

УДК 615.32[58.085+58.087+542.3]

ПЛОДЫ РОДОДЕНДРОНА КАВКАЗСКОГО: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И СОСТАВА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Тишина А.Н., Курегян А.Г., Глушко М.П., Печинский С.В., Антонян И.А.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск,
e-mail: al.tishinatishina@yandex.ru*

Цель исследования – изучение диагностических признаков и состава полифенольных соединений плодов рододендрона кавказского. Изучение микродиагностических признаков плодов было проведено методом микроскопии, влажность определена гравиметрическим методом, для изучения полифенольных соединений были использованы методы спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии. В связи с тем, что до настоящего исследования изучение плодов этого производящего растения не проводилось, было необходимо провести определение диагностических признаков и установить состав полифенольных соединений сырья как наиболее активной группы вторичных метаболитов. По результатам проведенных исследований впервые установлены микроскопические признаки экзокарпия, мезокарпия и эндокарпия плодов рододендрона кавказского и определена влажность сырья. Для изучения биологически активных соединений использовали спиртовой экстракт плодов, полученный при кипячении. Для спиртового экстракта плодов рододендрона кавказского установлены характеристические максимумы поглощения в ультрафиолетовом диапазоне спектра. В изучаемом сырье с использованием пяти подвижных фаз впервые установлено наличие от семи до девяти соединений, производных полифенолов и дитерпеноидов. Число определенных полифенолов варьирует в зависимости от состава подвижной фазы. В сравнении со стандартными образцами достоверно идентифицированы галловая и коричная кислоты, рутин, кверцетин, лутеолин и умбеллиферон. Предварительно с помощью реактива Година определено наличие в сырье дитерпеноидов грайанового типа, в частности грайанотоксинов.

Ключевые слова: рододендрон кавказский, плоды, полифенолы, флавоноиды, грайанотоксины, ТСХ

FRUITS OF RHODODENDRON CAUCASIAN: DETERMINATION OF DIAGNOSTIC SIGNS AND COMPOSITION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS

Tishina A.N., Kuregyan A.G., Glushko M.P., Pechinskiy S.V., Antonyan I.A.

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Pyatigorsk, e-mail: al.tishinatishina@yandex.ru*

The aim of the study was to investigate the diagnostic features and composition of polyphenolic compounds in Caucasian rhododendron fruits. The microdiagnostic features of the fruits were studied using microscopy, the humidity was determined gravimetrically, and the polyphenolic compounds were studied using spectrophotometry and thin-layer chromatography. Since the fruits of this producing plant had not been studied before this study, it was necessary to determine the diagnostic features and establish the composition of the polyphenolic compounds of the raw materials as the most active group of secondary metabolites. Based on the results of the studies, microscopic features of the exocarp, mesocarp and endocarp of Caucasian rhododendron fruits were established for the first time, and the humidity of the raw materials was determined. An alcoholic extract of the fruits obtained by boiling was used to study biologically active compounds. Characteristic absorption maxima in the ultraviolet range of the spectrum were established for the alcoholic extract of Caucasian rhododendron fruits. In the studied raw materials, the presence of seven to nine compounds, derivatives of polyphenols and diterpenoids, was established for the first time using five mobile phases. The number of identified polyphenols varies depending on the composition of the mobile phase. Gallic and cinnamic acids, rutin, quercetin, luteolin and umbelliferone were reliably identified in comparison with standard samples. The presence of grayan-type diterpenoids, in particular grayanotoxins, was preliminarily determined in the raw material using Godin's reagent.

Keywords: *Rhododendron caucasicum*, fruits, polyphenols, flavonoids, grayanotoxins, TLC

Введение

Из трех европейских видов рододендронов, произрастающих на территории Российской Федерации [1–3], менее изученным является рододендрон кавказский (*Rhododendron caucasicum* Pall.), причем это можно отнести и к вопросам о составе его биологически активных соединений (БАС), и к его ботанической характеристике.

Это растение является эндемиком флоры Северного Кавказа РФ [4–6] и интересно тем, что его отвары и настойки с давних пор применяются в народной медицине для лечения ревматизма, бронхитов, инфекционных заболеваний, головных болей, а также как общеукрепляющее и тонизирующее средство [6–8]. Все вышеописанные эффекты рододендрона кавказского связаны

с его вторичными метаболитами. Наиболее изученными видами сырья этого производящего растения являются листья, в меньшей мере изучены цветки и побеги [9–11]. Следует подчеркнуть, что изучение состава БАС плодов рододендрона кавказского и описание их диагностических признаков до настоящего времени не проводились.

Цель исследования – изучение диагностических признаков и состава полифенольных соединений плодов рододендрона кавказского.

Материалы и методы исследования

В работе использовали сырье – плоды рододендрона кавказского (*Rhododendron caucasicum* Pall.), заготовленные в августе 2022 г. и августе 2023 г. и высушенные воздушно-теневым способом. Определение влажности сырья проводили по методике ГФ XV [12].

Макроскопический анализ. Для определения макроскопических признаков использовали свежесобранное и высушенное сырье, описание признаков проводили по технике макроскопического анализа согласно ГФ XV [12].

Микроскопическое исследование. Для микроскопического изучения образцов сырья готовили микропрепараты плодов и семян с поверхности и поперечными срезами, адаптируя методики, описанные в ГФ XV [12]. Сырье предварительно кипятили в 3% растворе натрия гидроксида, а также замачивали на трое суток в спирто-водно-глицериновой смеси (1:1:1). Микропрепараты просматривали с помощью микроскопа «МИКРОМЕД-1» с тринокулярной насадкой, с объективами 4×, 10×, 40×, 100×, окулярами 10×. Регистрировали результаты с помощью камеры для микросъемок Digital Camera for Microscope DCIM 1.3 Mpixes.

Методика получения экстракта плодов рододендрона кавказского. С целью сохранения системности в изучении сырья рододендрона кавказского, авторами были получены экстракты по аналогии с листьями и цветками этого производящего растения [13] по следующей методике: около 5,0 г (точная навеска) измельченных и просеянных через сито с диаметром отверстий 1 мм плодов рододендрона кавказского помещали в круглодонную колбу со шлифом объемом 250 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 95% и экстрагировали в течение 2 ч с обратным холодильником при температуре 80 °С. По истечении 2 ч нагревание прекращали, порцию экстракта остужали до комнатной температуры и фильтровали в склянку из темного стекла через бумажный фильтр. Затем к навеске сырья добав-

ляли вторую порцию экстрагента – 50 мл спирта этилового 95% и полностью повторяли процедуру экстракции. После экстракции первую и вторую порции экстракта объединяли [13].

Анализ методом спектрофотометрии в видимой и УФ областях. Экстракт плодов рододендрона кавказского в количестве 0,5 мл переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем до метки спиртом этиловым 95%. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Регистрацию УФ-спектров поглощения проводили в соответствии с требованиями, приведенными в ГФ XV [12], на спектрофотометре УФ-Виз в кюветках с толщиной слоя 1 см в интервале длин волн от 190 до 450 нм, в качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 95%.

Анализ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). На линию старта предварительно активированных в сушильном шкафу хроматографических пластинок марки «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» размером 100×150 мм наносили 10 мкл испытуемого экстракта и по 2 мкл растворов стандартных образцов (СО). Пластины помещали в предварительно насыщенные парами подвижной фазы (ПФ) хроматографические камеры, хроматографировали при комнатной температуре восходящим способом. Когда фронт ПФ проходил около 90% длины пластины от линии старта, пластинку вынимали, сушили на воздухе до улетучивания паров ПФ и просматривали в видимом свете и УФ-свете при длинах волн 254 нм и 365 нм. Для визуализации дитерпеноидов, в частности грайанотоксинов (GTX), пластинки обрабатывали реактивом Година [8].

Ранее авторами изучались листья и цветки рододендрона кавказского методом ТСХ [13], поэтому при анализе его плодов в эксперименте использовали те же ПФ: А – этилацетат; Б – этилацетат – ацетон (1:2); В – бензол – метанол – уксусная кислота (8:6:1); Г – *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5); Д – хлороформ – метанол – вода (7:3:1).

Приготовление растворов стандартных образцов (СО). Точную навеску 0,0100 г СО или хлорогеновой кислоты (CAS 327-7-9, Sigma), или галловой кислоты (CAS 5995-86-8 Sigma), или коричной кислоты (CAS 140-10-3 Sigma), или умбеллиферона (CAS 93-35-6 Sigma), или лютеолина (CAS 491-70-3, Фитопанацея), или рутина (CAS 153-18-4 Фитопанацея), или кверцетина (CAS 117-39-5 Фитопанацея) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в спирте

этиловом 95% и довели объем раствора до метки тем же растворителем.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования были изучены морфолого-анатомические признаки плодов рододендрона кавказского. Следует отметить, что до настоящего исследования данные, характеризующие морфолого-анатомические признаки плодов рододендрона кавказского, не публиковались.

В монографиях J. Cullen [4], А.И. Галушко [2], в автореферате М.Е. Жаворонковой [5] сведения об анатомических признаках плодов рододендрона кавказского также отсутствуют. В ходе исследования установлено, что плод рододендрона кавказского – это желто-бурая ценокарпная коробочка, вскрывающаяся продольно. Эндокарпий

склерефицирован; плодолистиков, участвующих в образовании коробочки, 5. Таким образом, плод разделен на 5 гнезд с каменистым эндокарпием. Внутри каждого гнезда множество мелких (длиной около 0,5–1 мм) светло-желтых семян.

Далее были изучены микродиагностические признаки плодов рододендрона кавказского. На поперечном срезе хорошо видны экзокарпий, мезокарпий и эндокарпий (рис. 1). Экзокарпий представлен округлыми клетками, по всей поверхности видны простые многоклеточные, перегнутые в нескольких местах волоски (рис. 2, а, б, и 3, а, б). Паренхима мезокарпия состоит из клеток овальной и слегка многоугольной формы (рис. 2, в, и 3, в). В эндокарпии хорошо заметны склеренхимные волокна – довольно длинные клетки с многослойными толстыми оболочками (рис. 2, в, и 3, в).



Рис. 1. Поперечный срез плодов рододендрона кавказского (ув. $\times 100$) (фото авторов)

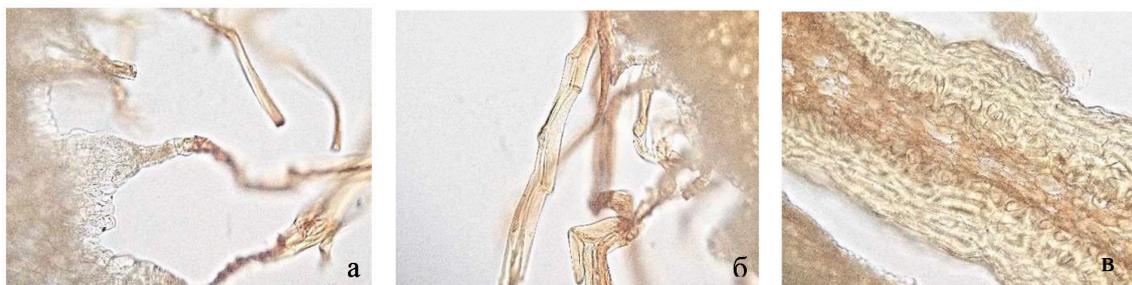


Рис. 2. Поперечный срез плодов рододендрона кавказского (ув. $\times 200$): а – клетки экзокарпия с волосками; б – волоски на поверхности плода; в – клетки мезокарпия и эндокарпия (фото авторов)



Рис. 3. Поперечный срез плодов рододендрона кавказского (ув. $\times 400$): а, б – клетки экзокарпия с волосками; в – клетки мезокарпия и эндокарпия (фото авторов)

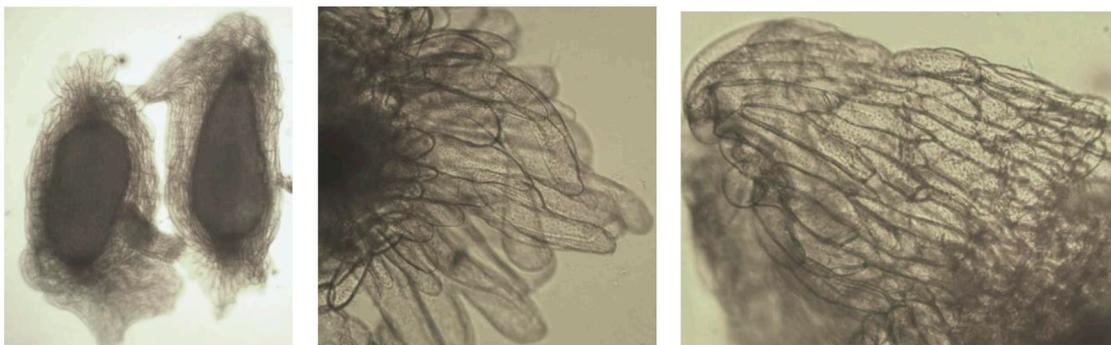


Рис. 4. Структура семян рододендрона кавказского (фото авторов)

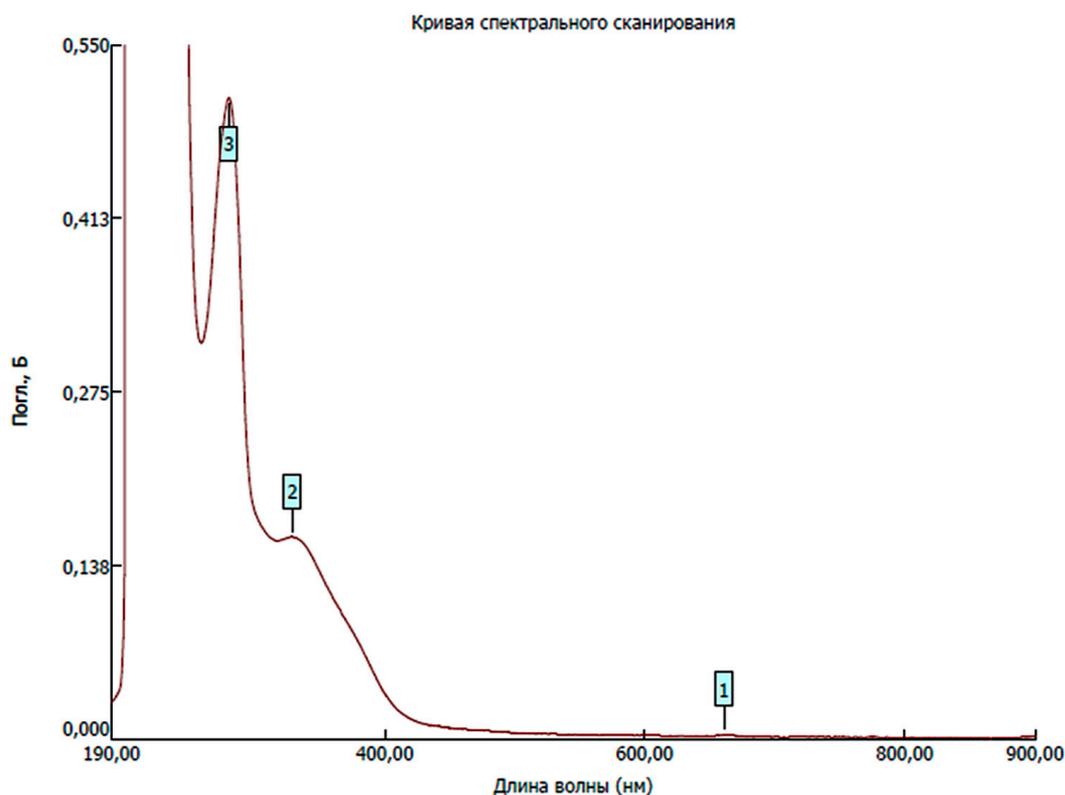


Рис. 5. Спектр поглощения экстракта плодов рододендрона кавказского

Семена рододендрона кавказского светло-желтого цвета очень мелкие, в длину от 0,5 до 1 мм, поэтому препарировать их не представлялось возможным. Семена рассматривали под микроскопом в целом виде (рис. 4).

При микроскопическом исследовании семян рододендрона кавказского установлено, что они вытянутой формы; с одного края имеются одноклеточные волоски, с противоположной стороны – только клетки эпидермиса (рис. 4). Таким образом, впервые изучены микроскопические признаки экзокарпия, мезокарпия и эндокарпия плодов рододендрона кавказского.

На следующем этапе исследования было определено значение влажности плодов рододендрона кавказского, так как этот показатель качества растительного сырья является обязательным, учитывается при расчете содержания БАС и оказывает влияние на сохранность сырья [12]. Установлено, что среднее значение влажности плодов рододендрона кавказского составило 13,86% и 13,89% для серий сырья 2022 и 2023 гг. соответственно.

По аналогии с изучением листьев и цветков этого растения [13] в качестве предварительного метода исследования химического состава плодов рододендрона

кавказского применяли метод спектрофотометрии. Электронный спектр поглощения экстракта плодов рододендрона кавказского имеет выраженные максимумы при 205, 280 и 329 нм. Максимум при 650 нм имел значение оптической плотности на уровне шума (рис. 5) [13].

Для анализа профиля полученного спектра сравнили его максимумы поглощения с таковыми на УФ-спектрах растворов имеющих СО полифенолов в спирте этиловом 95%. Так, на спектре раствора СО галловой кислоты установлены максимумы поглощения при 214 нм и 264 нм, коричневой кислоты – 270 нм, хлорогеновой кислоты – 329 нм. Производное кумарина – умбеллиферон характеризовался максимумами при 203 нм и 326 нм. УФ-спектры агликонов флавоноидов имели максимумы светопоглощения для лютеолина – при 256 нм, 353 нм; кверцетина – при 256 нм, 374 нм. Для раствора СО флавоноида гликозида – рутина зафиксированы максимумы при 258 нм и 359 нм [13].

Очевидно, что при анализе экстракта плодов рододендрона кавказского речь идет о суммарном извлечении, содержащем несколько классов БАС, а на спектре происходит наложение нескольких полос поглощения, специфичных для различных групп БАС. Однако положение максимумов позволяет предварительно предположить, что экстракт содержит ароматические соединения, в частности полифенолы.

Далее экстракт плодов рододендрона кавказского проанализировали более специфичным методом ТСХ. Согласно литературным данным ПФ А, Б, В, Д используют для идентификации и дитерпеноидов, и полифенолов [10, 11]. ПФ Г – *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5) является смесью растворителей, наиболее часто и широко используемой для разделения веществ флавоноидной природы. Идентификацию полифенолов проводили в сравнении с СО, определяя факторы удерживания для зон адсорбции на треках экстракта (R_f), факторы удерживания для зон адсорбции на треках растворов СО.

Поскольку зоны адсорбции дитерпеноидов грайанового типа не визуализируются в дневном свете и облучением ультрафиолетом при 365 и 254 нм, для проявления их зон адсорбции после идентификации полифенолов хроматограммы обрабатывали реактивом Година, при этом дитерпеноиды проявлялись в виде сине-фиолетовых зон адсорбции.

Эксперимент по определению полифенольных соединений показал следующие результаты: ПФ А позволила разделить

пять соединений, при этом идентифицирован один флавоноид – кверцетин и дополнительно установлено наличие четырех неидентифицированных полифенолов; ПФ Б выявила семь полифенолов, из них достоверно идентифицированы галловая и коричневая кислоты, рутин, кверцетин, лютеолин, умбеллиферон; с помощью ПФ В было обнаружено пять соединений, из которых идентифицированы галловая кислота, рутин и умбеллиферон; ПФ Г показала наличие шести полифенолов, а идентифицированы галловая кислота, лютеолин, рутин, кверцетин и умбеллиферон; ПФ Д подтвердила присутствие пяти полифенольных соединений, с идентификацией галловой кислоты, лютеолина и умбеллиферона.

После обработки хроматограмм реактивом Година предварительно в плодах рододендрона кавказского обнаружены неидентифицированные дитерпеновые производные: в ПФ А – три соединения, в ПФ Б, В, Д – по два вещества, в ПФ Г – одно соединение.

Выводы

1. Установленное значение влажности для сырья в дальнейшем можно использовать как базовое для установления норм качества плодов рододендрона кавказского.

2. Объединяя результаты анализа с применением всех пяти подвижных фаз, можно констатировать, что плоды рододендрона кавказского содержат кислоты – галловую, хлорогеновую и коричневую, флавоноиды – рутин, кверцетин, лютеолин и производное кумарина – умбеллиферон.

3. Предварительный результат, полученный методом ТСХ, позволяет предположить, что в плодах присутствуют производные дитерпеноидов.

Список литературы

1. Sheng Liu, Lili Sun, Peng Zhang, Changshan Niu Recent Advances in Grayanane Diterpenes: Isolation, Structural Diversity, and Bioactivities from Ericaceae Family (2018–2024) // *Molecules*. 2024. Vol. 29. P. 1649–1674.
2. Галушко А.И. Флора Северного Кавказа: Определитель. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1980. 351 с.
3. Doganyigit Z., Kaymak E., Silici S. The cardiotoxic effects of acute and chronic grayanotoxin-III in rats // *Human and Experimental Toxicology*. 2020. Vol. 39, Is. 3. P. 374–383.
4. Cullen J., White D., Christie F. Hardy rhododendron species: A guide to identification. – Portland, Oregon; Edinburgh: Timber Press & Royal Botanic Garden Edinburgh, 2005. 497 p.
5. Жаворонкова М.Е. Сравнительное фармакогностическое изучение европейских и азиатских видов рода *Rhododendron* L. флоры России: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пермь, 2012. 24 с.
6. Зайцева Н.В. Химический состав растений рода *Rhododendron*, произрастающих в южной Якутии // *Актуальные проблемы ботаники и охраны природы*. 2017. С. 58–66.

7. Fandakli S., Yayli N., Kahriman N., Uzunalioglu E., Ulaş Çolak N., Yıldırım S., Yaşar A. The chemical composition of the essential oil, SPME and antimicrobial activity of *Rhododendron caucasicum* Pall. // Records of Natural Products. 2019. Vol. 13, Is. 4. P. 316–323.
8. Yan S., Wang K., Al Naggat Y., Vander Heyden Y., Zhao L., Wu L., Xue X. Natural plant toxins in honey: An ignored threat to human health // J Hazard Mater. 2022. Vol. 15, Is. 424. P. 127682.
9. Kong L., Yu H., Deng M., Wu F., Jiang Z., Luo T. Enantioselective total syntheses of grayanatediterpenoids: (–)-grayanotoxin III, (+)-pricipinol E, and (–)-rhodomollein XX // Journal of the American Chemical Society. 2022. Vol. 144, Is. 12. P. 5268–5273.
10. Yeşil T., Akgül Y. Major components of *Rhododendron luteum* leaves // Nat Prod Res. 2023. Vol. 37, Is. 15. P. 2608–2612.
11. Liu X.J., Su H.G., Peng X.R., Bi H.C., Qiu M.H. An updated review of the genus *Rhododendron* since 2010: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology // Phytochemistry. 2024. No. 217. P. 113899.
12. Государственная фармакопея XV. [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 25.06.2024).
13. Тишина А.Н. Изучение химического состава листьев и цветков рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet) и рододендрона кавказского (*Rhododendron caucasicum* Pall.) // Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения: материалы Международной научно-практической конференции (Москва, 6–7 июня 2024 г.). М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2024. С. 286–290.