



ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОПРЕПАРАТОВ ИЗ ТРАВЫ МЕЛКОЛЕПЕСТНИКА КАНАДСКОГО (*ERIGERON CANADENSIS L.*)

А.Ю. Ботов¹

В.Я. Яцюк¹

Л.Е. Сипливая¹

В.И. Дейнека²

Д.И. Писарев²

В.В. Новиков²

¹Курский государственный
медицинский университет

²Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: dasbot777@gmail.com

Хроматографическими и спектрофотометрическими методами проведен качественный и количественный анализ пигментов и аминокислот в сырье мелколепестника канадского. В ацетоновом извлечении, полученном методом мацерации, установлено наличие не менее пяти каротиноидов, один из которых идентифицирован как β -каротин. Определен оптимальный режим экстракции липофильных веществ. В водном извлечении определено содержание девяти (заменяемых и незаменимых) аминокислот, установлено их количественное содержание.

Ключевые слова: каротиноиды, хлорофиллы, аминокислоты, мелколепестник канадский, хроматография, спектрофотометрия.

Введение. В последнее время наблюдается усиление интереса ведущих фармацевтических фирм мира к поиску и выделению фармакологически активных веществ и потенциально ценных природных соединений с целью создания на их основе оригинальных современных лекарственных средств.

Род *Erigeron* (мелколепестник) насчитывает более 30 видов распространенных в странах Европы, Азии, Америки. Из них 6 видов, мелколепестника встречаются на территории стран СНГ. По данным литературы, на территории Центрально-Черноземного региона произрастают и образуют значительные запасы три многолетних вида мелколепестника: в Курской области – мелколепестник едкий (*Erigeron acer*) и мелколепестник канадский (*Erigeron canadensis*), на юге Белгородской и в Воронежской областях – мелколепестник подольский (*Erigeron podolicus*) [8].

По данным литературы, наиболее полно изучен мелколепестник канадский, действующими веществами которого являются эфирное масло, дубильные вещества, а также флавоноиды и холин. В научной медицине РФ сырье мелколепестника не находит широкого применения и используется как компонент, входящий в состав сборов для лечения простатита. В народной медицине России растения рода мелколепестник применяются как кровоостанавливающее и закрепляющее средство, против ревматизма, а также подагры; в итальянской народной медицине корни мелколепестника едко используются главным образом местно, при зубной боли, ушибах и артритах; мелколепестник однолетний применялся в народной медицине Китая для лечения несварения, энтеритов, гепатита и гематурии [10, 11].

Данная работа является продолжением исследований химического состава биологически активных веществ некоторых видов растений рода мелколепестник и посвящена изучению веществ первичного обмена, входящих в состав липофильной и гидрофильной фракций, а именно пигментов и аминокислот [2]. Компоненты первичного синтеза образуются в результате ассимиляции веществ, попавших в организм извне. К ним относят также белки, ферменты, липиды, витамины и органические кислоты. Идентификация и количественное определение этих групп веществ представляет несомненный интерес для оценки перспективности использования растительного сырья с целью создания лекарственных препаратов различной фармакологической активности.

Материалы и методы исследования. Объектом данного исследования служили надземные органы мелколепестника канадского, собранные в фазу вегетации: конец цветения – начало плодоношения, на территории Курской области в 2010 году.



Хлорофиллы качественно обнаруживали в ацетоновом извлечении, полученном методом мацерации, используя их способность давать красную флюоресценцию под действием УФ-света. Каротиноиды определяли в очищенной ацетоновой вытяжке методом восходящей ТСХ и прямым сравнением с достоверными образцами, в системах растворителей: гексан, гексан-диэтиловый эфир (3:5) и гексан-ацетон (9:1). Количество пятен на хроматограммах и их окраску контролировали визуально.

Для получения индивидуальных веществ раствор каротиноидов в эфире хроматографировали на колонке (4x30 см) с использованием в качестве сорбента оксида алюминия. Колонку проявляли смесью гексан-диэтиловый эфир (3:7), бензолом и отбирали фракции по 10 мл. Элюаты анализировали методом хроматографии в тонком слое сорбента на пластинках «Силуфол» в системе растворителей: петролейный эфир-бензол-метанол (81:15:4), ацетон-петролейный эфир (9:1), гексан-диэтиловый эфир (3:5). Фракции, имеющие одинаковый состав, объединяли, упаривали под вакуумом и анализировали. Идентификацию каротиноидов осуществляли спектрофотометрическим методом по спектрам поглощения, по окраске на адсорбенте и в растворах, по расположению зон на хроматограммах, при хроматографировании смешанных проб выделенных каротиноидов с достоверными образцами.

Для количественного определения пигментов использовали спектрофотометрическую методику, позволяющую определять каротиноиды и хлорофиллы при их совместном присутствии [7]. Анализ пигментов выполняли при комнатной температуре на рассеянном свете, так как при сильном освещении может произойти фотоокисление хлорофилла. Для определения содержания пигментов в сырье мелкопестника канадского была изучена зависимость полноты экстракции от следующих технологических факторов: измельченность сырья, кратность экстракции, экстрагент, метод экстракции.

Для качественного обнаружения аминокислот в водном извлечении мелкопестника канадского использовали нингидриновую реакцию. Далее проводили хроматографическое определение аминокислот посредством восходящей ТСХ в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-вода (3:1:1) в сравнении с достоверными образцами, с последующим их количественным определением денситометрически. Для этого на хроматографическую пластинку размером 150x120мм «Силуфол» наносили на расстоянии 1 см от края по 0,2 мкг извлечения и такое же количество 0,5% водных растворов стандартных образцов аминокислот. После прохождения фронтом растворителя расстояния 10 см, пластинку извлекали из камеры, просушивали на воздухе. Затем хроматограмму обрабатывали 0,25% раствором нингидрина в ацетоне, нагревали в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 2-3 минут [6,9].

Результаты исследования и обсуждение. Методом восходящей тонкослойной хроматографии определили наличие не менее пяти веществ, отнесенных по характеру окраски к каротиноидам (табл. 1). Дальнейшую идентификацию проводили спектрофотометрическим методом. Для этого готовили растворы в бензоле, гексане и снимали спектры. После анализа спектров поглощения всех фракций удалось идентифицировать β -каротин по следующим максимумам: 435, 465, 494 нм и 425, 453, 484 нм для бензола и гексана соответственно. Далее проведен сравнительный анализ полученного соединения по спектрам поглощения с достоверным образцом β -каротина, что позволило определить наличие его в образце. Остальные порции представлены смесью различных каротиноидов и требуют дальнейшего изучения.

Таблица 1

Хроматографический анализ каротиноидов в мелкопестнике канадском

Номер пятна на хроматограмме	Величина R_f в системах растворителей		
	гексан-диэтиловый эфир 3:5	гексан	гексан-ацетон 9:1
1	0,07	0,10	0,19
2	0,11	0,27	0,23
3	0,19	0,39	0,32
4	0,69	0,50	0,35
5 (β -каротин)	0,94	-	0,84



Технологический процесс получения фитопрепаратов включает стадию извлечения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья. В процессе экстракции происходит массообмен между экстрагентом и раствором веществ в растительной клетке до выравнивания концентраций. Количественный и качественный состав извлечения во многом зависит не только от химического состава биологически активных веществ, но и от химической природы экстрагента, технологической подготовки сырья и способа проведения экстракции [1, 4].

При проведении эксперимента выяснено, что наибольший выход пигментов достигается при использовании в качестве экстрагента смеси гексан-ацетон в соотношении 1:1 (табл. 2).

Таблица 2

Влияние экстрагента на содержание пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) в мелколепестнике канадском

Экстрагент	Содержание пигментов* в мг/100г	
	1	2
Гексан	4,09	2,37
Ацетон	7,65	13,90
Гексан-ацетон (1:1)	13,26	20,22

Примечание: * – среднее значение пяти определений; 1 – содержание каротиноидов; 2 – содержание хлорофиллов.

Из многочисленных способов получения вытяжки нами был выбран метод дробной мацерации, так как он обеспечивает наибольший выход пигментов и, таким образом, позволяет наиболее полно извлекать биологически активные вещества особенно термолабильные (табл. 3).

Таблица 3

Влияние метода экстракции на содержание пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) в мелколепестнике канадском

Метод экстракции	Содержание пигментов* в мг/100г	
	1	2
Экстракция при нагревании	13,26	20,22
Дробная мацерация	14,89	21,13

Примечание: * – среднее значение пяти определений; 1 – содержание каротиноидов; 2 – содержание хлорофиллов.

В процессе экстракции важную роль играет степень измельчения сырья. Известно, что скорость экстракции в идеальном случае прямопропорциональна степени измельчения сырья. В действительности практика показала, что порошки высокой степени измельчения для экстракции не используются. В этой связи в каждом конкретном случае необходимо определить оптимальную степень измельчения сырья [3, 5]. Результаты исследования показали, что для получения экстрактов целесообразно использовать растительное сырье, имеющее степень измельчения 1 мм (табл. 4).

Таблица 4

Влияние степени измельчения сырья на содержание пигментов и экстрактивных веществ (каротиноидов и хлорофиллов) в мелколепестнике канадском

Степень измельчения, мм	Содержание пигментов* в мг/100г		Содержание экстрактивных веществ* в %
	1	2	
1	15,01	21,98	5,56
3	9,54	16,45	3,60
5	4,78	10,11	2,45

Примечание: * – среднее значение пяти определений; 1 – содержание каротиноидов; 2 – содержание хлорофиллов.



Для оценки влияния кратности экстракции на содержание пигментов и экстрактивных веществ была проведена 5-ступенчатая экстракция. Полученные результаты свидетельствуют о том, что целесообразно осуществлять трехкратную кратную экстракцию, так как при продолжении процесса не наблюдается увеличения выхода биологически активных веществ (табл. 5).

Таблица 5

Влияние кратности экстракции на содержание пигментов и экстрактивных веществ (каротиноидов и хлорофиллов) в мелколепестнике канадском

Степень экстракции	Содержание пигментов*, мг/100г		% извлечения		Содержание экстрактивных веществ*, %
	1	2	1	2	
1	15,11	20,35	39	42	5,37
2	11,58	13,81	30	29	3,17
3	9,32	10,43	24	21	2,52
4	1,95	2,69	5	6	2,01
5	0,45	1,08	2	2	1,05

Примечание: * – среднее значение пяти определений; 1 – содержание каротиноидов; 2 – содержание хлорофиллов.

В гидрофильной фракции было проведено исследование аминокислотного состава. В пробе установлено наличие не менее 9 аминокислот, при этом наибольшее количество составляют: аланин, гистидин, аргинин и аспарагиновая кислота (табл. 6).

Таблица 6

Результаты тонкослойной хроматографии свободных аминокислот водного извлечения мелколепестника канадского в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-ледяная вода (3:1:1)

Номер пятна	R _f	аминокислота	Концентрация, мг%
1	0,06	аргинин	24
2	0,07	гистидин	30
3	0,34	аспарагиновая кислота	18
4	0,41	серин	12
5	0,45	аланин	48
6	0,47	треонин	12
7	0,49	глутаминовая кислота	6
8	0,59	валин	6
9	0,60	метионин	6

В ходе анализа изучены вещества первичного биосинтеза сырья мелколепестника канадского: пигменты и аминокислоты. Полученные сведения о качественном составе и количественном содержании веществ первичного обмена позволяют предположить перспективность дальнейшего изучения растений рода мелколепестник для создания отечественных фитопрепаратов на их основе.

Литература

1. Ахназарова, С. Л. Методы оптимизации в химической технологии. – 2-е изд., перераб. и доп. / С.Л. Ахназарова, В.В.Кофаров. – М., 1985. – С. 327.
2. Ботов, А. Ю. Изучение *Erigeron Canadensis* L. как возможного источника получения каротиноидов и хлорофиллов / А.Ю. Ботов, В.Я. Яцюк, Л.Е. Сипливая // Современные проблемы экспериментальной и клинической медицины : материалы междунар. науч. конф. – Бангкок, 2010. – С. 108-109.
3. Краснов, Е. А. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е.А. Краснов, Т.П. Березовская, Л.А. Демиденко и др. – Томск, 1987. – 184 с.
4. Гогилашвили, Л. М. Исследование процесса экстракции плодов держи-дерева / Л.М. Гогилашвили, Н.С. Хатиашвили, П.А. Явич // Фармация. – 2000. – №2. – С. 24.
5. Завражнов, В. И. Лекарственные растения: лечебное и профилактическое исследование / В.И. Завражнов, Р.И. Китаева, К.Ф. Хмелев. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1993. – 220 с.



6. Киселева, Т. Л. Сравнительное хроматографическое изучение аминокислотного состава травы полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.), собранной на территории России и Китая / Т.Л. Киселева, О.А. Горошко, А.В. Чаузова, О.А. Прохоренко // Сборник научных трудов II-го российского фитотерапевтического съезда. – М., 2010.– С. 179-183.

7. Литвиненко, В. И. Количественное определение каротиноидов и хлорофиллов хладонного экстракта валерианы лекарственной / В.И. Литвиненко, С.В. Талашова, Т.П. Попова // Состояние и перспективы современного лекарствоведения. Ярославль. – 1997. – С. 65-66.

8. Маевский, П. Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф. Маевский. – Москва, 2006. – 514 с.

9. Яцюк В. Я. Анализ состава веществ первичного синтеза растительного сбора / В.Я. Яцюк, О.А. Елецкая // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – №3, 2009. – С. 146-150.

10. Li, X. New sesquiterpenes from *Erigeron annuus* / X. Li, M.Yang, Y.F.Han et al. // *Planta Med.* – 2005. – Vol. 71. – P. 268-272.

11. Pieroni, A. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy / A. Pieroni, C.L Quave.; R.F. Santoro // *J. Ethnopharmacol.* 2004, 95, 373-384.

PERSPECTIVES OF PHYTOPREPARATION RECEIPT FROM HERB OF *ERIGERON CANADENSIS* L.

A.Y. Botov¹

V.Y. Yatsuk¹

L.E. Siplivaya¹

V.I. Deineka²

D.I. Pisarev²

O.O. Novikov²

¹*Kursk State Medical University*

²*Belgorod National Research University*

e-mail: imbo118@rambler.ru

The qualitative and quantitative analysis of pigments and amino acids has been conducted with the use of chromatographic and spectrophotometric methods contained in raw material of *Erigeron Canadensis* L. We have revealed the presence of at least five carotenoids in the acetone extract which was obtained by maceration. One of them was identified by us as β -carotene. The optimal mode of lipophilic substances extraction has been also determined. The content of nine amino acids has been revealed in water extract and their quantitative content has been established.

Key words: carotenoids, chlorophylls, amino acids, *Erigeron Canadensis* L., chromatography, spectrophotometry.