

УДК 547.814.5: 581.192: 582.998.1

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2024.47.18.002>

## ПОЛИФЕНОЛЬНЫЙ СОСТАВ ЦВЕТКОВ КОСМЕИ ДВАЖДЫ ПЕРИСТОЙ (*COSMOS BIPINNATUS* CAV.)

**Е.О. Куличенко**, ст. преподаватель, кафедра биологической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, [evgenia.kuli4enko@yandex.ru](mailto:evgenia.kuli4enko@yandex.ru)

SPIN: 4589-8406; ORCID: 0000-0002-0727-6689

**Э.Т. Оганесян**, доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, [edwardov@mail.ru](mailto:edwardov@mail.ru)

SPIN: 7712-0253; Researcher ID: ABI-2824-2020; ORCID: 0000-0002-2756-9382; Scopus Author ID: 9132988300

**С.В. Печинский**, канд. фарм. наук, доцент, кафедра фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, [hplc@yandex.ru](mailto:hplc@yandex.ru)

SPIN: 9798-4663; Researcher ID: AAN-3254-2020; ORCID: 0000-0002-9505-9990; Scopus Author ID: 55993869200

**А.Г. Курегян**, доктор фарм. наук, профессор, кафедра фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, [Kooreguyan@mail.ru](mailto:Kooreguyan@mail.ru)

SPIN: 4547-1787; Researcher ID: AAN-3267-2020; ORCID: 0000-0002-0698-8254; Scopus Author ID: 6506046751

**М.В. Ларский**, канд. фарм. наук, доцент, кафедра фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, [larsky.mikhail@gmail.com](mailto:larsky.mikhail@gmail.com)

РИНЦ SPIN-код: 9976-9947, Author ID: 664058

**К.Ю. Алешникова**, канд. фарм. наук, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Разработки и внедрения инновационных лекарственных средств», НОИ «Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, г. Москва, [k.aleshnikova@yandex.ru](mailto:k.aleshnikova@yandex.ru)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3241-7225>, SPIN-код: 8103-1800

**В.И. Зверева**, канд. фарм. наук, зав. научно-исследовательской лабораторией «Разработки и внедрения инновационных лекарственных средств», НОИ «Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, г. Москва, [valentinca1988@mail.ru](mailto:valentinca1988@mail.ru)

ORCID ID: 0000-0001-5274-3736; Scopus Author ID: 57204550246; РИНЦ SPIN-код: 3025-0252

**А.П. Плетень**, доктор биол. наук, профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, г. Москва, [pleatol@mail.ru](mailto:pleatol@mail.ru)

ORCID 0000-0003-4991-2150, SPIN-код: 8584-7191, Author ID: 178169

**Т.Ю. Татаренко-Козьмина**, доктор биол. наук, зав. кафедрой медицинской биологии с основами клеточной и молекулярной биотехнологии НОИ «Клиническая медицина им. Н.А. Семашко» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, г. Москва, [kosmtina025@gmail.com](mailto:kosmtina025@gmail.com)

ORCID: 0009-0000-86569-9209, SPIN-код: 5294-7399, Author ID: 786798

Дикорастущие и декоративные виды растений являются перспективными источниками биологически активных веществ, обладающих лечебными свойствами. Химический состав таких растений, как правило, мало изучен, однако именно они могут стать источником получения индивидуальных биологически активных соединений. С этой точки зрения представляет интерес космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus Cav.*). Цель исследования – изучить полифенольный состав цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea*, установить состав агликонов и моносахаридов, провести количественное определение бутеина в этом сырье. Объектом исследования являлись цветки космеи дваждыперистой сорта *Rosea*. Анализ сырья и экстракта из него проведен методами хроматографии на бумаге, ВЭЖХ с УФ- и масс-детектированием, спектрофотометрически по реакции взаимодействия с алюминия хлоридом. Методом хроматографии на бумаге (двумерный вариант) предварительно обнаружено 15 соединений полифенольной природы. Методом ВЭЖХ с масс-детектором идентифицировано 15 соединений. Хроматографический анализ агликонов, образовавшихся после кислотного гидролиза, свидетельствует о наличии 4-х производных 2-фенил-хромона и одного халкона – бутеина. После гидролиза были обнаружены моносахариды – глюкоза, галактоза, рамноза и глюкуроновая кислота. Суммарное содержание флавоноидов в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea*, определенное спектрофотометрически в пересчете на лютеолин, составило около 1,39%. Содержание бутеина в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea* в пересчете на сухое сырье было установлено на уровне 0,042%. Подтверждено наличие 15 полифенольных соединений в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea*. По сравнению с первичным стандартным образцом в сырье идентифицирован бутеин, установлено его количественное содержание.

Определено, что агликонами флавоноидов цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea* являются кверцетин, лютеолин, апигенин и тенаксин II, моносахаридами – глюкоза, галактоза, рамноза и глюкуроновая кислота.

**Ключевые слова:** космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus Cav.*), ВЭЖХ, масс-спектральный анализ, бутеин, твердофазная экстракция

Богатая флора нашей страны обладает большим запасом дикорастущих и декоративных видов растений, лечебные свойства и химический состав которых мало изучены. Возможно, именно они могут являться перспективными источниками для получения биологически активных веществ. С этой точки зрения определенный интерес представляет космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus Cav.*).

Представители рода *Cosmos Cav.* не являются фармакопейными и не используются в медицинской практике, однако многие из них достаточно широко применяются в народной медицине Северной и Южной Америки, Японии, Китая, Таиланда и Индии. Так, в традиционной медицине народов Бразилии семена и надземные части растений представителей рода *Cosmos Cav.* назначают при таких симптомах, как малярия, желтуха, перемежающаяся лихорадка, спленомегалия. Для этого растения описаны общетонизирующее, желчегонное, гепатопротекторное и инсектицидное действия [1–4]. Очевидно, что для однозначного определения взаимосвязи видов биологической активности этого растения с его биологически активными веществами необходимо подробное изучение последних [5].

**Цель** исследования – изучить полифенольный состав цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea*, установить состав агликонов и моносахаридов, провести количественное определение бутеина в этом сырье.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали цветки космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) сорта Rosea, выращенные в ботаническом саду ПМФИ и собранные в период вегетации летом 2021 г. Исследуемое сырье представляло собой смесь высушенных трубчатых цветков ярко-желтого цвета и язычковых цветков розового цвета.

*Получение экстракта цветков космеи дваждыперистой для изучения методом ВЭЖХ, масс-спектрометрии и хроматографии на бумаге.* Точную навеску (около 25,0 г) цветков космеи дваждыперистой сорта Rosea, измельченных до размера частиц 1 мм, помещали в круглодонную термостойкую колбу, прибавляли 100 мл спирта этилового 70%, пятикратно экстрагировали в течение 60 минут с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Извлечения объединяли, фильтровали и после кратковременного кипячения фильтрат сгущали в вакуумном роторно-испарительном аппарате до состояния густого экстракта. Для дальнейшего исследования 1 г густого экстракта растворяли в 25 мл спирта этилового 70%.

*Условия проведения анализа методом хроматографии на бумаге.* Анализ проводили в соответствии с требованиями ГФ XV [6], используя вариант восходящей двумерной хроматографии. Неподвижная фаза – бумага для хроматографии типа FN 7 – Ahlstrom (Munktell) размером 580×600 мм. Подвижная фаза I – 15% раствор уксусной кислоты, подвижная фаза II – бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5) [7,8]. Визуализацию зон адсорбции проводили с помощью анилин-фталатного реактива [8]. Для идентификации моносахаридов использовали стандартные образцы моносахаридов глюкозы, рамнозы, арабинозы, галактозы, глюконовой кислоты (Sigma-Aldrich).

*Методика и условия ВЭЖХ-анализа с масс-детектированием.* 2 мл экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта Rosea вносили

в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели объем раствора до метки спиртом этиловым 70%. Полученный раствор фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Phenomenex, США), отбрасывая первые порции фильтрата. Далее хроматографировали фильтрат согласно требованиям ГФ XV [6] в следующих хроматографических условиях: хроматографическая колонка – Luna C18(2) 150×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США); элюирование осуществляли в градиентном режиме (табл. 1): подвижная фаза А – 0,1% водный раствор кислоты муравьиной; подвижная фаза В – ацетонитрил; температура образцов – 20°C, температура колонки – 30°C; скорость подвижной фазы – 0,2 мл/мин. Перед инъекцией колонку уравнивали подвижной фазой 0,1% раствор кислоты муравьиной – ацетонитрил (95:5) в течение 20 минут при скорости потока 1 мл/мин и 10 минут при скорости потока 0,2 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл.

Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм, используя детектор VWD 3000 (Thermo Scientific, США) и масс-спектрометрически с использованием масс-спектрометра Amazon SL (Bruker, США) (табл. 2).

Идентификацию соединений осуществляли с использованием данных библиотеки масс-спектров NIST 18 и стандартных образцов хлорогеновой кислоты (C3878 Sigma-Aldrich),

Таблица 1

### ПРОГРАММА ГРАДИЕНТА

Время, мин.	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	95	5
10	85	15
40	70	30
60	5	95
80	5	95

Таблица 2

**ПАРАМЕТРЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА**

Источник ионизации	электроспрей (ESI)
Тип масс-анализатора	ионная ловушка (IonTrap)
Газ ионной ловушки	гелий
Газ-распылитель	азот
Газ-осушитель	азот
Давление газа-распылителя	30 psi
Поток газа-осушителя	10 л/мин
Температура интерфейса	250°C
Ионизация	отрицательная
Напряжение на капилляре	4500 В
Режим детектирования	SIM (-)
Диапазон сканирования	70–1100 m/z
Режим фрагментации	AutoMS (3)

рутина (78095 Sigma-Aldrich), бутеина (первичный стандартный образец получен в лаборатории кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторная серия – B0621, содержание бутеина в первичном стандартном образце – 99,62%).

*Методика кислотного гидролиза экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта Rosea.* Навеску экстракта около 10 г помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, растворяли в 20 мл воды при нагревании, к раствору прибавляли 20 мл 20% серной кислоты. Полученный раствор нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 120 минут. Далее гидролизат охлаждали,

переносили в делительную воронку и 10-кратно обрабатывали этилацетатом порциями по 5 мл. Этилацетатные извлечения объединяли, упаривали на водяной бане и подвергали хроматографированию методом двумерной хроматографии на бумаге.

*Методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин.* Определение проводили методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции взаимодействия с алюминия хлоридом [8–10].

Точную навеску (около 1,0 г) цветков космеи дваждыперистой сорта Rosea, измельченных до размера частиц 1 мм, помещали в круглодонную термостойкую колбу, прибавляли 30 мл спирта этилового 70%, троекратно экстрагировали в течение 60 минут с обратным холодильником на кипящей водяной бане, объединяя порции экстракта, охлаждали, фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки спиртом этиловым 70%.

*Исследуемый раствор.* 1,0 мл экстракта переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 4 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95%, 3–4 капли ледяной уксусной кислоты, после чего доводили до метки спиртом этиловым 95%. Измеряли оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения, полученного по следующей схеме: 1,0 мл извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 3–4 капли ледяной уксусной кислоты и доводили спиртом этиловым 95% до метки.

*Раствор стандартного образца лютеолина.* Точную навеску 0,0032 г стандартного образца лютеолина (2-NQH-43–1, TRC) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 25 мл спирта этилового 95% и нагревали на водяной бане до полного растворения. Далее раствор охлаждали при комнатной температуре и доводили до метки спиртом этиловым 95% (раствор А). 1 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл,

прибавляли 4 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95% и 3–4 капли ледяной уксусной кислоты и доводили до метки спиртом этиловым 95% (раствор Б). Измеряли оптическую плотность раствора Б относительно раствора сравнения, который аналогичен раствору Б стандартного образца лютеолина, но без добавления 4 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95%.

Оптические плотности растворов измеряли относительно растворов сравнения при 400 нм на спектрофотометре СФ-102 («Аквилон») в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в сырье (X, %) в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле 1:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot V_2 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot V_1 \cdot W_3 \cdot W_4 \cdot (100 - w)}, \quad (1)$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора; A<sub>0</sub> – оптическая плотность исследуемого раствора стандартного образца лютеолина; a – навеска сырья, г; a<sub>0</sub> – навеска стандартного образца лютеолина, г; W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub>, W<sub>4</sub> – объемы мерных колб, мл; V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> – объемы аликвот, мл; P – содержание основного вещества в стандартном образце лютеолина – 98%; w – влажность сырья, %.

*Методика количественного определения бутеина в цветках космеи дваждыперистой сорта Rosea методом ВЭЖХ.*

*Приготовление испытуемого раствора.* Около 2,5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 1 мм, помещали в круглодонную колбу объемом 250 мл, прибавляли 25 мл 70% спирта этилового и кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа. Процедуру экстракции повторяли дважды. Фракции экстракта объединяли, перенося в мерную колбу вместимостью 50 мл, и после охлаждения доводили до метки тем же растворителем (раствор А).

*Подготовка пробы для ВЭЖХ методом твердофазной экстракции.* 5 мл раствора А порциями по 250 мкл очищали на колонке для твердофазной экстракции (8B-S001-KDG, Strata C18-E, 2 г, 12 мл, Phenomenex), предварительно кондиционируя колонку 3 мл метанола. После введения пробы колонку промывали 5 мл воды очищенной, а далее проводили элюирование 5 мл спиртом этиловым 70%. Полученный единственный элюат упаривали до объема 3 мл, фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили объем раствора до метки, промывая фильтр тем же растворителем.

*Стандартный раствор.* Около 0,05 г (точная навеска) первичного стандартного образца бутеина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в подвижной фазе и доводили объем раствора до метки подвижной фазой, перемешивали (раствор А).

2,5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки подвижной фазой и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Далее хроматографировали испытуемый и стандартный растворы в хроматографических условиях, представленных в табл. 3.

Расчет содержания бутеина (X, %) в сырье в пересчете на сухое сырье в процентах проводили по формуле 2:

$$X = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot V_1 \cdot W_3 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot (100 - w)}, \quad (2)$$

где S<sub>x</sub> – площадь пика бутеина на хроматограмме испытуемого раствора; S<sub>0</sub> – площадь пика бутеина на хроматограмме стандартного раствора; a<sub>x</sub> – навеска сырья, г; a<sub>0</sub> – навеска стандартного образца бутеина, г; W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> – объем мерных колб, мл; V<sub>1</sub> – объем аликвоты, мл; P – содержание бутена в первичном стандартном образце – 99,62%; w – влажность сырья, %.

Таблица 3

**УСЛОВИЯ ВЭЖХ-АНАЛИЗА**

<b>Колонка</b>	Luna C18 Phenomenex, колонка 25×0,46 см, 5 мкм
<b>Подвижная фаза</b>	ацетонитрил – 0,05 моль/л фосфорная кислота (2:8)
<b>Режим хроматографирования</b>	изократический
<b>Скорость потока</b>	1 мл/мин
<b>Объем пробы</b>	20 мкл
<b>Детектор</b>	спектрофотометрический, 385 нм

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Изучение полифенольного состава цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea* провели с применением сепарационных методов, в частности хроматографии на бумаге, ВЭЖХ, твердофазной экстракции, а также спектральных методов – масс-спектрометрии и спектрометрии в УФ и видимой областях.

На двумерной хроматограмме экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea* было детектировано 15 зон адсорбции с коэффициентами подвижности и поведением, схожими с соединениями полифенольной природы [11]. Анализ хроматограмм с использованием диагностических реактивов позволил предварительно охарактеризовать вещества как флавоны, флавонолы, их гликозиды, фенолокислоты. Одно из веществ по хроматографической подвижности и характеру взаимодействия с диагностическими реактивами отнесено к халконам.

Результаты хроматографии на бумаге являлись предварительным экспериментом, поскольку селективность и чувствительность этого метода не позволяет однозначно судить

о качественном и количественном составе цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea*, поэтому далее экстракт был проанализирован более селективным сепарационным методом – ВЭЖХ.

Для идентификации компонентов экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea* применили метод ВЭЖХ с последующей масс-детекцией. Хроматограмма представлена на рис. 1.

Времена удерживания мажорных и минорных компонентов на хроматограммах воспроизводились с точностью ±0,2 мин. Идентификацию пиков на хроматограмме, представленной на рис. 1, осуществляли на основании данных масс-спектров (табл. 4). Величины *m/z* для фрагментированных пиков приведены в порядке уменьшения интенсивности сигналов для MS2-спектров.

Анализ полученных масс-сигналов соединений, относящихся к пикам 1–3, позволяет отнести их к производным кофеилхинной кислоты.

Для соединений 1 и 3 характерен ион-предшественник [M-H] – с *m/z* 353 и фрагментным ионом с *m/z* 191, что соответствует депротонированной хинной кислоте. Это характерно для кофеилхинных кислот, которым соответствуют 4 изомера, идентификация которых по масс-спектральным данным сопряжена с определенными трудностями. Для дифференцированной идентификации соединений использовали стандартный образец хлорогеновой кислоты. Совпадение времени удерживания раствора СО хлорогеновой кислоты с пиком соединения 1, а также наличие выраженных и интенсивных сигналов (10–50% относительно интенсивности базового пика) фрагментных ионов с *m/z* 179 и 135 позволили идентифицировать соединение 1 со временем удерживания около 26,5 мин. как 3-О-кофеилхинную (хлорогеновую кислоту), а соединение 3, имеющее очень слабые сигналы (около 3–4%) с *m/z* 179 и 135, как 4-О-кофеилхинную (неохлорогеновую) кислоту. Соединение 2 является

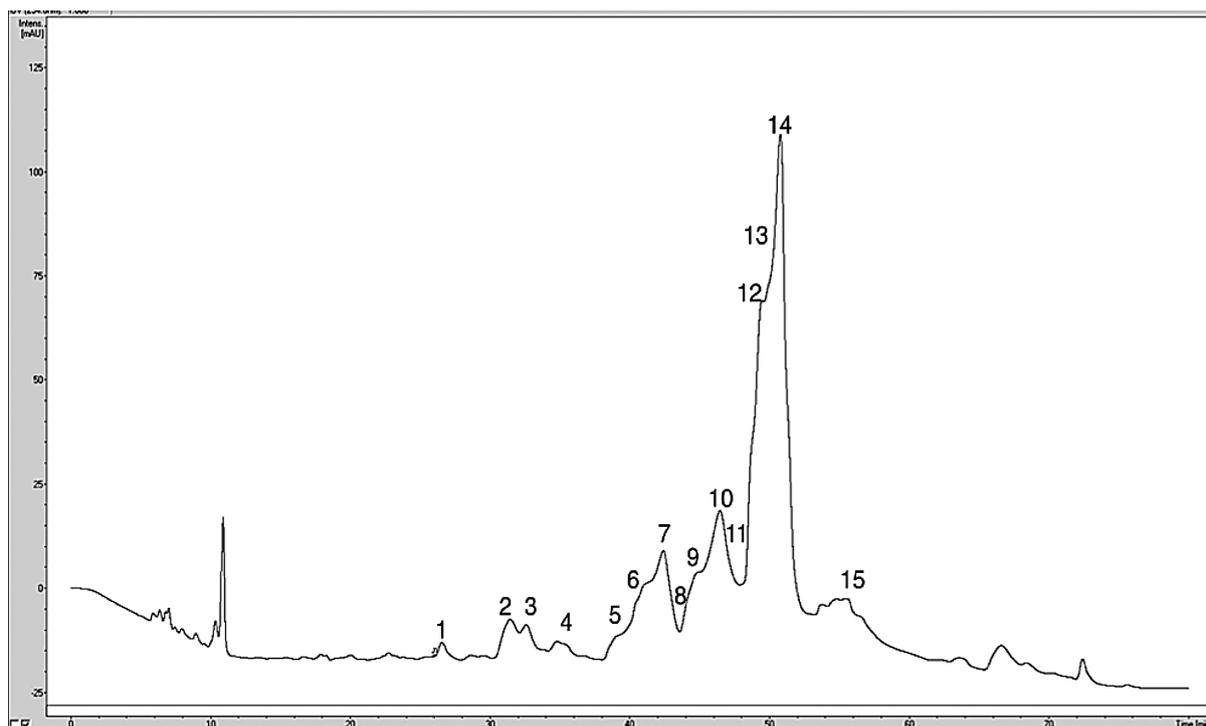


РИС. 1. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea*

Таблица 4

**РЕЗУЛЬТАТЫ КАЧЕСТВЕННОГО МАСС-СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА  
ЭКСТРАКТА КОСМЕИ ДВАЖДЫПЕРИСТОЙ СОРТА ROSEA**

Время удерживания	m/z прекурсор	MS2-фрагменты	Соединение
26,5	353	191, 179, 135	хлорогеновая кислота (1)
31,3	707	353	димер кофеилхинной кислоты (2)
32,1	353	191, 179	неохлорогеновая кислота (3)
35,0	433	279, 135, 253	кареопсин (4)
38,6	609	301, 273, 343, 255, 179	рутин (5)
38,8	707	609, 513, 301	производное рутина (6)
42,5	463	301, 179	кверцетин-О-гексозид (7)
43,6	463	301, 179, 271, 343	кверцетин-гексозид (8)
45,0	477	301, 179	нелумбозид (кверцетин-3-глюкуронид) (9)
46,6	433	271, 301	кверцетин-О-пентозид (10)
46,8	461	285, 199, 151	лютеолин-О-глюкуронид (11)
50,0	445	269, 175	апигенин-7-О-глюкуронид (12)
51,5	475	299, 175	тенаксинII-7-О-глюкуронид (13)
52,2	515	353, 191, 173	дикофеилхинная кислота (14)
55,8	271	135, 153	бутеин (15)

димером кофеилхинной кислоты, так как ион-предшественник с  $m/z$  707 имеет один фрагмент с  $m/z$  353.

Соединению 4 соответствует ион-предшественник [M-H] – с  $m/z$  433 и основным фрагментом с  $m/z$  271, образовавшимся за счет потери остатка глюкозы [M-H-glucose]-, и очень слабым пиком [M-H-glucose-H<sub>2</sub>O]-.

Соединения 5 и 6 со временами удерживания 38,6 и 38,8 мин. соответственно идентифицированы как рутин и производное кверцетина, которые при фрагментации, теряя углеводный остаток, дают фрагментный ион кверцетина с  $m/z$  301. Наличие рутина также подтверждено с использованием его стандартного образца по совпадению времени удерживания.

Соединения, соответствующие пикам на хроматограмме 7, 9, 10, 11, идентифицированы как гликозиды кверцетина. Масс-спектры веществ 7 и 8 соответствуют иону-предшественнику с  $m/z$  463, который фрагментируется до иона с  $m/z$  301 за счет потери остатка гексозы (вероятно, глюкозы). Полученные полосы по значениям  $m/z$  полностью соответствуют известной схеме фрагментации пика кверцетина. Масс-спектры соединений 9 и 10 характеризуются ионами-продуктами с  $m/z$  301, что соответствует агликону кверцетина, однако  $m/z$  ионов-предшественников 477 и 433 позволяют отнести соединения 9 и 10 к кверцетин-О-глюкурониду (нелумбозиду) и кверцетин-3-О-пентозиду соответственно.

Масс-спектр вещества 11 соответствует иону-предшественнику с  $m/z$  445, который дает ион-продукт с  $m/z$  285 за счет потери остатка глюкуроновой кислоты, а агликоном является лютеолин, что подтверждается характеристическими пиками с  $m/z$  199 и 151. Соединение 11 является его гликозидом и представляет собой лютеолин-О-глюкуронид.

Соединению 12 соответствует ион-предшественник с  $m/z$  445 и ион-продукт с  $m/z$  269 [M-H-176 (glucuronic)], а также характеристический ион с  $m/z$  175, что позволяет идентифицировать его как апигенин-7-О-глюкуронид.

Масс-спектру соединения 13 соответствует ион-предшественник с  $m/z$  475. MS<sup>2</sup>-спектр дает базовый пик с  $m/z$  299 (-176 Da), что, возможно, связано с потерей остатка глюкуроновой кислоты. Фрагментация иона с  $m/z$  299 дает пик с  $m/z$  284 (-15 Da) за счет предполагаемого деметилирования. Соединению 13 может соответствовать тенаксинII-глюкуронид, в котором остаток уроновой кислоты связан по С-7 ядра флавола.

Масс-спектру соединения 14 соответствуют ион-предшественник с  $m/z$  515 и фрагментные ионы  $m/z$  353, 191, 173, 255, 299, что позволяет отнести его к дикофеилхинной кислоте. Точная дифференциация изомера дикофеилхинной кислоты по масс-спектральным данным затруднена, путем сопоставления интенсивностей сигналов ионов-продуктов можно предположить, что идентифицирована 4,5-дикофеилхинная кислота.

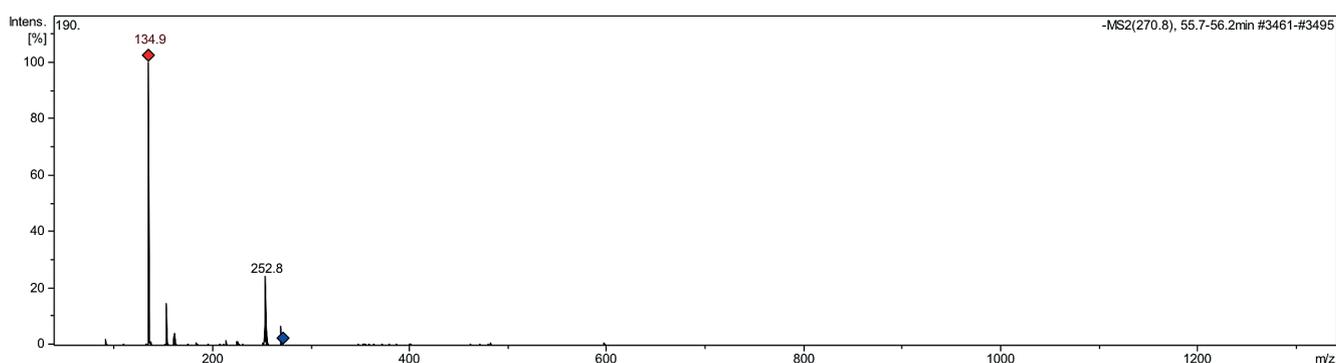


РИС. 2. MS<sup>2</sup>-спектр соединения 15

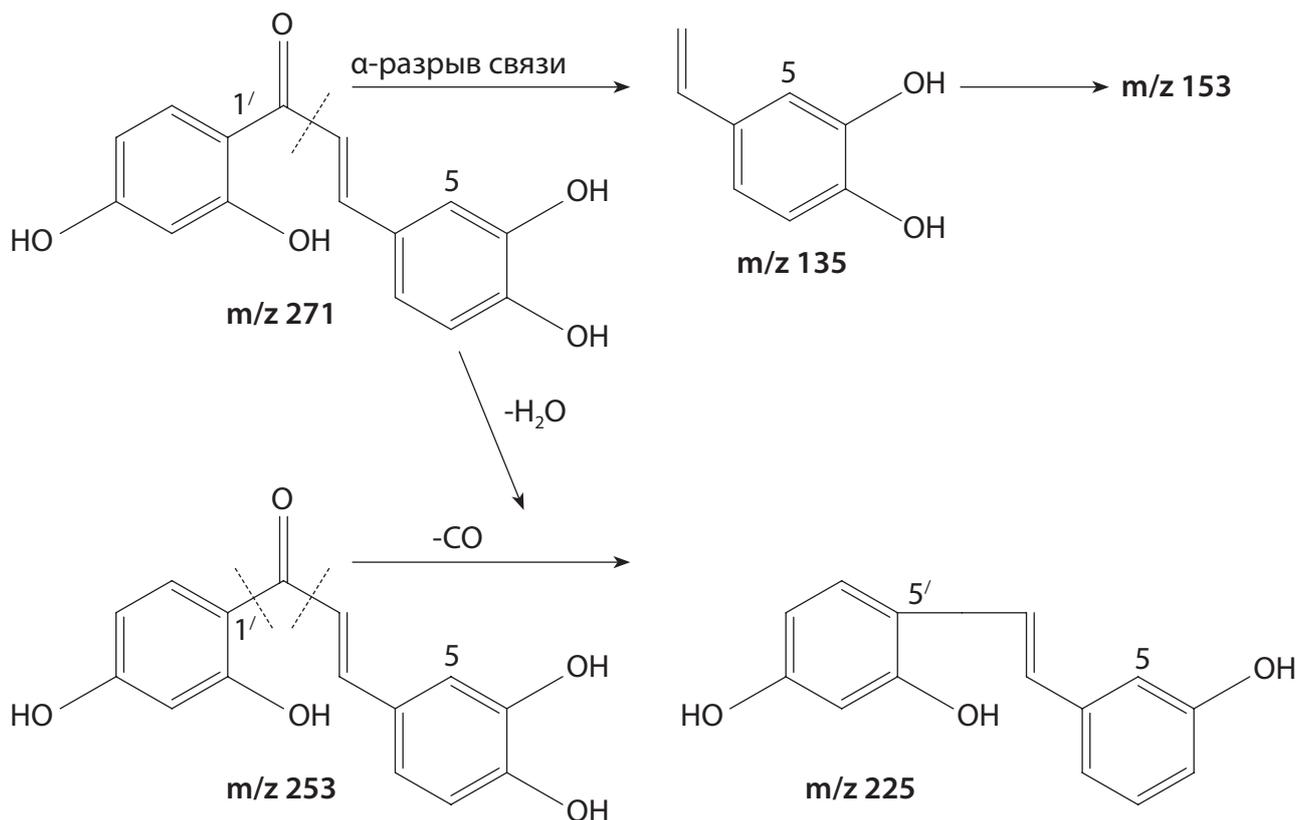


РИС. 3. Схема фрагментации бутеина

Соединение 15 проявляется в масс-спектре (рис. 2) ионом-предшественником [M-H]<sup>-</sup> с m/z 271, который фрагментируется до ионов с m/z 253, 223 и 135. Полученные результаты фрагментации молекулы соответствуют модели фрагментации, описанной в отношении бутеина (рис. 3).

С целью доказательства природы агликонов и подтверждения выводов ВЭЖХ мы осуществили кислотный гидролиз полученного экстракта. Хроматографический анализ агликонов, образовавшихся после кислотного гидролиза, свидетельствует о наличии 4-х производных 2-фенил-хромона и одного

Таблица 5

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ  
В ЦВЕТКАХ КОСМЕИ ДВАЖДЫПЕРИСТОЙ СОРТА ROSEA**

№ измерения	Навеска сырья	Значение оптической плотности	Суммарное содержание флавоноидов, %	Метрологические характеристики
1.	1,0087	0,552	1,41	$\bar{x} = 1,397$ SD = 0,012 RSD = 0,87
2.	1,0012	0,534	1,38	
3.	1,0056	0,546	1,40	
4.	1,0034	0,540	1,39	
5.	1,0066	0,550	1,41	
6.	1,0009	0,540	1,39	

халкона – бетеина. В гидролизате по сравнению со стандартными образцами были идентифицированы следующие моносахариды: глюкоза, галактоза, рамноза и глюкуроновая кислота.

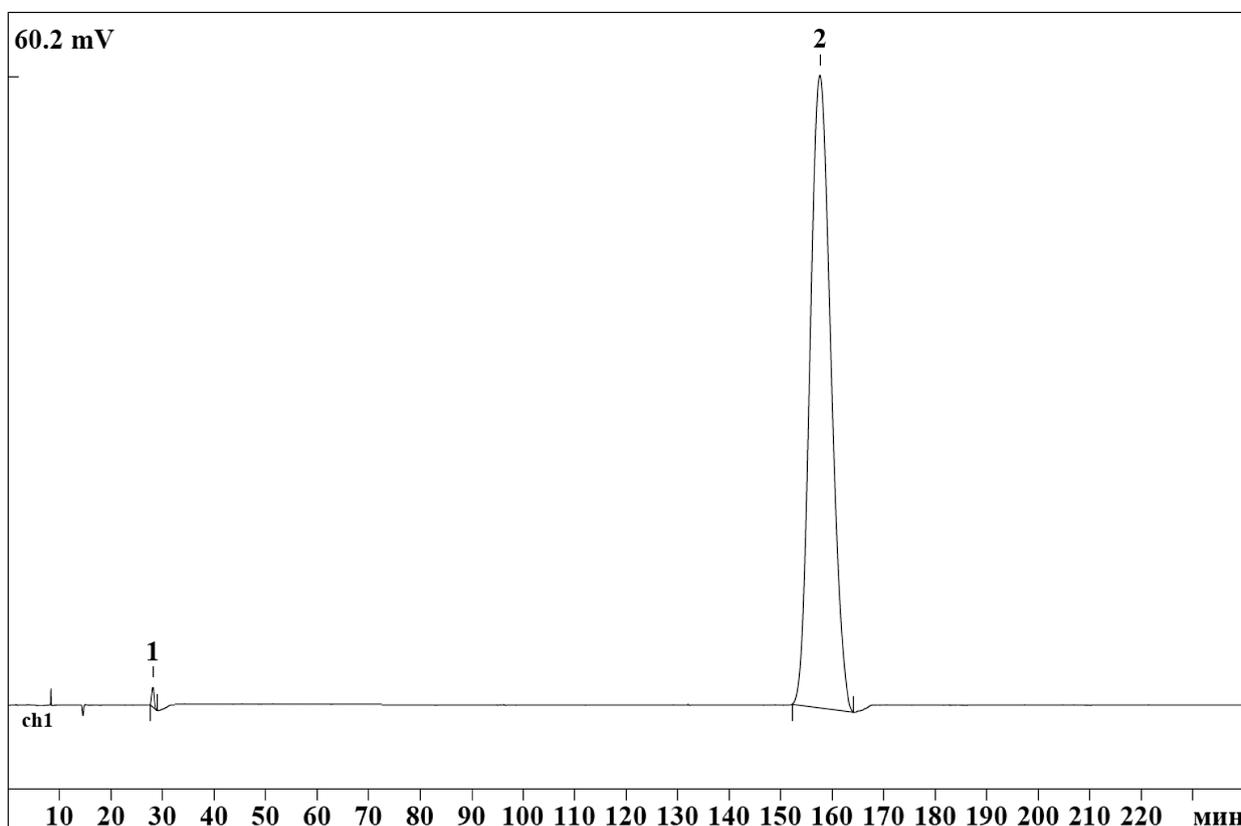
Количественное определение суммы флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии по общепринятой реакции образования комплекса алюминия хлорида [10] в пересчете на лютеолин, используя в качестве аналитической длину волны при 400 нм, которая характеризуется максимумом поглощения для комплекса лютеолина с алюминия хлоридом (табл. 5) [8,9].

Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в цветках космеи дваждыперистой сорта Rosea составило  $1,4\% \pm 0,87\%$ .

Бетеин не является доминирующим представителем класса флавоноидов в цветках космеи дваждыперистой сорта Rosea, однако он может служить маркерным соединением для растений, содержащих данный халкон,

и определять антибактериальную активность этого вида растительного сырья. Доказательство его наличия в растении повышает достоверность идентификации сырья, особенно в смесях (сборах) и готовых лекарственных формах. Для определения бетеина, как правило, следует располагать стандартным образцом данного соединения, в связи с чем нами осуществлен синтез субстанции данного халкона и на ее основе согласно ГФ XV получен первичный стандартный образец [6].

Для определения количественного содержания бетеина в цветках космеи дваждыперистой сорта Rosea проводили последовательное хроматографирование испытуемого раствора и раствора первичного стандартного образца бетеина. Порядок выхода веществ на хроматограмме стандартного раствора был следующий: 1 – протокатеховый альдегид ( $t=28,64$  мин., исходный продукт синтеза, содержание примеси в стандартном образце  $0,38\%$ ), 2 – резецетофенон ( $t=66,4$  мин., исходный продукт синтеза,



**РИС. 4.** Хроматограмма первичного стандартного образца бетеина

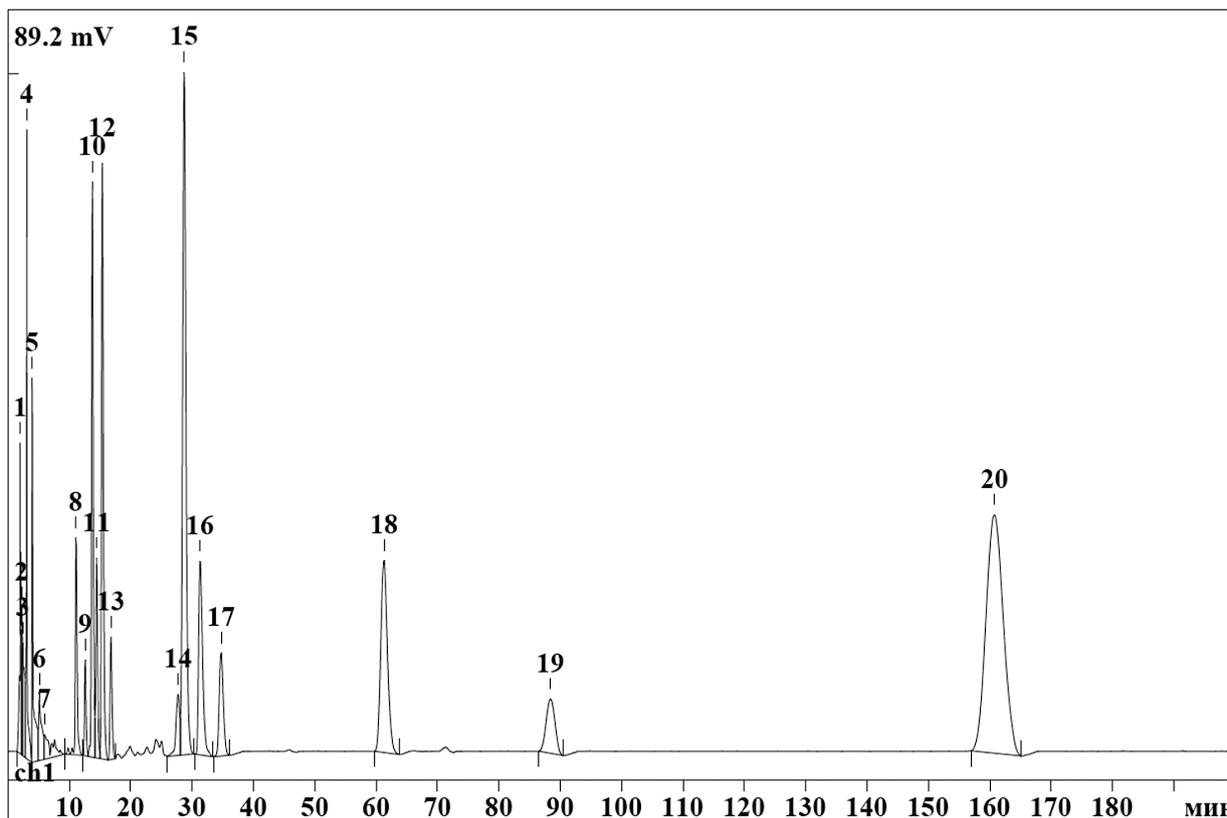


Рис. 5. Хроматограмма раствора экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта Rosea

содержание примеси в стандартном образце не обнаружено), 3 – бутеин ( $t=160,07$  мин., основной продукт синтеза, содержание в первичном стандартном образце – 99,62%) (рис. 4).

Для достоверной идентификации бутеина по времени удерживания в изучаемом сырье

было проведено шестикратное хроматографирование раствора первичного стандартного раствора бутеина. В результате проведенных исследований установлено, что время удерживания бутеина находилось в интервале от 159,18 до 161,25 мин. при среднем значении

Таблица 6

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ БУТЕИНА В ЦВЕТКАХ КОСМЕИ ДВАЖДЫПЕРИСТОЙ СОРТА ROSEA, ОПРЕДЕЛЕННОЕ МЕТОДОМ ВЭЖ**

№	Содержание бутеина в пересчете на сухое вещество, %	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологические характеристики
1.	0,042	-0,0003	0,00000011	$\bar{x} = 0,0423$ $SD = 0,0005$ $RSD = 1,22$
2.	0,043	0,0007	0,00000044	
3.	0,042	-0,0003	0,00000011	
4.	0,043	0,0007	0,00000044	
5.	0,042	-0,0003	0,00000011	
6.	0,042	-0,0003	0,00000011	

160,07 мин., стандартное отклонение определения (SD) – 0,72, относительное стандартное отклонение (RSD) – 0,45. Таким образом, в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea* идентифицирован бутеин – пик 20 со временем удерживания 160,7 мин. (рис. 5).

Для определения количественного содержания бутеина в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea* в пересчете на сухое сырье было проведено шесть параллельных определений, результаты которых приведены в табл. 6.

Таким образом, содержание бутеина в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea* в пересчете на сухое сырье составило 0,042%.

## ВЫВОДЫ

Изучен полифенольный состав цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea* методом ВЭЖХ с масс-детектированием, идентифицировано 15 соединений. По сравнению с первичным стандартным образцом в изучаемом растительном сырье идентифицирован бутеин.

Сочетанием кислотного гидролиза экстракта цветков космеи дваждыперистой сорта *Rosea* и хроматографии на бумаге предварительно установлено, что агликонами флавоноидов являются кверцетин, лютеолин, апигенин и тенаксин II, что далее было подтверждено результатами ВЭЖХ-анализа в сочетании с УФ- и масс-детекторами.

Методом спектрофотометрии по фотохимической реакции с алюминия хлоридом определено суммарное содержание флавоноидов в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea* в пересчете на лютеолин, которое составило  $1,4\% \pm 0,87\%$ .

Используя разработанную нами ВЭЖХ-методику количественного определения бутеина в цветках космеи дваждыперистой сорта *Rosea*, определено количественное содержание бутеина в сырье –  $0,042 \pm 1,2\%$ .

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Saleem M., Ali H.A., Akhtar M.F. et al. Chemical characterisation and hepatoprotective potential of *Cosmos sulphureus* Cav. and *Cosmos bipinnatus* Cav. // *Nat. Prod. Res.* – 2019; 33(6): 897–900.
2. Liu Y., Yu X., Feng Y. et al. Physiological and transcriptome response to cadmium in cosmos (*Cosmos bipinnatus* Cav.) seedlings // *Sci. Rep.* – 2017; 7(1): 1–16.
3. Куличенко Е.О., Оганесян Э.Т., Андреева О.А. и др. Фармакогностическое изучение *Cosmos bipinnatus* Cav. (сем. Asteraceae), культивируемой в Западном Предкавказье // *Химия растительного сырья.* – 2023; 2: 231–240.
4. Куличенко Е.О., Андреева О.А., Сергеева Е.О. и др. Фармакологическая активность извлечений растений вида *Cosmos bipinnatus* Cav. // *Фармация и фармакология.* – 2022; 10(1): 82–92.
5. Piras C., Tilocca B., Castagna F. et al. Plants with Antimicrobial Activity Growing in Italy: A Pathogen-Driven Systematic Review for Green Veterinary Pharmacology Applications // *Antibiotics (Basel).* – 2022. 11(7): 1–14.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 15-е изд. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>
7. Поздняков Д.И., Аджахметова С.Л., Червонная Н.М. и др. Сравнительное изучение фенольного состава и антиоксидантной активности полупаразита *Viscum album* L. и листьев растений – хозяев *Malus domestica* Borkh., *Pyrus communis* Borkh., *Pyrus communis* L. // *Химия растительного сырья.* – 2023; 1: 287–296.
8. Аджахметова С.Л., Червонная Н.М., Поздняков Д.И. и др. Изучение суммарного содержания антиоксидантов, полисахаридов, элементного состава и аминокислот растительного сырья смородины черной //

- Химия растительного сырья. – 2021; 3: 265–274.
9. Аджиахметова С.Л., Червонная Н.М., Поздняков Д.И. и др. Содержание фенолов (в том числе флавоноидов) и антиоксидантов в листьях *Viscum album* L. и *Pyrus communis* L. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021; 24(2): 15–22.
10. Адамцевич Н.Ю., Закржевская Е.И., Феськова Е.В. и др. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях *Lithospermum officinale* (Boraginaceae) // Растительные ресурсы. – 2022; 5(1): 100–108.
11. Mykchailenko O.O., Kovalyov M.V. Phenolic compounds of the genus *Iris* plants (Iridaceae) // Ceska-Slov. Farm. – 2016; 65(2): 70–7.

## POLYPHENOLIC COMPOSITION OF FLOWERS *COSMEA* DOUBLE FINATE (*COSMOS BIPINNATUS* CAV.)

**E.O.Kulichenko<sup>1</sup>, E.T.Oganesyan<sup>1</sup>, S.V.Pechinsky<sup>1</sup>, A.G.Kuregyan<sup>1</sup>, M.V.Larsky<sup>1</sup>, K.Y.Aleshnikova<sup>2</sup>, V.I. Zvereva<sup>2</sup>, A.P. Pleten<sup>2</sup>, T.Y. Tatarenko-Kozmina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education VolgGMU of the Ministry of Health of Russian Federation, Pyatigorsk, Russia

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution Of Higher Education “Russian University of Medicine” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

*Wild and ornamental plant species exhibiting medicinal properties are potentially promising sources of biologically active substances. As a rule, the chemical composition of such plants is poorly understood, but they can become a source for the production of individual biologically active compounds. The purpose of the study is to study the polyphenolic composition of 70% alcohol extract of *Cosmos bipinnatus* flowers, to establish the composition of aglycones and monosaccharides, as well as to develop a method for the quantitative determination of butein in this raw material 15 compounds were identified using HPLC with a mass detector. When compared with the primary standard sample, butein was identified in the raw material and its quantitative content was established. It was determined that the aglycones of flavonoids are quercetin, luteolin, apigenin and phenaxin II, and monosaccharides are glucose, galactose, rhamnose and glucuronic acid.*

**Keywords:** *Cosmos bipinnatus* Cav., HPLC, mass spectral analysis, butein, solid-phase extraction