

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
СЕВЕРНЫЙ (АРКТИЧЕСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ



**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ
СИНТЕТИЧЕСКИХ
И ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ»
(НАРОЧАНСКИЕ ЧТЕНИЯ - 11)**

**Материалы
Международной научно-практической конференции
20–23 сентября 2017 г.**

Минск – Ставрополь 2017

УДК 001.11: 57.08
ББК 30.16
М 75

Рекомендовано Советом биологического факультета
18 октября 2017 г., протокол №2

Составители:

Курченко В.П. – заведующий НИЛ прикладных проблем биологии БГУ
Лодыгин А.Д. – заведующий кафедрой прикладной биотехнологии
Института живых систем СКФУ

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор *В.М. Юрин*;
кандидат биологических наук *С.В. Ризевский*

М 75 Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения - 11): материалы Международной научно-практической конференции (20–23 сентября 2017 г.). / БГУ, СКФУ, САФУ; составители: В.П. Курченко, А.Д. Лодыгин. – Минск – Ставрополь : Белорусский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный университет, 2017. – 317 с.

Сборник включает материалы научных исследований в области получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ и других приоритетных направлений.

ISBN 978-5-9596-1348-8

УДК 001.11: 57.08
ББК 30.16

© ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», 2017
Белорусский государственный университет, 2017

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ФЛАВОНОИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
РАСТЕНИЙ КОЛЛЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА
НАН БЕЛАРУСИ

Леонтьев В.Н.¹, Феськова Е.В.¹, Игнатовец О.С.¹, Титок В.В.²

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет», Минск, leontiev@belstu.by

² ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск

Подобраны условия экстракции флавоноидов из лекарственных растений. Определено общее содержание флавоноидов в образцах растений коллекции ЦБС НАН Беларуси по методу Фолина-Чокальтеу. Методом

ВЭЖХ-МС в экстрактах цмина песчанного (Helichrysum arenarium) и воробейника лекарственного (Lithospermum officinale) идентифицированы флавоноиды (кемпферол и изокверцитрин), играющие ключевую роль в регенерации нервной ткани.

Введение. Флавоноиды, принадлежащие к классу полифенольных соединений растительного происхождения, относятся к вторичным продуктам метаболизма растений. Они участвуют в пигментации растений, играют важную роль в сигнальных клеточных системах и служат мессенджерами химических сигналов в процессах экспрессии генов, изменяя активность регуляторных белков, эффективно защищают растения от различных неблагоприятных факторов окружающей среды (УФ-излучения, температурного стресса, повышенных концентраций тяжелых металлов и др.), а также от бактериальной, грибковой или вирусной инфекции и повреждения насекомыми. Антирадикальные и антиоксидантные свойства флавоноидов обуславливают их участие в защите растений от окислительного стресса и ряда патологий.

Данные природные вещества не синтезируются млекопитающими, и их поступление в организм зависит от потребления в пищу растительных продуктов. Клинические и лабораторные исследования выявили у флавоноидов антиоксидантные, кардиотропные, капилляропротективные, гепатопротекторные, противогипоксические и другие свойства [1]. Природные флавоноиды не проявляют токсического действия, не являются кумулятивными и в больших дозах обычно не вызывают каких-либо побочных отрицательных эффектов.

В связи с перспективами использования флавоноидов в медицине, число исследований в этой области за два десятилетия выросло более чем в десять раз. Описание флавоноидов и предполагаемые их лекарственные свойства присутствует в большинстве работ, в которых анализируется химический состав растений традиционной медицины [2]. Одним из этапов научных исследований при изучении биологической активности отдельных флавоноидов и их комплексов, является разработка методов экстракции и количественного определения указанных соединений. На базе кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ и лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» проводятся научные исследования с целью разработки фитопрепарата, стимулирующего регенерацию нервных тканей. Американскими учеными установлено, что ключевыми флавоноидами, отвечающими за данный процесс являются кемпферол, фисетин и изокверцитрин [4].

Целью настоящей работы явилось изучение общего содержания флавоноидов в различных растениях, а также их идентификация с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Объектами исследования являлись

лекарственные растения из коллекции ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (буквица лекарственная (*Betonica officinalis* L.), монарда дудчатая (*Monarda fistulosa* L.), шалфей мускатный (*Salvia sclarea*), репешок аптечный (*Agrimonia eupatoria* L.), цмин песчаный (*Helichrysum arenarium*), пустырник сердечный (*Leonurus cardiaca*), чернушка дамасская (*Nigella damascena*), шалфей луговой (*Salvia pratensis*), душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale*).

Экспериментальная часть. Для выделения флавоноидов из растений навеску сухого растительного сырья массой 0,1 г измельчали с добавлением 10 мл 70%-ного этилового спирта в фарфоровой ступке. Экстракцию проводили в течение 1 часа. Затем спиртовое извлечение количественно переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали 5000-6000 об/мин в течение 10 мин. Определение суммарного содержания флавоноидов проводили методом Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси, который основан на реакции фенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу [3].

Водно-спиртовые экстракты анализировали при помощи хроматомакс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C₁₈ 250×4,6 мм, 5мкм (Thermo Electron Corporation, США). Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспреей ионизацией (ESI). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : вода с 1% муравьиной кислоты в соотношении 20 : 80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в области отрицательных и положительных ионов. Параметры масс-спектрометрии были следующими: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура десольватации – 350°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/час.

Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Mass Lynx». Для качественного и количественного определения флавоноидов в экстрактах лекарственных растений использовали стандартные растворы коммерческих препаратов кемпферола, фисетина, изокверцетрина, кверцетрин гидрата, резвератрола, гесперидина, 4-аллиланизола, нарингина и рутина.

Обсуждение результатов. При подборе условий экстракции флавоноидов из лекарственных растений были установлены следующие параметры: время экстракции – 1 час, температура экстракции – 20°C, соотношение массы навески и экстрагента 1:100, в качестве экстрагента был выбран раствор этилового спирта (70:30). Результаты измерений концентрации флавоноидов в растительных экстрактах представлены в таблице. Анализ представленных данных показал, что большое количество флавоноидов содержится в репешке, монарде, буквице, шалфее, воробейнике

и душице (таблица). Перечисленные растения могут культивироваться в Республике Беларусь, при этом, суммарное содержание флавоноидов указывает на перспективность их применения для фармацевтической промышленности с целью производства фитопрепаратов с разной биологической активностью.

Таблица – Результаты измерений концентрации флавоноидов в растительных экстрактах

Название растения	Часть растения	Концентрация фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/л	Содержание фенольных соединений в экстракте, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса
Пустырник сердечный	Листья	76,7	7,58
Монарда дудчатая	Цветы	187,9	14,72
Монарда дудчатая	Листья	19,2	1,79
Цмин песчаный	Цветы	120,1	9,62
Цмин песчаный	Листья	43,2	3,50
Буквица лекарственная	Цветы	156,9	13,83
Буквица лекарственная	Листья	160,5	14,66
Шалфей мускатный	Листья	181,4	31,97
Шалфей мускатный	Цветы	181,4	14,46
Репешок аптечный	Цветы	66,5	6,08
Репешок аптечный	Листья	85,2	43,63
Чернушка дамасская	Семена	93,5	8,03
Воробейник лекарственный	Листья	144,2	18,25
Душица обыкновенная	Цветы	156,1	23,63

Дальнейшим этапом явилось изучение компонентного состава образцов лекарственных растений. Для решения указанной задачи применяют различные физико-химические методы: тонкослойную хроматографию, спектрофотометрию с предварительными цветными реакциями отдельных компонентов, высокоэффективную жидкостную хроматографию и другие. Нами был выбран метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии, так как указанный метод позволяет не только количественно оценить содержание отдельных флавоноидов, но и подтвердить их структуру при отсутствии стандартных веществ. Практически для всех экстрактов лекарственных растений было характерно наличие большого числа компонентов.

На рисунке 1 а) представлена хроматограмма экстракта флавоноидов цмина песчаного (цветочная часть).

Масс-спектр компонента хроматографического пика с временем удерживания 26,63 мин (рисунок 1 б) соответствует 3-β-D-глюкопиранозиду кемпферола. Количественный анализ показал, что содержание указанного соединения составило 2,72 мг на 1 г с.в. цветков цмина песчаного.

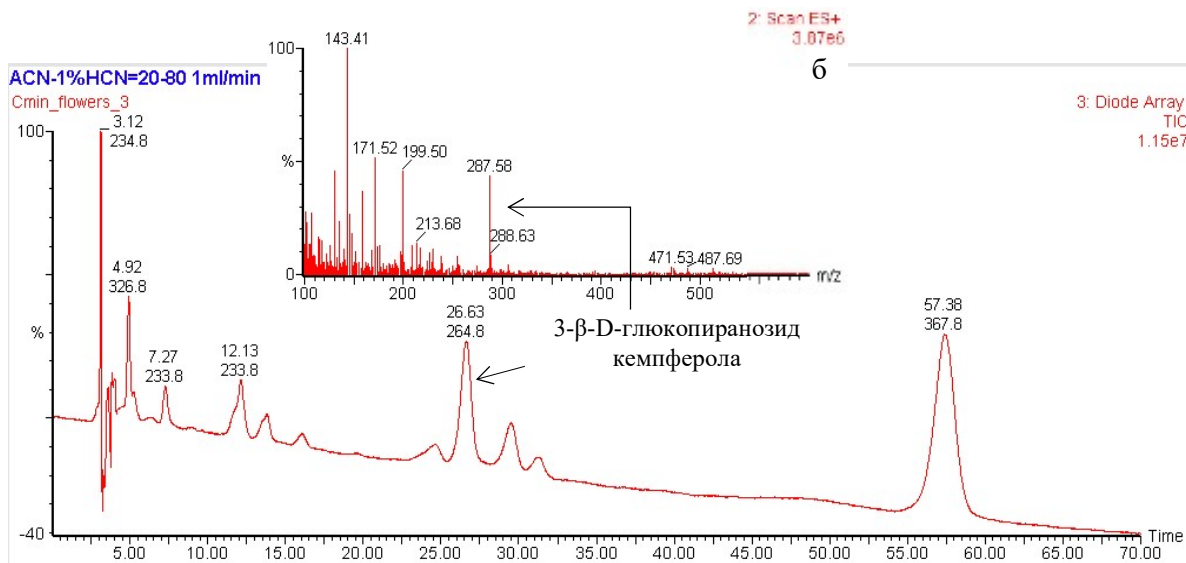


Рисунок 1 – Хроматограмма экстракта флавоноидов цмина песчаного (цветочная масса) (а) и масс-спектр компонента хроматографического пика с временем удерживания 26,63 мин в области положительных ионов (б)

Хромато-масс-спектрометрический анализ экстракта флавоноидов воробейника лекарственного (рисунок 2) показал, что компонент хроматографического пика с временем удерживания 12,39 мин соответствует изокверцитрину, содержание которого в его фитомассе составило 3,43 мг/г с.в.

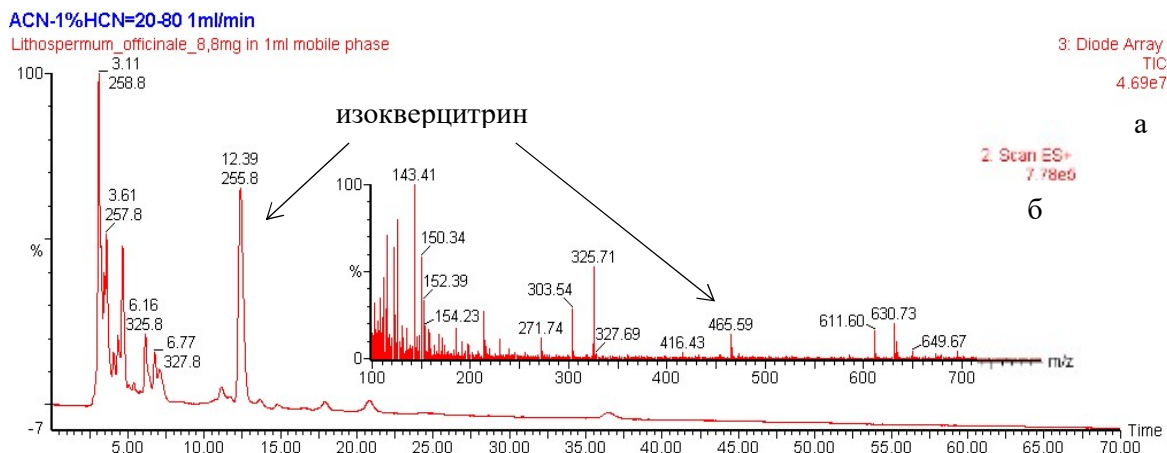


Рисунок 2 – Хроматограмма экстракта флавоноидов воробейника лекарственного (а) и масс-спектр компонента хроматографического пика с временем удерживания 12,39 мин в области положительных ионов (б)

Выводы. В ходе выполнения научно-исследовательской работы подобраны условия экстракции (концентрация экстрагента, соотношение сырье : экстрагент, температура экстракции, время экстракции) флавоноидов, позволяющие получить максимальное содержание веществ в экстракте;

разработаны методы выделения комплексов флавоноидов из отобранных видов растений; определено общее содержание флавоноидов методом Фолина-Чокальтеу в 10 образцах. Наибольшее содержание фенольных соединений, в пересчете на мг-экв.галловой кислоты, выявлено в экстрактах монарды дудчатой, буквице лекарственной, шалфее мускатном, репешке аптечном, душице, воробейнике лекарственном; определено содержание кемпферола в экстракте цветков цмина песчанного и изокверцитрина в экстракте плодоножек воробейника лекарственного.

Список литературы:

1. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications / J. E. Brown [et al.]; eds. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton: CRC Press, 2006. –1197 p.
2. Matei A.O. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC–MS / A.O. Matei, F. Gatea, G.L. Radu // Journal of Chromatographic Science. – 2015. – Vol. 53, Issue 7. – P. 1147–1154.
3. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin–ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, L.R. Rosa M. // Methods in Enzymology – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178.
4. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource]. – Mode of access: www.google.com/patents/US20120087980. – Date of access: 21.02.2016.