

Биологически активные вещества подорожника большого (*Plantago major* L.) степной зоны

О.Н. Немерешина, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГМУ;
Н.Ф. Гусев, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ;
Т.Л. Малкова, д.фарм.н., ФГБОУ ВО Пермская ГФА

Применение растений рода подорожник (*Plantago* L.) упоминаются ещё в трудах древнегреческих, римских и древнеарабских авторов [1]. Широкое применение подорожника обусловлено выраженным лечебным и профилактическим действием его препаратов, отсутствием побочных эффектов, а также относительной дешевизной и доступностью лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Подорожник большой (*P. major* L.) относится к широко распространённым евразийским видам, и его листья являются фармакопейным сырьём, содержащим комплекс биологически активных веществ (БАВ) и микроэлементов [1–3].

Содержание биологически активных веществ, обладающих активностью и терапевтическим действием, как известно, в значительной степени зависит от экологической группы растений и от экологических условий в местах произрастания видов [4, 5].

В регионе Южного Урала наибольшая засушливость как негативный экологический фактор характерна для степной зоны Оренбургской области, где в растительных сообществах преобладают виды с признаками ксероморфизма. Для подорожника большого, обладающего мезоморфностью, климатические условия Оренбуржья не являются комфортными. Тем не менее *P. major* L. распространён в области повсеместно, большей частью в пониженных элементах рельефа среди растений мезоморфной группы. Поэтому исследуемый вид, обладая достаточным ресурсным потенциалом, может быть использован в качестве лекарственного сырья (ЛРС), необходимого для применения в фитотерапии, косметике и пищевой индустрии. Однако *P. major*, встречающийся в степной зоне Оренбуржья, в химическом отношении не изучен, и ЛРС, заготавливаемое в регионе, требует дополнительной оценки его качества [6, 7].

В связи с вышеизложенным цель нашего исследования заключалась в изучении биологически активных веществ в ЛРС *Plantago major*, произрастающего в степной зоне Южного Урала в пределах Оренбургской области.

Материал и методы исследования. Подорожник большой (*Plantago major* L.) семейства *Plantaginaceae* Juss. – подорожниковые, представляет собой многолетнее травянистое растение, относящееся к группе мезофитов. Данный вид растения встречается в степной и лесостепной зонах Южного Урала повсеместно, предпочитая затенённые места обитания с достаточным увлажнением.

P. Major встречается в разнотравных сообществах и является кормовым, пищевым, лекарственным и медоносным растением.

Исследуемые образцы ЛРС *P. major* L. были собраны в период цветения растений на опушке колковых лесов и на остепнённых лугах в пойме р. Урала (окр. с. Нежинка Оренбургского р-на, 24–28 июня 2017 г.).

Препараты подорожника большого проявляют разностороннее фармакологическое действие и применяются при лечении многих заболеваний [8]. Галеновые препараты применяются для лечения заболеваний органов дыхания, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и при заболевании почек [7, 8].

Наружно препараты *P. major* применяют при воспалении ротовой полости и носоглотки, ранах, ушибах, ожогах, фурункулёзе, как бактериостатическое и ранозаживляющее средство [9, 10]. Экстракты *P. major* оказывают седативное и гипотензивное действие, а сок из свежих листьев эффективен при лечении ран роговицы глаза. Сок листьев *P. major* подавляет рост патогенного стафилококка в разведении 1:2, кишечной палочки – 1:4 и задерживает рост гемолитического стрептококка в развитии 1:2. Препарат «Плантаглюцид», содержащий смесь полисахаридов п. большого, применяется при гипоацидном гастрите и язвенной болезни желудка в период обострения и для профилактики рецидивов [10].

Изучение биологически активных веществ (БАВ) в сырье *P. major* проводили с использованием методов, принятых для фитохимического исследования лекарственного растительного сырья [7, 11, 12]. Извлечение флавоноидов проводили с использованием раствора этанола различных концентраций.

Для обнаружения флавоноидов использовали качественные реакции: проба Синода и проба Брианта [5, 11]. Обнаружение индивидуальных полифенолов (флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты) проводили методом двумерной хроматографии на бумаге марки FN-1 «Filtzak» (Германия) восходящим способом [5, 11]. Для количественного определения суммы флавоноидов использовали метод фотоколориметрии по реакции комплексообразования с раствором хлорида алюминия и ацетата натрия [5, 11]. Концентрацию флавоноидов рассчитывали по калибровочному графику, построенному по цинарозиду. Определение проводили с учётом влажности сырья (6,42%) и относительной погрешности опыта (0,34%).

Наличие танидов и их количественное определение проводили методами, принятыми для данной группы веществ [5, 8, 11].

Иридоиды в извлечениях определяли по реакции с реактивом Трим – Хилла. Индивидуальные вещества обнаруживали методом хроматографии восходящим способом на бумаге марки FN- 1 «Filtrak» в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5). Содержание суммы иридоидов определяли колориметрическим методом на фотоэлектроколориметре марки КФК-М по классической методике [5, 8], основанной на получении окрашенных соединений извлечений с реактивом Трим – Хилла [5, 8, 11]. Расчёт проводили по калибровочной кривой, полученной для аукубина.

Детектирование полифенолов и иридоидов на хроматограммах осуществляли путём просматривания в видимом и УФ-свете, до и после обработки хромогенными реактивами. Идентификацию полифенольных веществ проводили также сравнением УФ-спектров элюатов с хроматограммы со стандартными образцами кофейной и хлорогеновой кислот, лютеолина, апигенина, цинарозида [5]. Для идентификации основного соединения иридоидной природы на хроматограммах использовали стандартный образец аукубина, любезно предоставленный сотрудниками Института биохимии АН РФ (Москва).

Содержание аскорбиновой кислоты определяли методом титриметрии, основанным на экстракции вещества из растительного сырья с последующим титрованием 2,6-дихлорфенолиндофенолом [5]. Для определения содержания каротина в ЛРС проводили экстракцию его петролейным эфиром с последующим фотометрическим измерением окраски [12]. Для количественного определения токоферолов в ЛРС использовали метод микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе марки LC-2010 [12].

Исследование спиртового экстракта *P. major* методом газовой хроматографии с масс-селективной детекцией проводили на хроматографе Agilent 7890А с масс-спектрометром Agilent 5975С, разделение

велось с использованием неполярной колонки марки НР-5ms, ионизация осуществлялась методом электронного удара, скорость потока газа-носителя (He) 1 мл/мин, инжектирование без деления потока, температура испарителя 280°С, температура колонки программировалась (5 мин. – 70°С, затем поднималась до 310°С со скоростью 18°С/мин и выдерживалась 10 мин.), регистрацию масс-спектров проводили по полному ионному току. Полученные масс-спектры сравнивали с библиотечными масс-спектрами (библиотека NIST08). Настройка масс-спектрометрического детектора Agilent 5975С осуществлялась по стандартной программе настройки Autotune.

Результаты исследования. Методом двумерной хроматографии на бумаге этанольного экстракта *P. major*, собранного в степной зоне Оренбуржья, обнаружены не менее 9 веществ группы полифенолов (табл. 1, рис. 1). Пять веществ по значению Rf, окраске пятен с хромогенными реактивами

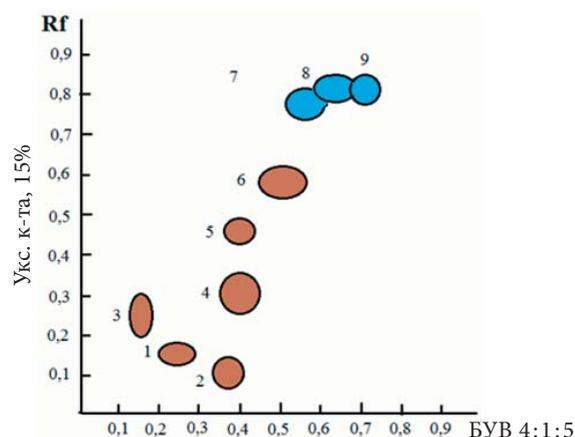


Рис. 1 – Хроматограмма полифенольных соединений *P. major*: сорбент – бумага марки FN- 1 «Filtrak» (Германия), система 1 – БУВ 4 : 1 : 5, система 2 – 15-процентная уксусная кислота

1. Хроматографическая характеристика БАВ подорожника большого

№ вещества	Значение Rf		Окраска				Класс соединения
	БУВ 4:1:2	15% CH ₃ COOH	УФ-свет	УФ-свет + NH ₃	AlCl ₃	Р-в Гепфнера	
1	0,24	0,16	–	–	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
2	0,37	0,11	–	жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
3	0,13	0,26	фиолетовая	жёлтая	ярко-жёлтая	–	флавоноиды
4	0,40	0,31	фиолетовая	жёлтая	ярко-жёлтая	–	флавоноиды
5	0,40	0,46	фиолетовая	жёлтая	бледно-жёлтая	–	флавоноиды
6	0,51	0,55	бледно-голубая	усиление окраски	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты
7	0,53	0,76	голубой	жёлто-зелёная	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты
8	0,63	0,78	голубой	ярко жёлто-зелёная	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты
9	0,69	0,79	голубая	ярко жёлто-зелёная	–	оранжево-коричневая	фенолокислоты
№ вещества	Значение Rf БУВ 4:1:2	Окраска реактивом Трим–Хилла			Класс соединения		
		видимый	УФ-свет				
1	0,23	тёмно-серая	фиолетовая		иридоиды		
2	0,35	тёмно-серая	фиолетовая		иридоиды		
3	0,56	серо-зелёная	фиолетовая		иридоиды		

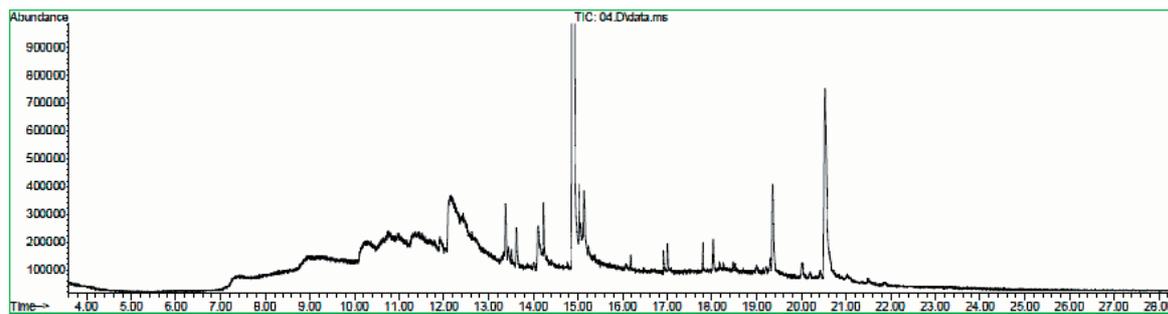


Рис. 2 – Хроматограмма спиртового извлечения *P. major*

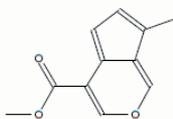
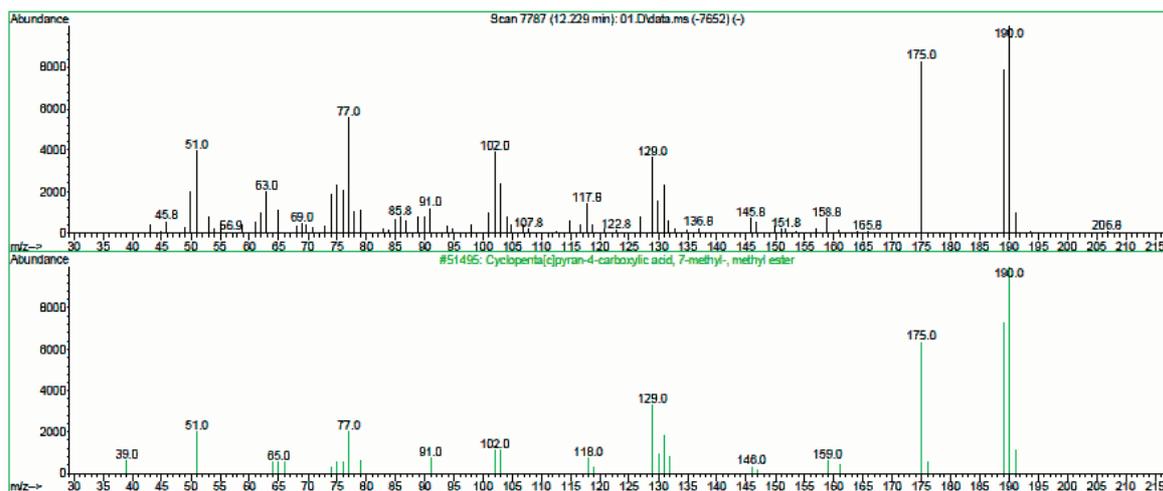


Рис. 3 – Масс-спектр пика со временем удерживания 12,23 мин., библиотечный спектр и формула вещества – Methyl 7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carboxylate

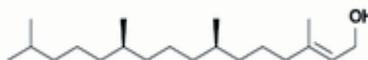
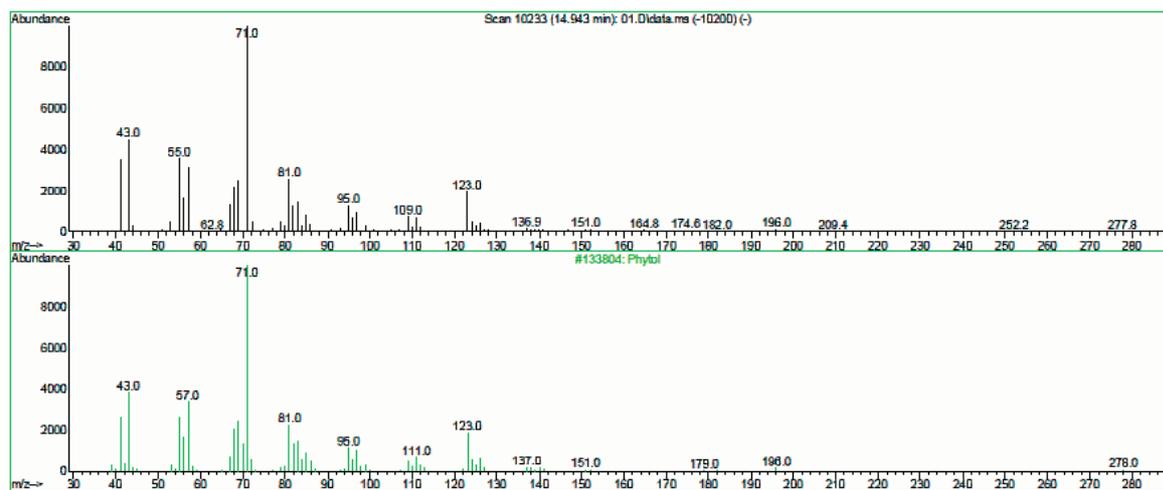


Рис. 4 – Масс-спектр пика со временем удерживания 14,94 мин., библиотечный масс-спектр и формула фитола

отнесено к флавоноидам, а четыре вещества – к фенолокислотам. В сравнении со свидетелями идентифицирован флавоноидлютеолин (Rf 0,40/0,31). Вещества с Rf 0,53/0,76 и 0,63/0,78 иден-

тифицированы со свидетелями как хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты.

Компонентный состав иридоидов представлен тремя веществами. Вещество с Rf 0,35 при

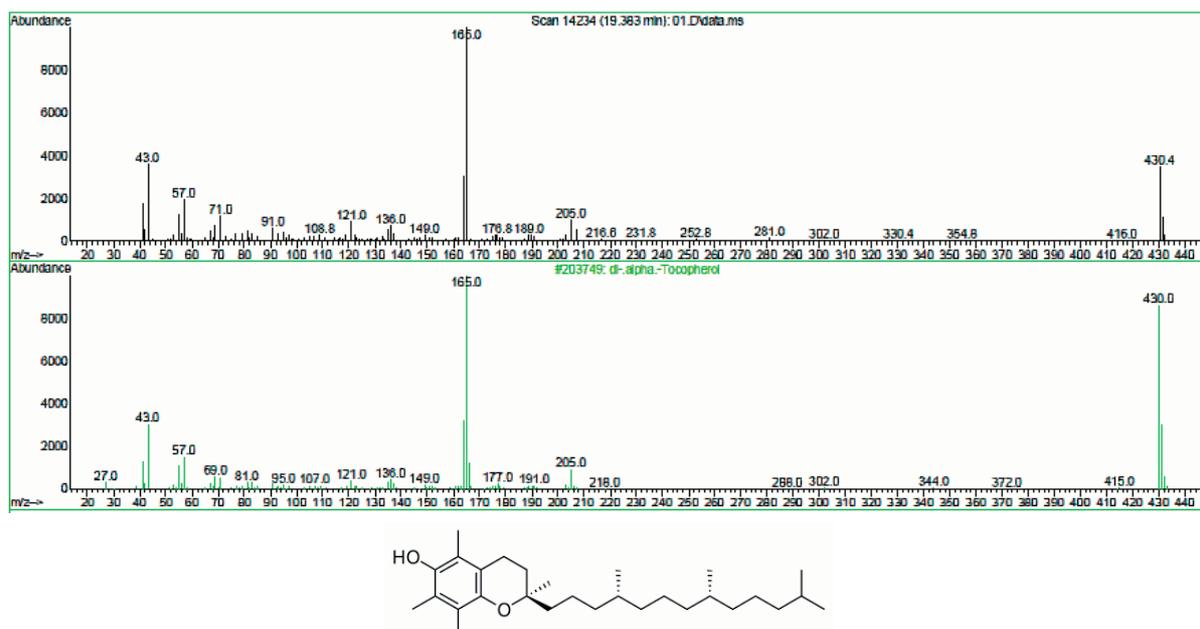


Рис. 5 – Масс-спектр пика со временем удерживания 19,38 мин., библиотечный масс-спектр и формула витамина Е

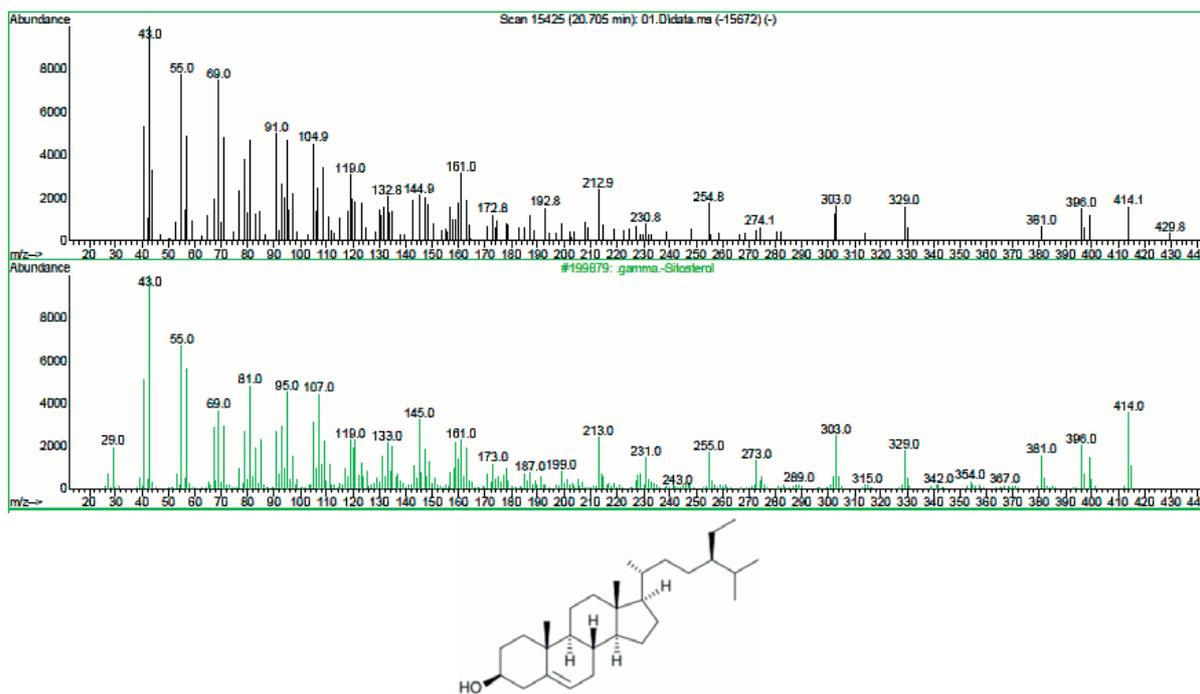


Рис. 6 – Масс-спектр пика со временем удерживания 20,70 мин., библиотечный масс-спектр и формула ситостерола

сравнении с аутентичным препаратом идентифицировано как аукубин, а вещество с Rf 0,23 как каталпол.

Суммарное содержание флавоноидов в сырье *P. major* составляло 1,13%, а иридоидов – 0,44%.

Методом ГХМС в этанольных экстрактах исследуемого ЛРС *P. major* обнаружены фитол, токоферол, ситостерол, сквален, methyl-7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carboxylate и сахара, среди которых на хроматограммах удалось идентифицировать изосорбид (табл. 2, рис. 1–7). Ве-

ществ флавоноидной природы данным методом обнаружить не удалось.

Из обнаруженных методом ГХМС веществ фармакологическое действие описано в отношении токоферола, изосорбида, сквалена и ситостерола, хотя до конца характер и механизмы биохимического воздействия не изучены и в отношении этих веществ [2]. О фармакологическом действии фитола в литературе упоминаний нет, хотя данное вещество упоминается в составе целого ряда фитопрепаратов [7].

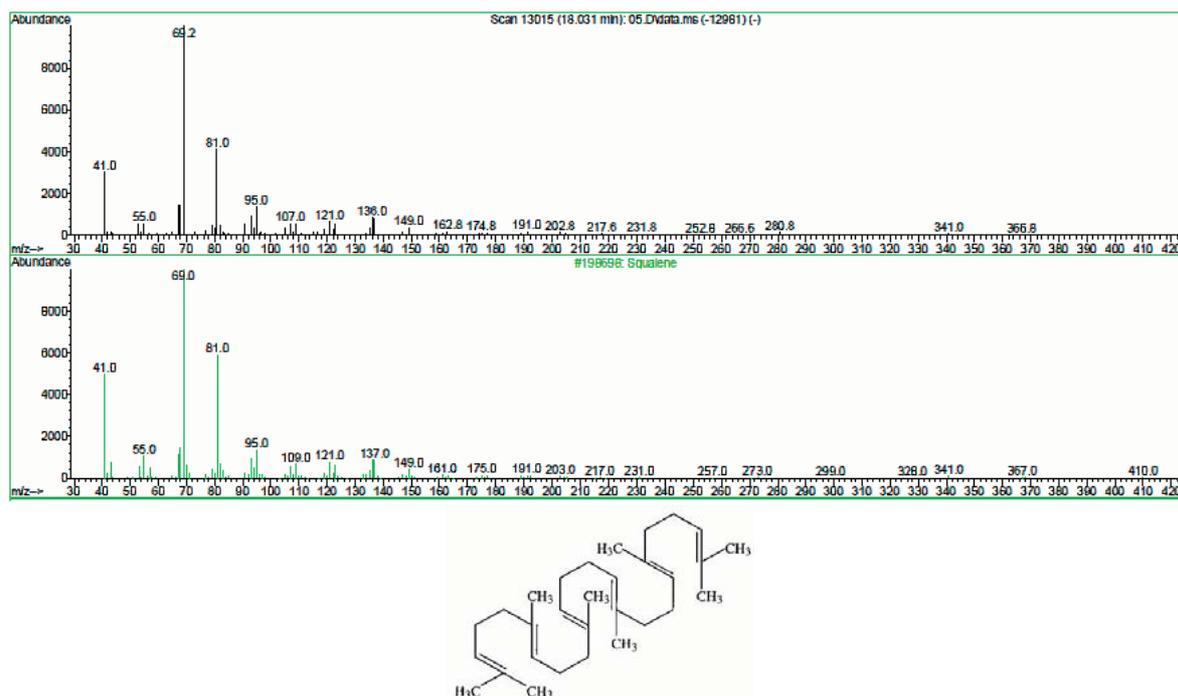


Рис. 7 – Масс-спектр пика со временем удерживания 18,03 мин., библиотечный масс-спектр и формула сквалена

2. Результаты исследования

Вещества	Содержание
Фитол	++++
Витамин Е	+++
Ситостерол	+++
Сквален	++
Сахара (изосорбид)	+
Methyl-7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carboxylate	+

3. Результаты количественного определения БАВ в сырье *P. major* (X±Sx)

Наименование БАВ	Содержание БАВ
аскорбиновая кислота	65,83±0,19 мг%
флавоноиды	1,13±0,03%
таниды	4,15±0,11%
иридоиды	0,44±0,09%
каротин	29,04±0,20 мг%

В сырье *P. major*, собранном в Оренбургской области, обнаружено сравнительно высокое содержание аскорбиновой кислоты (65,83 мг%), танидов (4,15%) и каротина (29,04%) (табл. 3).

Выводы.

1. Проведённый фитохимический анализ растительного сырья (лист) подорожника большого, собранного в степной зоне Оренбургской области, указывает на присутствие комплекса биологически активных веществ, в числе которых обнаружены флавоноиды (идентифицирован лютеолин), фенолкарбоновые кислоты (идентифицированы хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты), иридоиды (идентифицированы аукубин и каталпол), таниды, аскорбиновая кислота, каротиноиды, токоферол, сквален, фитол, ситостерол, methyl-7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carboxylate, углеводы;

2. Исследуемое сырьё содержит значительное количество иридоидов (0,44±0,09% на абс. сух вес.), танидов (4,15±0,11%), флавоноидов (1,13±0,03%), аскорбиновой кислоты (65,83±0,19 мг%) и каротина (29,04±0,20 мг%).

Литература

- Самылина И.А., Сорокина А.А., Пятигорская Н.В. Подорожник большой // Фарматека. 2010. № 2. С. 100–101.
- Chiang L.C. et al. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica* // The American journal of Chinese medicine. 2003. Т. 31. №. 2. С. 225–234.
- Riinsted N. et al. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoylphenylethanoid glycosides // Phytochemistry. 2000. Т. 55. №. 4. Р. 337–348.
- Samuelsen A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review // Journal of ethnopharmacology. 2000. Т. 71. №. 1. С. 1–21.
- Гусев Н.Ф. Биологические особенности и перспективы использования растений рода *Veronica* L. (сем. *Scrophulariaceae* Juss.) лесостепного и степного Предуралья: автореф. дисс... докт. биол. наук. Оренбург, 2010. 45 с.
- Хлебников А.В., Олешко Г.И., Гусев Н.Ф. Запасы сырья лекарственных растений в западных и северо-западных районах Оренбургской области // Растительные ресурсы. 1989. Т. 25. Вып. 2. С. 180–186.
- Немерешина О.Н., Малкова Т.Л., Гусев Н.Ф., Изучение биологически активных веществ и антимикробной активности листьев подорожника ланцетного *Plantago lanceolata* // Башкирский химический журнал. 2014. Т. 21. №. 4. С. 134–142.
- Соснина С.А. Сравнительное фармакогностическое изучение, стандартизация сырья и фитопрепаратов видов рода *Plantago* L.: автореф. дисс... докт. фарм. наук. Пермь, ПГФА. 2009. 29 с.
- Tinkov A.A. et al. *Plantago maxima* leaves extract inhibits adipogenic action of a high-fat diet in female Wistar rats // European journal of nutrition. 2014. V. 53. №. 3. Р. 831–842.
- Оленников Д.Н., Самуэльсен А.Б., Танхаева Л.М. Подорожник большой (*Plantago major* L.). Химический состав и применение // Химия растительного сырья. 2007. №. 2. С. 37–50.
- Решетникова М.Д. и др. Химический анализ биологически активных веществ лекарственного растительного сырья. Пермь. 2004. 335 с.
- Скурихин В.Н., Шибяев С.В. Методы анализа витаминов А, Д, Е и каротина в биологических объектах и продуктах животноводства. М.: Химия. 2006. 96 с.