



О КОМПЛЕКСНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СЫРЬЯ ПОЛЫНИ ГОРЬКОЙ (*ARTEMISIA ABSINTHIUM L.*) ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОПРЕПАРАТОВ

А.П. Северин¹, Л.Е. Сипливая¹
В.Я. Яцюк¹, А.Н. Чулков¹
О.О. Новиков², Е.Т. Жилиякова²
В.И. Кочкаров²

¹Курский государственный
медицинский университет

²Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: imbo118@rambler.ru

В гидрофильной фракции шрота полыни горькой исследовались полисахаридный комплекс и аминокислоты. Методом восходящей тонкослойной хроматографии (ТСХ) установлен моносакхаридный состав водорастворимого полисахаридного комплекса, количественное содержание моносахаров определено денситометрически. Посредством ВЭЖХ качественно и количественно изучены аминокислоты, входящие в состав шрота полыни горькой.

Ключевые слова: шрот полыни горькой, полисахаридный комплекс, аминокислоты, ТСХ, ВЭЖХ.

Введение. В последнее время на фармацевтическом рынке наблюдается увеличение спроса и расширение ассортимента как препаратов из лекарственных растений, так и нативного сырья.

Поиск новых источников сырья, совершенствование технологии производства, а так же комплексное использование уже разрешенных к применению лекарственных растений является актуальной задачей отечественной фармации.

Объектом данного исследования служил шрот полыни горькой после промышленного получения настойки полыни (*Tinctura Absinthii*).

Определение состава биологически активных веществ шрота полыни горькой было начато с изучения веществ первичного обмена (аминокислот и состава моно- и полисахаридов). Компоненты первичного синтеза образуются в результате ассимиляции веществ, попавших в организм извне. К веществам первичного синтеза относятся белки, липиды, ферменты, витамины и органические кислоты.

Ранее нами проведены исследования по изучению технологических параметров оптимизации получения липофильных и гидрофильных комплексов из различных видов полыни [7, 8, 9].

Целью настоящих исследований было изучение состава тех групп биологически активных веществ, которые извлекаются водой, а именно полисахаридов и аминокислот.

Материалы и методы исследования. Наличие свободных сахаров определяли с помощью качественных реакций и хроматографии в тонком слое сорбента [5].

Для обнаружения свободных сахаров по реакции Бертрана: к 2 мл водного раствора шрота полыни горькой прибавляли равное количество реактива Фелинга, нагревали на кипящей водяной бане, наблюдали образование кирпично-красного осадка оксида меди (I). Для реакции с реактивом Несслера: к 1мл очищенного водного извлечения прибавляли 1 мл реактива Несслера и нагревали на кипящей водяной бане, при этом выпадал черный осадок оксида ртути (I).

Хроматографирование проводили восходящим способом, в тонком слое сорбента на пластинках «Silufol». В качестве подвижной фазы использовали системы растворителей: хлороформ-этанол-25% аммиак (10:5:1) и н-бутанол-ацетон-вода (4:5:1). На линию старта с помощью микропипетки наносили по 0,05 мл исследуемых извлечений параллельно с 0,1% растворами достоверных стандартных образцов сахаров. После прохождения фронта растворителя пластинки детектировали анилинфталатным реактивом.

Связанные сахара определяли:

– по реакции Бертрана: 1 мл водного извлечения нагревали на водяной бане с 1 мл кислоты серной в течение 5 минут. После охлаждения к гидролизату прибавляли 1 мл раствора Фелинга, при этом появлялся кирпично-красный осадок оксида меди (I), по объему превышающий аналогичный при определении свободных сахаров;



– по реакции с α -нафтолом: к 1 мл водного извлечения прибавляли 20% этанольный раствор α -нафтола, а затем по каплям серную кислоту. На поверхности раздела фаз появлялось красное кольцо.

Для получения водорастворимого полисахаридного комплекса (ВПСК) использовали воздушно-сухой шрот полыни горькой после экстракции липофильных соединений ацетоном. Навеску шрота (20г) заливали горячей водой (1:10) и настаивали на водяной бане при температуре 90°C в течение 2 часов при перемешивании. Извлечения охлаждали и фильтровали. Операцию повторяли трехкратно. Извлечения объединяли и концентрировали на водяной бане под вакуумом до 1/4 объема. ВПСК осаждали, обрабатывая концентрат трехкратным количеством 96,5% этанола. При этом в течение суток выпадали аморфные хлопьевидные осадки. Осадки отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывая последовательно этанолом 70%, 96,5%, ацетоном. Осадки сушили в вакуум-сушильном шкафу.

Идентификацию сахаров полисахаридного комплекса проводили после кислотного гидролиза. Для гидролиза полисахаридов использовали серную кислоту, так как она вызывает наименьшее разрушение продуктов гидролиза и легко удаляется из гидролизата карбонатом бария.

Оптимальные условия гидролиза устанавливали экспериментально. Для определения условий гидролиза применяли серную кислоту различной концентрации и определяли время полного гидролиза через 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов по количеству восстанавливаемых сахаров [1].

Моносахариды идентифицировали методом тонкослойной хроматографии в системах растворителей: н-бутанол – уксусная кислота – вода (3:1:1), н-бутанол – пиридин – вода (12:5:4), этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (18:3:1:4). В качестве проявителя использовали раствор анилингидрофтала. Обработанные хроматограммы нагревали в сушильном шкафу в течение 15-20 минут при температуре 100°C [2, 10]. Моносахариды проявлялись в виде пятен различной окраски (от голубой до коричневой) на бесцветном фоне.

Концентрацию моносахаридов определяли на денситометре ERI фирмы «Карл Цейс Иена».

Качественное обнаружение свободных аминокислот проводили с помощью нингидриновой реакции, а также хроматографически [4]. К 1 мл очищенного водного извлечения из шрота полыни горькой прибавляли равное количество свежеприготовленного 0,25% этанольного раствора нингидрина и осторожно нагревали в течение 5 минут. В результате реакции появилось постепенно усиливающееся красно-фиолетовое окрашивание. Хроматографический анализ осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в системах растворителей: н-бутанол – уксусная кислота – вода (12:3:5) и н-бутанол – пиридин – вода (1:1:1) с достоверными образцами аминокислот. Хроматограммы высушивали на воздухе, обрабатывали 0,25% этанольным раствором нингидрина и инкубировали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 5 минут. Аминокислоты появлялись в виде красно-фиолетовых пятен. По результатам хроматографического анализа установлено, что свободные аминокислоты шрота полыни горькой представлены заменимыми и незаменимыми аминокислотами.

Количественный анализ аминокислотного состава проводили, используя жидкостной хроматограф Agilent 1200 Series со спектрофотометрическим детектором. Для количественного определения состава аминокислот навеску сырья 100мг предварительно подвергали гидролизу в присутствии 6М раствора соляной кислоты при температуре 110°C в течение 16 часов. Затем проводили модифицирование фенилизотионционатом в течение 30 минут при комнатной температуре в присутствии 0,1М раствора карбоната натрия. Перед вводом в хроматограф пробу центрифугировали в течение 5 минут при скорости вращения 10000 об/мин. Расчет аминокислот был проведен по формуле:



$$W(\text{аминокислот, \%}) = \frac{C_x \times 10 \times 100}{M_n}$$

где C_x – концентрация аминокислоты, полученная непосредственно при анализе и подсчитанная по калибровочному графику на соответствующую аминокислоту, мг/мл;

M_n – масса навески, мг;

10 и 100 постоянные величины.

Подготовка пробы для хроматографирования при определении цистина и триптофана отличалась, по сравнению с другими аминокислотами.

Для определения цистина навеску образца помещали в специальную виалу, добавляли 2,5 мл окислительной смеси (муравьиная кислота-перекись водорода в соотношении 9:1), перемешивали и полностью высушивали на водяной бане при температуре 60 градусов в токе воздуха. К сухому остатку приливали 10 мл 6М раствора соляной кислоты, закрывали крышкой, перемешивали и помещали в термостат.

Определение триптофана проводили следующим образом. Навеску образца помещали в виалу, добавляли 5 мл горящего (70-80°C) насыщенного раствора бария гидроокиси и закрывали крышкой, перемешивали и помещали в термостат. После охлаждения до комнатной температуры гидролизат количественно переносили в мерную колбу на 50 мл, фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента), промывали фильтрат 30 мл воды очищенной. Затем прибавляли одну каплю метилового красного и нейтрализовали 2н раствором серной кислоты до перехода окраски из желтой в слабо розовую. После этого доводили до метки водой и перемешивали. Полученный раствор центрифугировали в течение 5 минут при 10000 об/мин, а далее анализ проводили как для остальных аминокислот.

Результаты исследования и обсуждение. В результате хроматографического исследования установлено, что шрот полыни горькой содержит не менее пяти свободных сахаров, в том числе глюкозу, арабинозу и галактозу. Оптимальные условия гидролиза установлены экспериментально: полнота гидролиза полисахаридного комплекса достигается 10% серной кислотой через 7 часов. Выход ВПСК составил 3,4%.

Моносахаридный состав полисахаридного комплекса, выделенного из шрота полыни горькой, представлен следующими сахарами: галактозой – 20 мг%, глюкозой – 40 мг%, арабинозой – 20 мг%, рамнозой – 20 мг%, ксилозой – 15 мг%, глюкуроновой кислотой – 10мг%. Как видно из полученных результатов, преобладающими моносахаридами в ВПСК шрота полыни горькой являются D-глюкоза, остальные сахара содержатся практически в равных количествах.

По результатам ВЭЖХ установлено наличие не менее 13 аминокислот. Из них преобладающими являются аланин, аргинин, глицин, треонин и фенилаланин (см. табл.).

Таблица

**Качественное и количественное содержание аминокислот
в шроте полыни горькой**

Название аминокислоты	Время удерживания, мин	Содержание, мг/мл
Аспарагин	5,36	2,54
Серин	5,60	6,80
Аргинин	6,05	8,54
Глицин	6,22	7,69
Треонин	7,61	7,96
Аланин	8,14	9,80
Тирозин	9,76	5,01
Метионин	10,72	1,73
Валин	11,30	1,73
Фенилаланин	13,37	7,17
Изолейцин	13,58	5,71
Лейцин	13,74	1,24
Лизин	14,01	4,65

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. Проведенные исследования показали, что шрот лекарственного сырья полыни горькой содержит вещества первичного биосинтеза, для которых описана значительная биологическая активность [3, 6], и является перспективным источником фитопрепаратов. Комплексное исследование сырья полыни горькой позволит в значительной степени расширить отечественную сырьевую базу лекарственного растительного сырья для получения на его основе новых препаратов.

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. Гогилашвили, Л. М. Исследование процесса экстракции плодов держи-дерева / Л.М. Гогилашвили, Н.С. Хатиашвили, П.А. Явич // Фармация. – 2000. – №2. – С. 24.
3. 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.
4. 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 и др. // Сборник научных трудов II-го российского фитотерапевтического съезда. – М., 2010. – С. 179-183.
5. 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.
6. Маевский, П. Ф. Флора средней полосы европейской части Росси/ П.Ф. Маевский, – М., 2006. – 514 с.
7. Северин, А. П. Изучение химического состава водных извлечений растений рода *Artemisia* L. /А.П. Северин, Л.Е. Сипливая, В.Я. Яцюк // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2011. – №3. – С. 144.
8. Северин, А. П. Перспективы использования полыни обыкновенной для получения фитопрепаратов / А.П. Северин, Л.Е. Сипливая, В.Я. Яцюк // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – №2. – С. 113-114.
9. Северин, А. П. Растения рода полынь – источник получения полиенов / А.П. Северин, Л.Е. Сипливая, В.Я. Яцюк // Фармообразование – 2010 : материалы 4-й Всерос. с междунар. участием науч.-метод. конф. – Воронеж. – 2010. – С. 338-339.
10. 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. – 2009. – №3. – С. 146-150.

ABOUT THE COMPLEX USING OF *ARTEMISIA ABSINTHIUM* L. RAW MATERIAL FOR OBTAINING THE HERBAL REMEBIES

A.P. Severin¹

V.Y. Yatsuk¹

L.E. Siplivaya¹

A.N. Chulkov¹

O.O. Novikov²

E.T. Zhilyakova²

V.I. Kochkarov²

¹*Kursk State Medical University*

²*Belgorod National Research University*

e-mail: imbo118@rambler.ru

Polysaccharide complex and amino acids were investigated in the hydrophilic fraction of *Artemisia absinthium* L. meal. We have established monosaccharide composition of water-soluble polysaccharide complex with the use of ascending thin layer chromatography (TLC) method. The quantitative content of monosaccharides has been determined by densitometric method. Amino acids, that make up the *Artemisia absinthium* L. meal has been qualitatively and quantitatively studied by HPLC method.

Key words: meal of *Artemisia absinthium* L., polysaccharide complex, amino acids, TLC, HPLC.