в генеративных и вегетативных частях растения *Melilotus officinalis*

Известно, что на накопление кумарина оказывают влияние такие факторы, как степень освещенности [10]. Согласно литературным источникам, синтез кумаринов является светозависимым процессом, и наибольшая зависимость данного процесса наблюдается от ультрафиолетового спектра излучения. Стоит заметить, что исследуемые образцы из Верхнеуслонского района с наибольшим содержанием кумарина, произрастали на окраине леса с высоким инсоляционным уровнем. Таким образом, можно предположить, что высокое содержание кумарина в пробах взятых из Верхнеуслонского района обусловлено высоким уровнем освещенности данного места.

Исследования показали, что условия произрастания *Melilotus officinalis* влияют как на характер распределения веществ по морфологическим группам, так и на общее содержание кумаринов в растении.

Список использованных источников

1. Kozłowski, J., Buchwald W., Forycka, A., & Szczyglewska D. Rośliny i surowce lecznicze // Poznań: Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants. – 2009.

2. Braga P.C., Sasso M.D., Lattuada N., *et al.* Antioxidant activity of *Melilotus officinalis* (L.) extract investigated by means of the radical scavenging activity, the chemiluminescence of human neutrophil bursts and lipoperoxidation assay // J Med Plants Res. – 2013. – № 7(7). – С. 358-365.

3. Karakas F.P., Yildirim A., Turker A. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities // Turk J Biol. – 2012. – № 36(6). – С. 641-652.

4. Plesca-Manea L., Parvu A.E., Parvu M., *et al.* Effects of *Melilotus officinalis* (L.) on acute inflammation // Phytotherapy Research. – 2002. – № 16(4). – С. 316-319.

5. Quijano-Celis C. E., Pino J. A., Morales G. Chemical composition of the leaves essential oil of *Melilotus officinalis* (L.) Pallas from Colombia // Journal of Essential Oil-Bearing Plants. – 2010. – № 13(3). – С. 313-315.

6. American Diabetes Association: Position Statement: Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care. Diabetes Care. – 1999. – № 22(8). – С. 1354-1360.

7. Xia L., Wang Y., Huang W., Qian H. Research advance of anticancer drugs with coumarin structures // Chinese Journal of New Drugs. – 2013. – № 22(20). – С. 2392-2404.

8. Wang H., Lu X., Yao H., Feng J., Liu R. Research progress on application of coumarin and its derivatives // Chemical Industry Times. – 2009. – № 23(8). – С. 40-43.

9. Miranda M., Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales // La Habana:Editorial Félix Varela. – 2001. – 141.

10. Ломбоева С. С., Танхаева Л. М., Олейников Д. Н. Динамика накопления флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia Secunda* (L.) House) // Химия растительного сырья. – 2008. – №. 3.

Цитирование:

Аттобрах Н.К., Хуснетдинова Л.З., Дубровная С.А., Акулов А.Н. Определение кумарина в *Melilotus officinalis* (L.) Pall. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // АгроЭкоИнфо. – 2020, №3. – http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2020/3/st_304.pdf.