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

ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ *ECHINACEA* MOENCH

Попов Е.Г., Кручонок А.В., Титок В.В.
Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, egpopoff@gmail.com

В настоящей работе ВЭЖХ-анализ адаптирован и применен для измерения в листьях 10 образцов Echinacea ssp. содержания фенольных кислот и некоторых их производных по которым определены видоспецифические различия. Результаты исследования подтверждают, что метод может быть использован для оценки качества растительного сырья с определением оптимальных сроков заготовки, а также и для целей хемосистематики.

Введение. Эффективность применяемых современной медициной для стимулирования иммунитета растительных препаратов обусловлена наличием в них БАВ (биологически активных веществ) с соответствующими спектрами действия (антирадикальное, противовирусное, фагоцито-стимулирующее). Среди таковых назовем метаболиты кофейной кислоты – оксикоричные (полифенольные) кислоты и их производные по которым оценивается качество фитосырья: кафтаровая кислота, хлорогеновая кислота, цинарин, эхинакозид, цикориевая кислота), а также гликопротеиды, полисахариды, алкамиды и др. Эти вещества обладают антиоксидантным и детоксикационным действием, в том числе помогают выводить из организма

ионы тяжелых металлов [1-3]. Для получения вышеупомянутых препаратов используются интродуцированные в Евразию из Северной Америки и хорошо изученные виды декоративно-медоносных растений рода *Эхинацея* (*Echinacea* Moench) – *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *E. pallida* (Nutt.) Nutt, *E. angustifolia* DC [2, 4-6]. Однако появившиеся недавно сорта культивируются исключительно как декоративные растения. Поэтому представляют интерес исследования наличия в них уникальных сочетаний БАВ и возможностей их применения. **Целью** нашей работы является оценка содержания фенольных кислот и их производных в листьях природных видов и новых гибридов *Echinacea ssp*.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на растениях рода *Echinacea* (Moench) семейства *Compositae*: 3 вида *Echinacea* (*E. purpurea*, *E. paradoxa*, *E. angustifolia* Moench), 4 сорта *E. purpurea* 'Green Jewel', 'Green Envy', 'Secret Romance' и 'Элегия' селекции ЦБС, а и 2 межвидовых гибрида *E.* × *hybrida* – 'Leilani' и 'Hot Papaya' (таблица 1, рисунок 1). В исследовании использовали листья, отобранные в августе, в фазе цветения BBCH 56-67) [7], в период максимального накопления растениями БАВ.

Таблица 1 – Анализируемые виды и сорта (гибриды) рода *Echinacea* Moench.

№№ пп	Название образца	шифр	Иформация об образце, plant patent (PP), оригинатор
1	*E. purpurea*	**E_0**	природный (дикий) вид
2	*E. angustifolia*	**E_8**	природный (дикий) вид
3	*E. paradoxa*	**E_4**	природный (дикий) вид
4	*E. purpurea* 'Элегия'	**E_9**	селекция ЦБС
5	*E. purpurea* 'Green Jewel'	**E_2**	USA PP18678, Piet Oudolf
6	*E. purpurea* 'Green Envy'	**E_5**	USA PP17172, Mark Veeder
7	*E. purpurea* 'Secret Romance'	**E_7**	USA PP23036, Terra Nova
8	*E.* × *hybrida* 'Hot Papaya'	**E_1**	USA PP21022, Arie Blom
9	*E.* × *hybrida* 'Leilani'	**E_6**	USA PP23526, Terra Nova
10	*E.* × *hybrida* 'Strawberry Shortcake'	**E_3**	USA PP23020, Terra Nova

При выборе метода пробоподготовки сырья и получения экстрактов для анализа наличия целевых компонентов мы руководствовались ГОСТ Р 4.1.1672-03 [8]. Листья высушивали при t 30°C и экстрагировали 70 %-ным этанолом (30 % H_2O) при соотношении сырье/экстрагент = 1:50; экстракцию осуществлялю при t 4°C в течение 10 сут.); экстракт переносили в стеклянную герметичную тару и хранили в темноте при t 0-4°C. Анализ компонентов экстрактов с использованием для идентификации маркеров фенольных кислот и их производных (*trans*-изомеры) проводили на хроматографе Аджилент-1260 с колонкой Zorbax Eclipse Plus C18. Предварительно экстракты центрифугировали (15000 g, 3 мин, t 20°C) и пропускали через фильтры PTFE (Agilent, ФРГ) с диаметром пор 0,2 мкм, затем вносили в виалы, откуда отбор в прибор проводился автосэмплером.

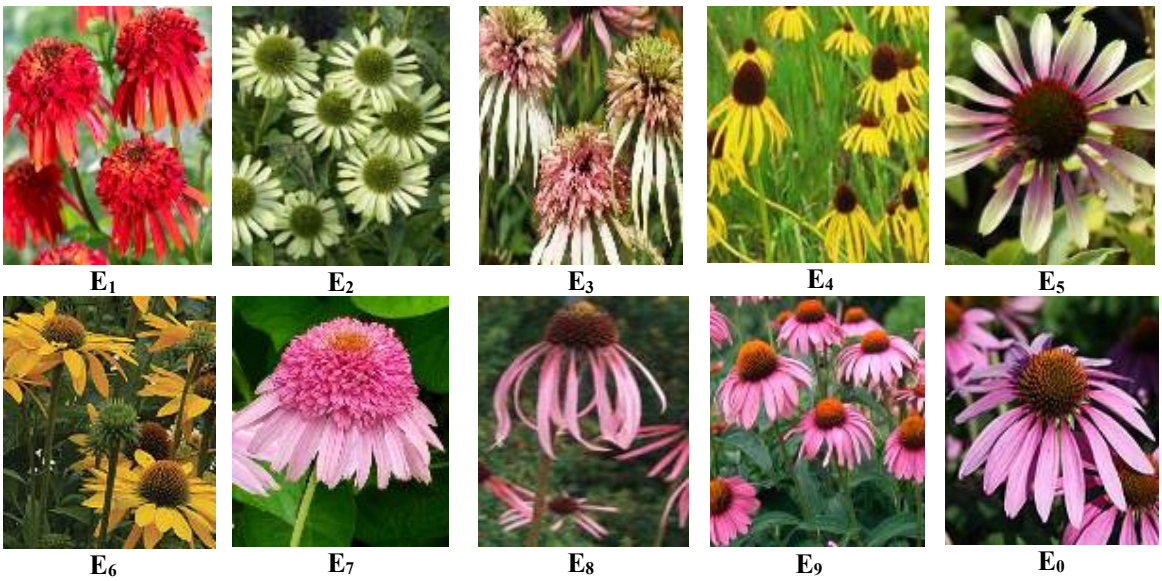

Рисунок 1 – Анализируемые виды и сорта рода *Echinacea* Moench

Хроматографию (рисунки 2, 3) осуществляли в градиентном режиме согласно методике [4] с регистрацией субстанций DAD G4212B (Agilent, США) в milli Absorbance Units [mAU].

Результаты и их обсуждение. В исследовании выявили характерные видовые и сортовые различия *Echinacea ssp*. в количественном распределении детектируемых биоактивных компонентов (таблица 2).

Некоторые компоненты (бензойная, кофейная кислоты) являются универсальными метаболитами. Другие же представляют особый интерес. Например, резвератрол – в малых дозах действует как антиканцероген; феруловая, хлорогеновая и др. кислоты – оказывают гепатопротекторное, гипогликемическое действие, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний; олеаноловая кислота – проявляет геронтопротекторное, противовоспалительное, ранозаживляющее действие, снижает артериальное давление, тонизирует нервную систему, восстанавливает сердечный ритм, нормализует уровень холестерина [9].

Анализ результатов (таблица 2) дает следующий порядок распределения образцов $\mathbf{E_i}$ по содержанию компонентов – аскорбиновая кислота: $\mathbf{E_6 \geq E_4 > E_3 \geq E_5 > E_8 = E_9 \geq E_0 \geq E_7 \geq E_1 \geq E_2}$;
кафтаровая: $\mathbf{E_8 \geq E_0 \geq E_5 \geq E_9 > E_1 \geq E_6 \geq E_7 > E_2 > E_3 > E_4}$;
коричная: $\mathbf{E_9 \geq E_3 \geq E_0 \geq E_6 \geq E_1 \geq E_7 \geq E_8 = E_2 \geq E_5 \geq E_4}$;
кофейная: $\mathbf{E_3 > E_4 \geq E_8 > E_2 \geq E_1 > E_9 = E_0 = E_7 = E_6 = E_5}$;
олеаноловая: $\mathbf{E_9 > E_4 = E_7 \geq E_3 \geq E_6 \geq E_5 \geq E_8 \geq E_1 = E_0 \geq E_2}$;
салициловая: $\mathbf{E_2 > E_0 \geq E_6 = E_9 > E_4 = E_3 \geq E_8 > E_5 > E_7 = E_1}$;
синапиновая: $\mathbf{E_6 > E_2 > E_7 = E_8 > E_9 \geq E_0 \geq E_1 = E_3 \geq E_5 > E_4}$;
феруловая: $\mathbf{E_1 \geq E_7 \geq E_2 > E_9 \geq E_0 = E_5 > E_6 \geq E_8 \geq E_3 > E_4}$;
хлорогеновая: $\mathbf{E_4 > E_9 > E_0 \geq E_8 \geq E_5 > E_6 \geq E_3 > E_1 > E_2 > E_7}$;

цикориевая: $\mathbf{E_3>E_9=E_0>E_1\geq E_7>E_8\geq E_6>E_5>E_4=E_2}$;
резвератрол: $\mathbf{E_4>E_3>E_6\geq E_5\geq E_0\geq E_9\geq E_2>E_8=E_7=E_1}$;
цинарин: $\mathbf{E_6>E_0>E_4>E_2>E_9=E_8=E_7=E_5=E_3=E_1}$;
эхинакозид: $\mathbf{E_3>E_5\geq E_4>E_2>E_9=E_0=E_8=E_7=E_6=E_1}$.

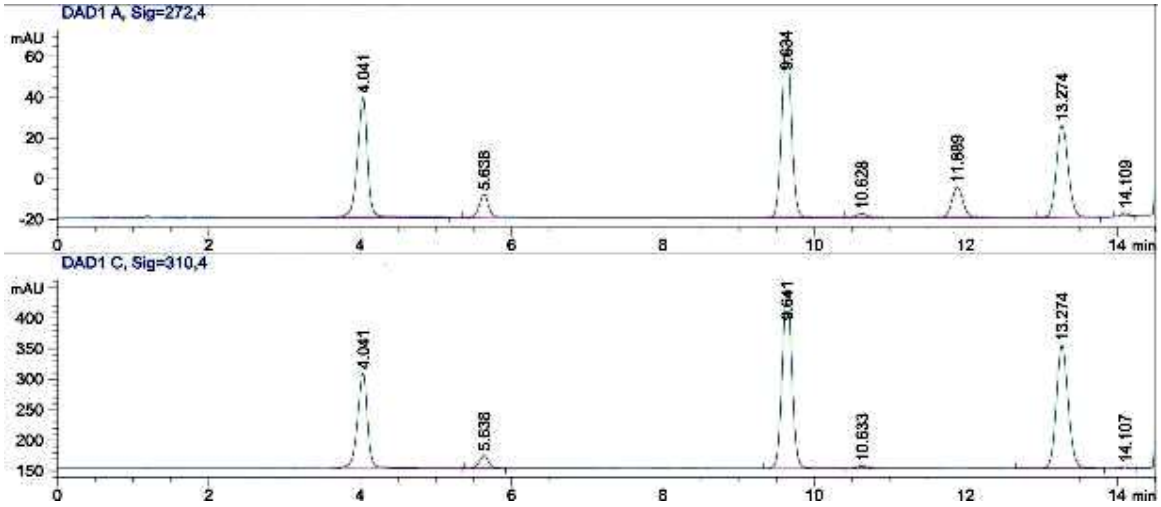

Рисунок 2 – Типичная хроматограмма маркеров определяемых компонентов.

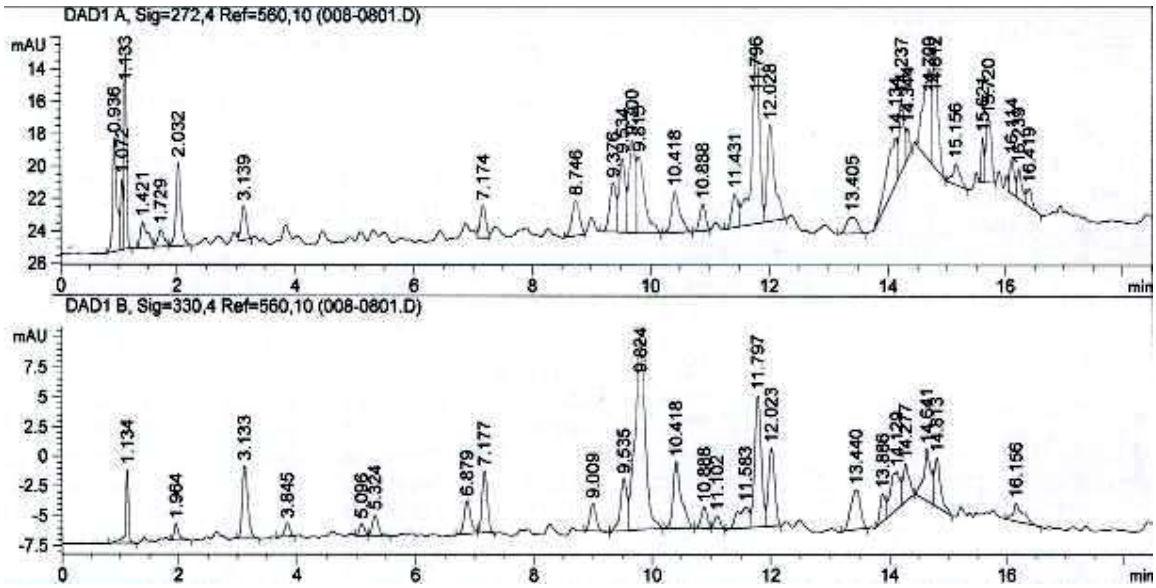

Рисунок 3 – Типичная хроматограмма экстракта листьев *Echinacea* L.
(на примере пробы *Echinacea* × *hybrida* ‘Strawberry Shortcake’ [$\mathbf{E_3}$])

Заключение. Впервые в Беларуси получены данные по содержанию БАВ в листьях декоративных сортов эхинацеи. Стоит отметить отличие от других и в сравнении с $\mathbf{E_0}$ сорта селекции ЦБС ‘Элегия’($\mathbf{E_9}$), отбор которого целенаправленно вели как на декоративные, так и на лекарственные свойства. Заслуживает внимания состав БАВ нового для Беларуси вида *E. paradoxa*, которая не используется как лекарственное растение, но является донором желтой окраски лигульных цветков новых селекционных форм. Определены новые для рода *Echinacea* ценные БАВ – резвератрол и олеаноловая кислота.

Таблица 2 – Результаты ВЭЖХ-анализов листьев 10 образцов *Echinacea ssp.* на содержание компонентов и показателей качества[¤] данного растительного материала, %.

Определяемый компонент	t_R, [#] мин	Образцы *Echinacea ssp.* (**E_i**)									
		E_0	**E_1**	**E_2**	**E_3**	**E_4**	**E_5**	**E_6**	**E_7**	**E_8**	**E_9**
Аскорбиновая к-та	1,2-1,3	0,7-4,2	0,3-2,5	0,1-1,3	2,4-6,7	5,8-7,3	0,9-6,5	1,4-10,9	0,4-4,3	0,6-5,0	0,8-4,7
Кафтаровая к-та[¤]	3,1-3,6	24,6-24,8	16,5-19,1	12,4-12,9	3,4-4,8	0,7-1,0	21,2-26,8	13,6-17,5	13,5-15,8	26,3-30,6	22,4-24,1
Хлорогеновая к-та[¤]	3,9-4,4	2,6-2,8	0,5-0,8	0,1-0,3	1,4-1,5	5,7-14,6	2,0-2,2	1,6-1,7	*ND**	1,8-2,9	3,4-3,6
Синапиновая к-та	5,3-5,4	1,4-2,0	1,5-1,7	4,7-4,9	1,5-1,6	*ND**	1,3-1,4	6,9-9,2	2,9-3,8	2,8-3,9	1,7-2,0
Цинарин[¤]	6,3-6,5	1,2-1,3	*ND**	0,6-0,7	*ND**	0,8-0,9	*ND**	1,9-2,5	*ND**	*ND**	*ND**
Эхинакозид[¤]	6,7-6,8	*ND**	*ND**	0,1-0,2	2,8-7,5	0,9-1,7	1,4-1,5	*ND**	*ND**	*ND**	*ND**
Кофейная к-та	7,2-7,9	—**	0,4-0,5	0,5-0,6	2,4-4,5	1,9-2,2	—**	—**	—**	0,8-2,9	—**
Феруловая к-та	9,5-9,9	45,6-51,1	58,9-68,4	54,4-57,7	14,8-30,9	4,8-8,2	44,7-50,8	28,4-43,4	56,7-70,3	28,6-32,8	48,4-53,2
Бензойная к-та	10,0-10,2	—**	—**	1,9-2,3	2,2-2,9	4,0-4,6	0,8-2,2	1,3-1,4	—**	—**	—**
Цикориевая к-та[¤]	10,3-10,5	3,1-3,6	1,9-2,4	*ND**	4,4-6,6	*ND**	1,1-1,2	1,4-1,5	1,6-2,4	1,3-1,8	3,1-3,7
Салициловая к-та	13,1-13,6	5,3-6,0	1,3-1,4	11,1-12,2	3,2-5,1	4,3-4,4	2,2-2,9	5,4-5,5	1,3-1,4	3,4-3,6	5,0-5,5
Резвератрол	14,1-14,4	0,6-0,7	*ND**	0,5-0,6	2,0-2,4	7,3-16,1	0,8-0,9	0,9-1,0	*ND**	*ND**	0,6-0,7
Коричная к-та	14,6-14,9	3,5-14,7	4,9-5,8	3,3-5,4	8,3-12,6	1,9-4,6	2,4-5,1	6,4-7,9	4,2-5,5	3,7-5,2	4,7-16,9
Олеаноловая к-та	15,0-15,6	0,3-2,1	0,3-2,6	0,4-1,4	1,4-2,7	1,0-3,5	0,4-3,5	0,7-3,3	0,7-3,7	1,7-1,8	3,3-3,4

[#]Время удерживания компонента (Retention time) при хроматографировании; **ND* – не обнаружили; **не определяли.

[¤]Компоненты, по содержанию которых определяется качество фитосырья *Echinacea ssp.* [2-6].

Результаты ВЭЖХ подтверждают факт преимущественной аккумуляции такого важного компонента БАВ эхинацеи как эхинокозид в соцветиях [2, 4, 6], а не в листьях, что говорит в пользу сбора на лекарственное сырье всей надземной массы. Апробированный метод ВЭЖХ может быть использован в оценке качества фитосырья по детекции требуемых веществ и в определении оптимальных сроков заготовки, а также для целей хемосистематики.

Список литературы

1. Лекарь, А.В. Экстракция кафтаровой и цикориевой кислот из эхинацеи пурпурной в среде субкритической воды / А.В. Лекарь [и др.] // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 69–79.
2. Barnes, J. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties / Barnes J., Anderson L.A., Gibbons S., Phillipson J.D. // J. Pharm. Pharmacol. – 2005. – Vol. 57, № 8. – P. 929–954.
3. Моисеев, Д.В. Определение фенольных кислот в растениях методом ВЭЖХ / Моисеев Д.В. // Химия растит. сырья. – 2014.– Т. 16, № 3. – С. 171–174.
4. Brown, P.N. Determination of major phenolic compounds in *Echinacea spp*. raw materials and finished products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation matrix extension / Brown P.N., Chan M., Paley L., Betz J.M. // J. AOAC Int. – 2011. – Vol. 95, № 5. – P. 1400–1410.
5. Соколов, С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей / Соколов С.Я. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 967 с.
6. Brown, P.N. Determination of phenolic constituents in *Echinacea* raw materials and dietary supplements by HPLC-UV: collaborative study / Brown P.N., Mudge E.M., Paley L. // J. AOAC Int. – 2016 – Vol. 99, № 5. – P. 1197–1203.
7. Meier, U. Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen : BBCH Monografie / Meier U. – Berlin : Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, 2001. – 165 p.
8. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора МЗ России, 2004. – 400 с.
9. Кухарева, Л.В. Геронтопротекторные вещества иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* Fisch. et Mey) / Л.В. Кухарева, Е.Г. Попов, Т.В. Гиль, А.Д. Луу, Х.В. Буи, Б.Х. Нинь, Н.Б.Ту, В.В. Титок // Вестник Фонда фундамент. исследований. – 2016. – № 4. – С. 21–31.