

УДК 615.322:612.397.1

DOI: 10.18413/2313-8955-2017-3-1-56-62

Лозовицкий Д.А.

ИЗУЧЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ТРАВЫ *TARAXACUM OFFICINALE* WIGG

Алтайский государственный медицинский университет, проспект Ленина, 40, г. Барнаул, 656054, Россия, E-mail: d.loz@inbox.ru

Аннотация

В работе приводятся результаты исследования фотосинтетических пигментов травы *Taraxacum officinale*, произрастающей в Алтайском крае. Определён выход липофильной фракции по фазам вегетации исследуемого сырья. Методом ТСХ и спектрофотометрии идентифицированы: β -каротин, лютеин, виолоксантин, неоксантин, тараксантин, хлорофилл а и хлорофилл b. Наиболее эффективной для качественного анализа каротиноидов методом ТСХ можно считать подвижную фазу ацетон-петролейный эфир (3:7). Предложенная в работе методика ТСХ может быть использована для включения в современную нормативную документацию на лекарственное растительное сырье одуванчика лекарственного. Экспериментально подобраны условия спектрофотометрической методики определения пигментов в траве *Taraxacum officinale*. Количественно по фазам вегетации определены сумма каротиноидов (в пересчете на виолоксантин) и хлорофилла. Для использования сырья в качестве источника каротиноидов наиболее оптимальным является сбор сырья в фазу бутонизации. Изучаемый вид лекарственного растительного сырья может найти дальнейшее применение при использовании в клинической практике лечения различных заболеваний.

Ключевые слова: одуванчик лекарственный; *Taraxacum officinale*; трава; каротиноиды; каротин; ксантофилл; хлорофилл; липофильные вещества; тонкослойная хроматография; спектрофотометрия.

Lozovitsky D.A.

THE STUDY OF LIPOPHILIC SUBSTANCES OF *TARAXACUM OFFICINALE* WIGG HERB

Altai State Medicine University, 40 Lenin Ave., Barnaul, 656054, Russia. E-mail: d.loz@inbox.ru

Abstract

In our paper, we provide some results of the research of photosynthetic pigments of *Taraxacum officinale* herb which grows in Altai region. The yield of lipophilic fraction was determined in different vegetation phases of the studied raw-material. By the TLC and spectrophotometry the following compounds were identified: β -carotene, lutein, violaxanthin, neoxanthin, taraxanthin, chlorophyll a and chlorophyll b. For the TLC analysis, the mobile phase of acetone-petroleum ether (3:7) proved to be the most efficient. The TLC method proposed in the paper can be used for inclusion dandelion (*Taraxacum officinale*) into the modern normative documents on medicinal raw material.

The conditions of spectrophotometric method of pigments determination in *Taraxacum officinale* herb were experimentally chosen. The total amount of carotenoids and total amount of chlorophyll were determined for different vegetation phases of *Taraxacum officinale* herb. For using as a carotenoids source the most optimal vegetation phase for collection of raw material is the budding phase. The studied medicinal plant may find future application in clinical treatment of various diseases.

Keywords: dandelion; *Taraxacum officinale*; herb; carotenoids; carotene; xanthophyll; chlorophyll; lipophilic substances; thin layer chromatography; spectrophotometry.

Введение. Ключевым моментом фармацевтического производства в процессе переработки лекарственного растительного сырья является внедрение малоотходных технологий,

поэтому в настоящее время перспективным направлением является комплексная переработка сырья, основанием для которой служит его разноплановое химическое изучение.

Вещества липофильной природы (каротиноиды, хлорофилл) являясь важнейшими структурными элементами клеток, принимают активное участие в различных метаболических, регуляторных и обменных процессах, в связи с чем, несомненно, представляют интерес в плане фармакологической активности.

По данным литературных источников хлорофилл обладает широким спектром биологического действия, проявляет усиливающее действие на процессы кроветворения, антимикробную активность, оказывает тонизирующее действие, регулирует работу сердца, нервно-мышечного аппарата, дыхательного центра и др. [6].

Каротиноиды являясь предшественником витамина А обладают достаточно большим перечнем важных фармакологических свойств, таких как антиоксидантная, радиопротекторная, фотопротекторная, антиканцерогенная и иммуномодулирующая активности [2].

Таким образом, изучение липофильного комплекса является актуальной и перспективной задачей.

Объекты и методы исследования.

Объектом исследования служили образцы воздушно-сухой измельченной надземной части одуванчика лекарственного, заготовленные в Алтайском крае (2013-2016 гг.) в различные фазы вегетации: бутонизация, цветение, плодоношение.

Определение содержания суммы липофильных веществ проводили гравиметрическим методом, следующим образом – 5.0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл с притёртой пробкой. С помощью пипетки заливали 25 мл ацетона. Далее проводили экстракцию, при периодическом перемешивании, в течение 1.5 ч. Экстракцию новыми порциями ацетона повторяли несколько раз – до обесцвечивания экстракта. Объединённые ацетоновые экстракты отфильтровывали через бумажный фильтр. Затем 10 мл экстракта помещали в предварительно взвешенную выпарительную чашку, упаривали на водяной бане и высушивали в сушильном шкафу при 100-105°C в течение 30 мин. Чашку охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Содержание суммы липофильных веществ, в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле Ветрова [1]:

$$X = \frac{m_{л.ф.} \times 100 \times 100}{m_n \times (100 - W)}, \text{ где}$$

$m_{л.ф.}$ – масса липофильной фракции, г;

m_n – навеска навески сырья, г;

W – влажность сырья, %

Качественный анализ составляющих липофильную фракцию веществ проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» ГФ XIII издания в следующих условиях: хроматографические пластинки марки «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (Краснодар, РФ) размером 5×10 см с алюминиевой подложкой, элюент: I – гексан-бензол (29:1), II – ацетон-петролейный эфир (3:7) во избежание обесцвечивания хроматографических зон камеру затемняли черной бумагой, проявитель не использовали [7]. Хроматографирование проводили в нескольких повторностях.

Идентификацию веществ на хроматограммах осуществляли в видимом и УФ-свете (365 нм) по характерному цвету зон и величинам коэффициента подвижности (Rf), описанным в литературе [5].

С дубликатных хроматограмм каждое обнаруженное пятно каротиноидов и хлорофилла вырезали, измельчали и элюировали: каротин – хлороформом, ксантофиллы – спиртом этиловым.

Спектральные характеристики элюатов регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 (РФ) в диапазоне длин волн 200-900 нм.

Определение содержания суммы каротиноидов и хлорофиллов проводили методом прямой спектрофотометрии. Около 2.0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещали в плоскодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл и экстрагировали 50 мл 70% этилового спирта в течение 30 мин. После охлаждения извлечение декантировали и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остаток в колбе заливали 50 мл 70% спирта этилового и экстрагировали еще раз в течение 30 мин. Объединённые извлечения в мерной колбе доводили 70% этиловым спиртом до метки (раствор А). 4 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем 95% этиловым спиртом до метки (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (РФ) в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 443±3 нм (каротиноиды в пересчете на виолоксантин) и 667±1 нм (хлорофиллы). Раствором сравнения служил 95% этиловый спирт. Содержание суммы каротиноидов и хлорофилла в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формулам (1 и 2) соответственно [4]:

$$X = \frac{A \times 100}{m \times 4 \times (100 - W)}, \text{ где (1)}$$

$$X = \frac{A \times 25 \times 100 \times 100}{m \times 944,5 \times 4 \times (100 - W)}, \text{ где (2)}$$

A – оптическая плотность раствора Б в соответствующем максимуме поглощения;
m – масса сырья, г;
W – потеря в массе при высушивании сырья, %;
2500 – удельный показатель поглощения виолоксантина при 442±2 нм;
944.5 – удельный показатель поглощения хлорофилла при 663±5 нм.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIII издания [2].

Результаты и их обсуждение. Полученные липофильные фракции представляли собой смолистые жидкости зелёно-коричневого цвета, с характерным запахом, нерастворимые в воде и спирте, растворимые в хлороформе, гексане, этилацетате.

Результаты определения выхода липофильной фракции по фазам вегетации представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты определения динамики накопления суммы липофильных соединений в траве *Taraxacum officinale*

Table 1

The results of the dynamics of the accumulation of the amount of lipophilic compounds in *Taraxacum officinale* herb

Фаза вегетации	Выход липофильных соединений*		
	X±Δx, %	S _x	ε, %
бутонизации	2.43±0.12	0.04	5.61
цветения	2.52±0.14	0.05	5.56
плодоношения	2.72±0.31	0.03	5.12

Примечание*: n=5, P=95%, t_p=2.78, в пересчёте на абсолютно-сухое сырье

Чтобы избежать окисления, предотвращения фотоизомеризации и деградации каротиноидов подготовка образцов для анализа проводилась при охлаждении льдом и в темноте.

При исследовании липофильной фракции методом ТСХ наличие каротиноидов определяли по характерным жёлто-оранжевым и жёлтым окраскам пятен.

Хлорофиллы на хроматограммах в видимом свете имели сине-зелёное окрашивание и розовую флуоресценцию в УФ-свете (рис. 1).

В виду того, что β-каротин имеет яркий жёлто-оранжевый цвет, обусловленный наличием в структуре его молекулы системы сопряжённых двойных связей, идентификацию на хроматограмме возможно проводить визуально, без применения каких-либо детектирующих реагентов. В отличие от хлорофиллов каротиноиды не поглощают красные лучи и не обладают способностью к флуоресценции, поэтому их зоны на хроматограммах приобретают только более тёмную, т.е. коричневую окраску.

Кроме зоны β-каротина, идентифицированной в системе I по величине R_f (0.37±0.01), обнаружены и другие хроматографические зоны каротиноидов с величинами коэффициентов подвижности 0.51±0.02 и 0.82±0.02, постепенно исчезающие под действием света.

При изучении извлечений, приготовленных с помощью ацетона (1) и гексана (2) с использованием подвижной фазы II идентифицировали: β-каротин (R_f 0.98±0.01, окраска в видимом свете жёлто-оранжевая), хлорофилл а (R_f 0.94±0.01), хлорофилл b (R_f 0.84±0.02) и неизвестный хлорофилл (R_f 0.16±0.01) с окрасками идентичными хлорофиллу а, но более светлых оттенков. Помимо этого в области значения R_f 0.80±0.02 проявлялось жёлтое пятно ксантофилла, более интенсивное в ацетоновом извлечении. Хроматографическое поведение, т.е. характер флуоресценции ещё трёх зон адсорбции и их коэффициенты подвижности (R_f 0.56±0.01; 0.49±0.02; 0.44±0.02) позволили также их отнести к группе ксантофиллов.

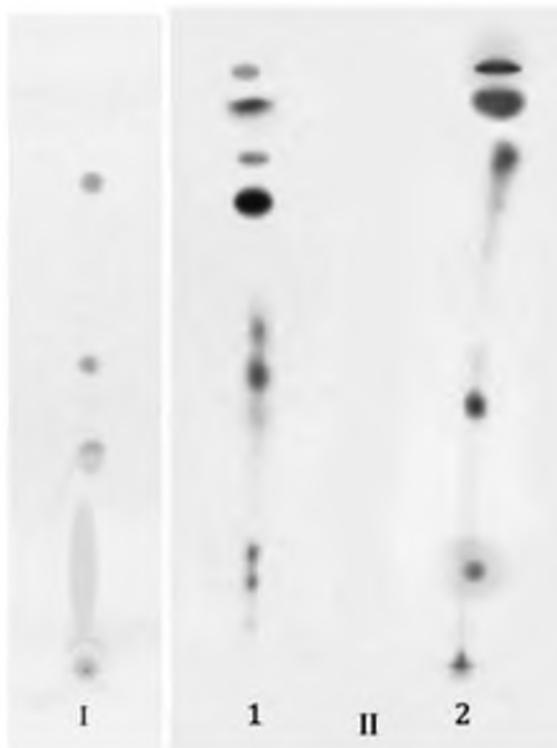


Рис. 1. ТСХ извлечений из травы *Taraxacum officinale* в системе:
I – гексан-бензол (29:1); II – ацетон-петролейный эфир (3:7)
Fig. 1. TLC of extracts from *Taraxacum officinale* herb in the system:
I – benzene-hexane (29: 1); II – acetone-petroleum ether (3: 7)

Дальнейшую идентификацию компонентов каротиноидного комплекса травы одуванчика лекарственного проводили по спектрам поглощения соответствующих элюатов.

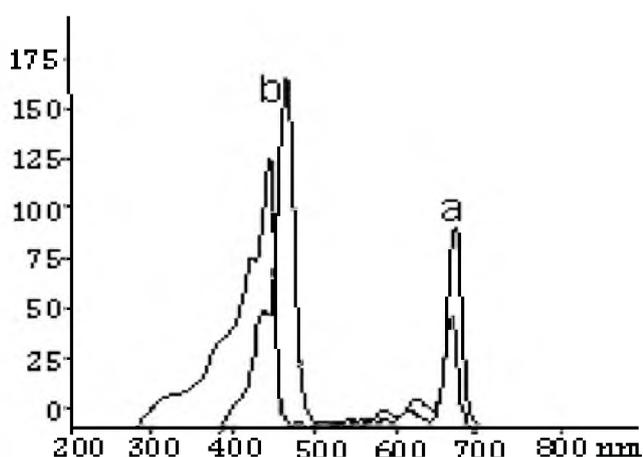
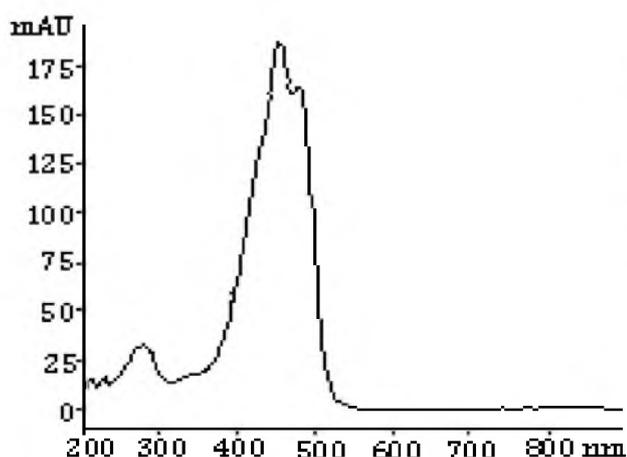
Спектры поглощения каротиноидов в большинстве случаев характеризуются наличием трёх максимумов поглощения или двух максимумов поглощения и плеча в интервале длин волн от 270 до 550 нм (рис. 2).

Идентификацию полученных электронных спектров проводили в соответствии с

литературными данными, результаты представлены в таблице 2.

Максимумы поглощения в диапазоне 413-422, 440-456, 472-482 нм соответствуют спектрам каротиноидов.

Важной особенностью спектра поглощения хлорофилла *a* и *b* служит наличие у них двух ярко выраженных максимумов: в красной при 660 и 640 нм и в сине-фиолетовой областях спектра – при 420 и 450 нм соответственно.



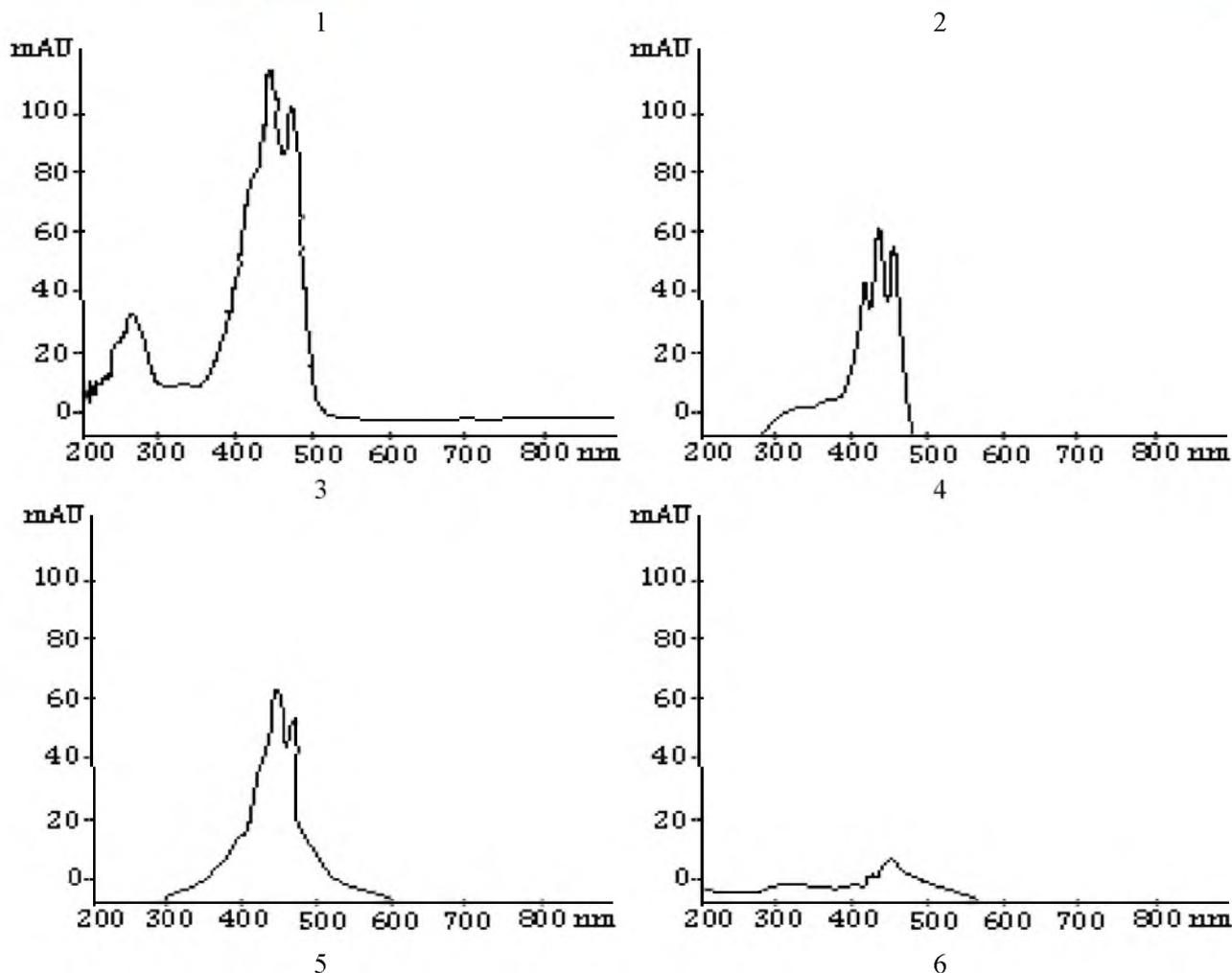


Рис. 2. УФ-спектр элюированных с хроматограмм пигментов травы *Taraxacum officinale*: 1 – β -каротин; 2 – хлорофилл; 3 – лютеин; 4 – виолоксантин; 5 – тараксантин; 6 – неоксантин

Fig. 2. Fig. 2. UV spectrum of the pigments eluted from the chromatogram of *Taraxacum officinale* herb: 1 – β -carotene; 2 – chlorophyll; 3 – lutein; 4 – violaxanthin; 5 – taraxanthin; 6 – neoxanthin

Таблица 2

Спектральная и хроматографическая характеристики пигментов травы *Taraxacum officinale*

Table 2

The spectral and chromatographic characteristics of pigments of *Taraxacum officinale* herb

Компонент	λ max, nm	Растворитель	Rf*
β -каротин	290, 440, 456, 482	хлороформ	0.98 \pm 0.01
лютеин	282, 422, 447, 474	спирт этиловый	0.80 \pm 0.02
виолоксантин	418, 443, 472	спирт этиловый	0.56 \pm 0.01
неоксантин	413, 422, 448	спирт этиловый	0.49 \pm 0.02
тараксантин	420, 443, 470	спирт этиловый	0.44 \pm 0.02
хлорофилл a	290, 413, 420, 660	спирт этиловый	0.94 \pm 0.01
хлорофилл b	405, 450, 640	спирт этиловый	0.84 \pm 0.02

Примечание: * подвижная система ацетон-петролейный эфир (3:7)

В результате количественной оценки площади хроматографических зон и значения оптической плотности предположили что основными каротиноидами в траве одуванчика

лекарственного являются: β -каротин, лютеин, виолоксантин и тараксантин (рис. 2).

Каротиноиды играют роль вспомогательных светособирающих пигментов, их спектры

поглощения характеризуются двумя полосами в фиолетово-синей и синей области от 400 до 500 нм, т.е. в той части солнечного спектра, где слабо поглощает хлорофилл. Учитывая данный факт, количественное содержание суммы каротиноидов и хлорофилла определяли по

модифицированной методике спектрофотометрическим методом (рис. 3), используя в качестве аналитических длину волны 443 ± 3 нм максимально соответствующую максимумам поглощения идентифицированных каротиноидов и 667 ± 1 нм для хлорофилла.

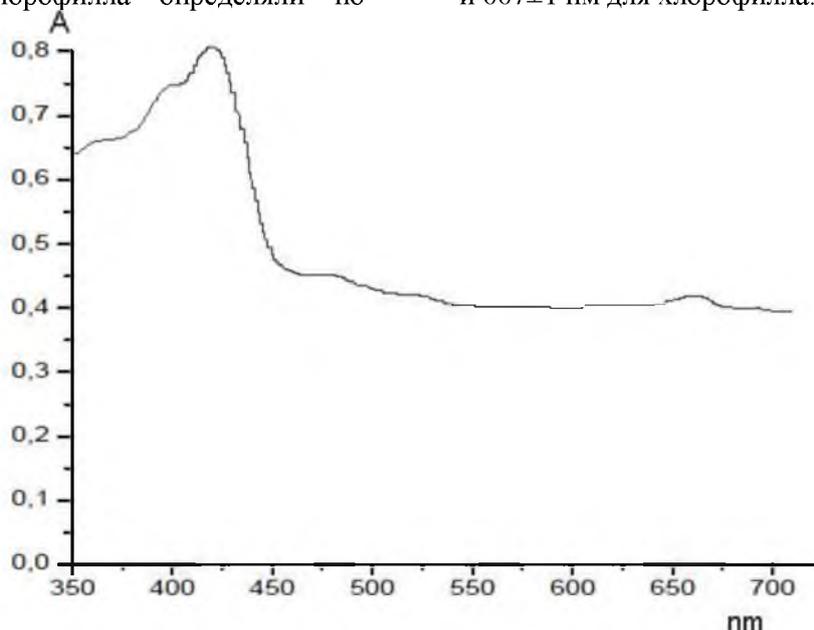


Рис. 3. Уф-спектр спиртового извлечения (фаза бутонизации) из травы *Taraxacum officinale*
Fig. 3. UV spectrum of an alcoholic extract (budding phase) of *Taraxacum officinale* herb

Результаты количественного определения представлены в таблицах 3 и 4.

Результаты определения динамики накопления суммы каротиноидов в траве *Taraxacum officinale*

Таблица 3

Table 3

The results of determination of the accumulation dynamics of total amount of carotenoids of *Taraxacum officinale* herb

Фаза вегетации	Содержание, мг%*		
	$X \pm \Delta x$, мг%	S_x	ϵ , %
бутонизации	89.17 ± 1.94	0.70	2.17
цветения	65.20 ± 1.97	0.71	3.01
плодоношения	52.07 ± 1.55	0.56	2.97

Примечание*: $n=5$, $P=95\%$, $t_p=2.78$, в пересчете на абсолютно-сухое сырье

Как видно из таблицы 3, наибольшим содержанием суммы каротиноидов в пересчете на виолоксантин характеризуется фаза бутонизации

(89.17 мг%), за ней следует фаза цветения (65.20%). Наименьшее же содержание показывает фаза плодоношения (52.07%).

Таблица 4

Результаты определения динамики накопления хлорофиллов в траве *Taraxacum officinale*

Table 4

The results of determination of the accumulation dynamics of chlorophyll in the herb of *Taraxacum officinale*

Фаза вегетации	Содержание, % *		
	$X \pm \Delta x$, %	S_x	ϵ , %
бутонизации	0.18 ± 0.0034	0.0012	1.87
цветения	0.11 ± 0.0051	0.0018	4.5
плодоношения	0.09 ± 0.0038	0.0014	4.25

Примечание*: $n=5$, $P=95\%$, $t_p=2.78$, в пересчете на абсолютно-сухое сырье

Согласно данным таблицы 4, самое высокое содержание хлорофилла наблюдается в фазу бутонизации (0.18%), ей значительно уступают фазы цветения (0.11%) и плодоношения (0.09%).

Таким образом, несмотря на то, что общий выход липофильных веществ в фазах цветения и плодоношения, по сравнению с фазой бутонизацией больше, наибольшее накопление каротиноидов и хлорофилла наблюдается именно в фазу бутонизации. По-видимому, это связано с перераспределением других соединений составляющих липофильный комплекс.

Выводы. Методом ТСХ и спектрофотометрии в траве *Taraxacum officinale* идентифицированы фотосинтетические пигменты: β -каротин, лютеин, виолоксантин, неоксантин, тараксантин, хлорофилл а и хлорофилл b.

Предложенная в работе методика ТСХ может быть использована для включения в современную нормативную документацию на лекарственное растительное сырье одуванчика лекарственного.

Количественно определены сумма каротиноидов (в пересчете на виолоксантин) и хлорофилла.

Для использования сырья в качестве источника каротиноидов наиболее оптимальным является сбор сырья в фазу бутонизации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что трава *Taraxacum officinale* является перспективным источником биологически активных веществ антиоксидантной направленности. Изучаемый вид лекарственного растительного сырья может найти дальнейшее применение при использовании в клинической практике лечения заболеваний, сопровождающихся явлениями гипоксии и метаболическими нарушениями.

Список литературы

1. Ветров П.П., Гарная С.В., Долгоненко Л.Г. Определение содержания липофильных веществ и суммы каротиноидов в растительном сырье // Химико-фармацевтический журнал. 1989. №3. С 320-325.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. М., 2015. Т. 1.
3. Кургян А.Г., Печинский С.В., Зилфикаров И.Н. Способы получения каротиноидов, лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище на их основе. Разработка и регистрация лекарственных средств 2014. URL: <http://pharmjournal.ru/articles/stati/sposobyi-polucheniya-karotinoidov-lekarstvennykh-preparatov-i-biologicheskii-aktivnykh-dobavok-k-pishhe-na-ix-osnove-6-fevral-2014>. (дата обращения 20.01.2017г.).

4. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica Dioica L.*) // Химия растительного сырья. 2015. №3. С. 105-110.

5. Тринеева О.В., Воропаева С.В., Сливкин А.И. Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. 13(2). С. 213-219.

6. Федосеева Л.М., Малолеткина Т.С. Изучение и сравнительная оценка липофильных веществ зеленых, красных и черных листьев бадана толстолистного, произрастающего на Алтае // Химия растительного сырья. 1999. №2. С. 113-117.

7. Чечета О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. 8 (2). С. 320-326.

References

1. Vetrov P.P., Garnaya S.V., Dolgonenko L.G. Determination of total amount of carotenoids and lipophilic substances content in herbal raw-material. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1989. 3. Pp. 320-325.
2. The state pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. 2015. M., volume 1.
3. Kurgyan A.G., Pechinskiy S.V., Zilfikarov I.N. Methods of obtaining carotenoids, medicines and food additives on the basis of their drug development and registration. 2014. URL: <http://pharmjournal.ru/articles/stati/sposobyi-polucheniya-karotinoidov-lekarstvennykh-preparatov-i-biologicheskii-aktivnykh-dobavok-k-pishhe-na-ix-osnove-6-fevral-2014> (date of access: January 20, 2017).
4. Trineeva O.V., Slivkin A.I., Safonova E.F. Determination of hydroxycinnamic acids, carotenoids and chlorophyll in the leaves of nettle (*Urtica Dioica L.*). *Chemistry of plant raw material*. 2015. 3. Pp. 105-110. (in Russian)
5. Trineeva O.V., Voropaeva S.V., Slivkin A.I. Selection of the optimum system for the determination of pigments of leaves of *Urtica Dioica* by the TLC method. *Sorption and chromatographic processes*. 2013. 13(2). Pp. 213-219.
6. Fedoseeva L.M., Maloletkina T.S. The research and comparative evaluation of lipophilic substances of green, red and black leaves of *bergenia crassifolia* which grows in Altai. *Chemistry of plant raw material*. 1999. 2. Pp. 113-117.
7. Checheta O.V., Safonova E.F., Slivkin A.I. Technique of carotenoids determination by the method of thin-layer chromatography. *Sorption and chromatographic processes*. 2008. 8 (2). Pp. 320-326.

Лозовицкий Дмитрий Александрович, аспирант кафедры фармацевтической химии.

Lozovitsky Dmitry Alexandrovich, Post-graduate Student, Department of Pharmaceutical Chemistry