

УДК 615.322

**Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, О. С. Игнатовец,
Н. Ю. Адамцевич, А. Ю. Бесараб**

Белорусский государственный технологический университет

УСЛОВИЯ ЭКСТРАКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРАЦИЮ ТКАНЕЙ

В данной работе проанализированы тридцать экстрактов лекарственных растений из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, среди которых выбраны растения, содержащие флавоноиды, обладающие регенеративными свойствами: в цмине песчаном (*Helichrysum arenarium*) обнаружен кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, в воробейнике лекарственном (*Lithospermum officinale*) – изокверцитрин. Установлены параметры экстракции флавоноидов из цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*), влияющие на максимальный выход целевого флавоноида кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид: температура – 65°C, продолжительность экстракции – 0,5 ч, экстрагент – 50%-ный этиловый спирт. Показано, что в случае внесения минеральных удобрений при культивировании цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*) общее количество фенольных соединений увеличилось на 13,67% (содержание внутриклеточных фенольных соединений для экстракта цмина песчаного, выращенного без использования удобрений, составило 24,79 мг-экв галловой кислоты/г, выращенного с использованием удобрений – 28,18 мг-экв галловой кислоты/г), а содержание кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид – на 22,8% (экстракт цмина песчаного, выращенный без внесения удобрений, содержит 3,64 мг/г кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, а с внесением удобрений – 4,47 мг/г). На примере экстракта воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale*) отработана методика очистки растительных экстрактов от хлорофилла с помощью *n*-бутилового спирта.

Ключевые слова: флавоноиды, цмин песчаный (*Helichrysum arenarium*), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale*), кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, изокверцитрин, масс-спектр.

**A. Feskova, V. N. Leontiev, O. S. Ignatovets,
N. Yu. Adamtsevich, A. Yu. Besarab**
Belarusian State Technological University

EXTRACTION CONDITIONS AND IDENTIFICATION OF FLAVONOIDS WHICH STIMULATE TISSUE REGENERATION

In this work plants containing flavonoids with regeneration properties were picked over among thirty analyzed extracts of medicinal plants from the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus: flavonoid kaempferol-3-β-D-glucopyranoside is contained in the everlasting (*Helichrysum arenarium*) and isoquercitrin is in the littlewale (*Lithospermum officinale*). The extraction parameters of flavonoids from the everlasting (*Helichrysum arenarium*) were selected, affecting the maximum yield of kaempferol-3-β-D-glucopyranoside: temperature 65°C, the extraction time 0.5 h, extraction solvent – 50% ethyl alcohol. Also it has been established that the application of mineral fertilizers during growing the everlasting (*Helichrysum arenarium*) is enlarged the total flavonoids content (the content of intracellular phenolic compounds for the extract of the everlasting, grown without using fertilizers, is 24.79 mg eq. of gallic acid/g, and grown with fertilizers – 28.18 mg eq. of gallic acid/g) and the content of kaempferol-3-β-D-glucopyranoside is enlarged on 22.8% (the content of kaempferol-3-β-D-glucopyranoside for the extract of the everlasting, grown without using fertilizers is 3.64 mg/g, and grown with fertilizers – 4.47 mg/g). On the example of the the littlewale (*Lithospermum officinale*) extract, the method of purification of plant extracts from chlorophyll using *n*-butyl alcohol was developed.

Key words: flavonoids, everlasting (*Helichrysum arenarium*), littlewale (*Lithospermum officinale*), kaempferol-3-β-D-glucopyranoside, isoquercitrin, mass-spectrum.

Введение. Флавоноиды, содержащиеся в различных лекарственных растениях, являются фармакологически активной группой биологических веществ и проявляют антиаритмическую, антибактериальную, противовирусную, противоопухолевую, спазмолитическую, седативную и другие виды активности [1]. Отдель-

ный интерес представляют флавоноиды, способные стимулировать процессы регенерации поврежденных тканей организма.

Известно, что в стимуляции регенерации нервной ткани принимают участие флавоноиды фисетин, кемпферол (и его гликозиды) и изокверцитрин [2].

Основная часть. Целью данной работы был поиск лекарственных растений, содержащих флавоноиды, стимулирующие регенерацию тканей, подбор условий экстракции, позволяющий получить максимальный выход этих флавоноидов, а также отработка методики очистки растительных экстрактов от хлорофилла.

Объектом исследования являлись лекарственные растения из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

Экстракцию флавоноидов из лекарственного растительного сырья проводили 70%-ным этиловым спиртом в течение 1 ч, соотношение сырье : экстрагент составляло 1 : 100. Спиртовое извлечение количественно переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 6000 об/мин на протяжении 10 мин.

Водно-спиртовые экстракты анализировали при помощи хромато-масс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C18 250×4,6 мм, 5 мкм (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%-ной муравьиной кислотой в соотношении 20 : 80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Регистрацию масс-спектров проводили 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/ч.

Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения Mass Lynx. Для качественного и количественного определения флавоноидов в экстрактах лекарственных растений использовали стандартные растворы коммерческих препаратов кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида (Sigma, Франция), фисетина (Thermo Fisher, Германия) и изокверцитрина (Sigma, Германия).

По результатам хромато-масс-спектрометрического анализа спиртовых экстрактов тридцати лекарственных растений установлено, что кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид содержится в цветках цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*), изокверцитрин – в воробейнике лекарственном (*Lithospermum officinale*), фисетин обнаружить в проанализированных лекарственных растениях не удалось.

Идентификация индивидуальных веществ в экстракте цмина песчаного с помощью масс-спектрометрии позволила установить, что пик с временем удерживания 26,63 мин является кемпферол-3-β-D-глюкопиранозидом (рис. 1).

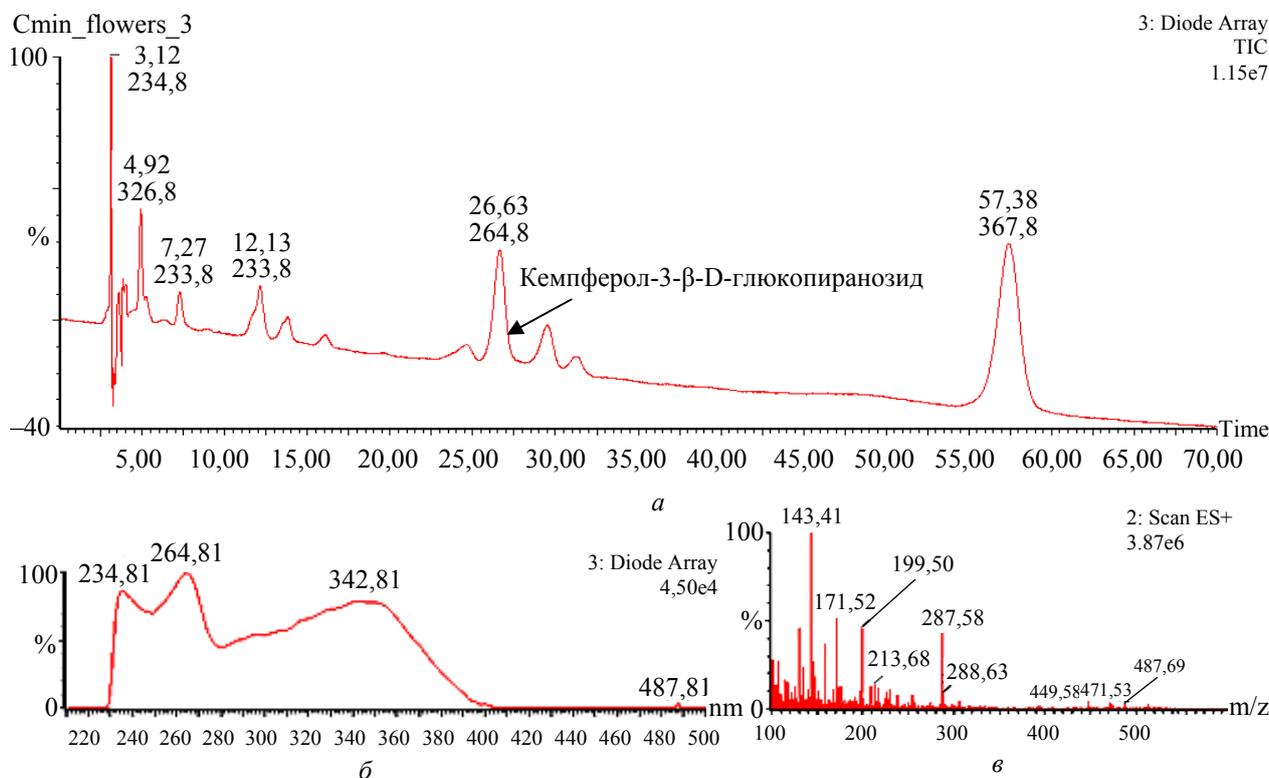


Рис. 1. Хроматограмма экстракта соцветий цмина песчаного (а), электронный (б) и масс-спектры в области положительных ионов (в) компонента хроматографического пика с временем удерживания 26,63 мин

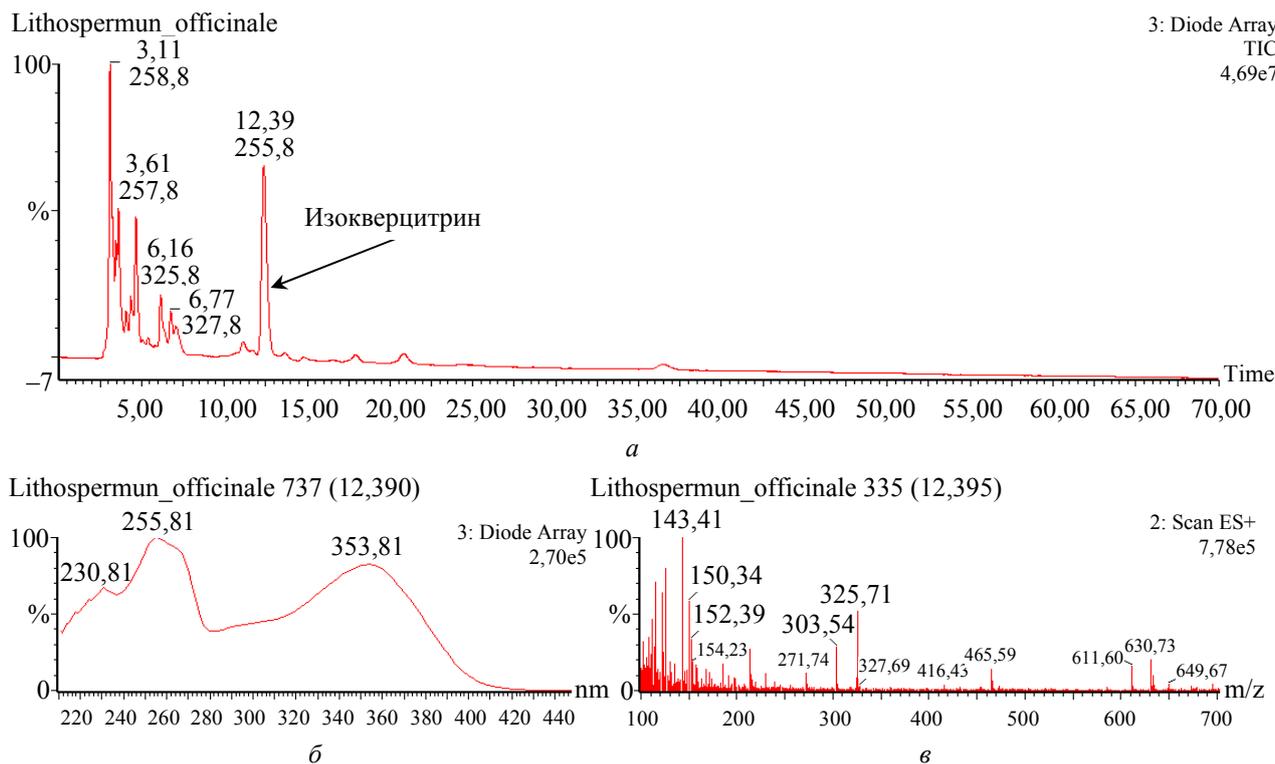


Рис. 2. Хроматограмма экстракта флавоноидов воробейника лекарственного (а), электронный (б) и масс-спектры в области положительных ионов (в) компонента хроматографического пика с временем удерживания 12,39 мин

В масс-спектре вещества данного пика наблюдается молекулярный ион с m/z 449,58, соответствующий $[M+H]^+$, т. е. кемпферол-3-β-D-глюкопиранозиду, и ион с m/z 287,58, соответствующий $[M-glu+H]^+$, – агликон кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид – кемпферол (рис. 1, в).

Хромато-масс-спектрометрический анализ экстракта воробейника лекарственного показал, что для пика с временем удерживания 12,39 мин идентифицируется молекулярный ион $[M+H]^+$ с m/z 465,59, который соответствует изокверцитрину (рис. 2).

На следующем этапе нами были проведены исследования по влиянию параметров экстракции цмина песчаного на выход кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид. Для этого сравнивали площадь пика (при $\lambda = 264$ нм), соответствующего кемпферол-3-β-D-глюкопиранозиду, на хроматограммах спиртовых экстрактов при различных условиях экстракции (таблица).

По результатам проведенных исследований сделали вывод о том, что наибольший выход кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид наблюдается при экстракции 50%-ным этиловым спиртом в течение 0,5 ч при температуре 65°C.

Также было исследовано влияние условий культивирования цмина песчаного (с внесением и без внесения минеральных удобрений) на накопление флавоноидов, которое оценивали по их суммарному содержанию. Суммарное содер-

жание флавоноидов в экстрактах цмина песчаного (мг-экв галловой кислоты/г) определяли методом Фолина – Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси, который основан на реакции фенолов с реактивом Фолина – Чокальтеу [3].

Влияние параметров экстракции цмина песчаного на выход кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид

Параметры экстракции	Площадь пика кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид при $\lambda = 264$ нм, усл. ед.
Температура 30°C, 1 сут, 70%-ный этиловый спирт	36 396
Температура 30°C, 5 сут, 70%-ный этиловый спирт	54 096
Температура 4°C, 7 сут, 70%-ный этиловый спирт	105 681
Температура 65°C, 0,5 ч, 70%-ный этиловый спирт	104 198
Температура 65°C, 0,5 ч, 50%-ный этиловый спирт	143 384

Установлено, что при внесении минеральных удобрений общее количество фенольных соединений отличается незначительно. Так, содержание внутриклеточных фенольных соединений (мг-экв галловой кислоты/г) для экстракта

цмина песчаного, выращенного без использования удобрений, составило 24,79, а выращенного с использованием удобрений, – 28,18.

Методом ВЭЖХ-МС установлено влияние внесения удобрений на накопление кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида (целевого флавоноида цмина песчаного): цмин песчаный, выращенный без внесения удобрений, содержал 3,64 мг/г кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида, а с внесением удобрений – 4,47 мг/г.

Для создания препарата, стимулирующего регенерацию тканей на основе растительного сырья, необходимо избавиться от балластных веществ из растительных экстрактов, в частности от хлорофилла. Для этого навеску высушенного спиртового экстракта растворяли в 10 мл дистиллированной воды (60°C), отфильтровывали через бумажный фильтр, добавляли 10 мл *n*-бутилового спирта и хорошо встряхивали [4]. С помощью делительной воронки удаляли органическую фазу, водно-спиртовую упаривали на роторном испарителе, к сухому остатку добавляли 5 мл дистиллированной воды и регистрировали электронные спектры в диапазоне длин волн 380–900 нм на спектрофотометре SPECORD 200 (Analytik Jena, Германия).

На рис. 3 четко проявляется полоса пропускания при λ_{\max} около 660 нм, что характерно для хлорофиллов.

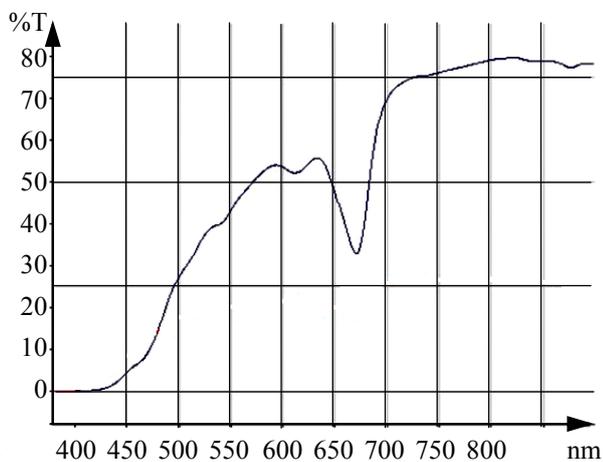


Рис. 3. Спектр пропускания водного раствора сухого экстракта воробейника лекарственного до обработки *n*-бутиловым спиртом

После обработки экстракта *n*-бутиловым спиртом данная полоса исчезает (рис. 4), что свидетельствует об удалении хлорофилла из экстракта.

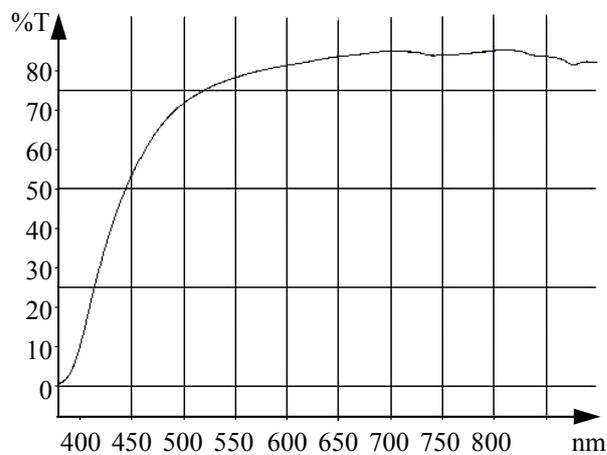


Рис. 4. Спектр пропускания водного раствора сухого экстракта воробейника лекарственного после обработки *n*-бутиловым спиртом

Заключение. Таким образом, среди тридцати проанализированных экстрактов лекарственных растений из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси в цмине песчаном (*Helichrysum arenarium*) обнаружен кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, а в воробейнике лекарственном (*Lithospermum officinale*) – изокверцитрин.

Также установлено, что наибольший выход кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида из экстрактов цмина песчаного наблюдается при экстракции 50%-ным этиловым спиртом в течение 0,5 ч при температуре 65°C.

Сделан вывод о том, что при внесении минеральных удобрений при культивировании цмина песчаного общее количество фенольных соединений увеличилось на 13,67%, а содержание кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида – на 22,8%.

На примере экстракта воробейника лекарственного отработана методика очистки экстрактов из растительного сырья от хлорофилла, заключающаяся в его удалении *n*-бутиловым спиртом.

Литература

1. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications / J. E. Brown [et al.]; eds. O. M. Andersen, K. R. Markham. Boca Raton: CRC Press, 2006. 1256 p.
2. Муравьева Д. А., Самылина И. А., Яковлев Г. П. Фармакогнозия. М.: Медицина, 2002. 656 с.
3. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent // Methods in Enzymology. 1999. Vol. 299. P. 152–178.
4. Navaz Kharazian Identification of flavonoids in leaves of seven wild growing *Salvia* L. (Lamiaceae) species from Iran // Progress in Biological Sciences. 2013. Vol. 3, no. 2. P. 81–98.

References

1. Brown J. E., Cheynier V., Clifford M., Dangles O., Davies K. M., Dufour C., Duthie G. G., Ferreira D., Fossen T., Gould K. S., Grayer R. J., Hostettmann K., Jay M., Jordheim M., Kyle J. A. M., Lister C., Marais J. P. J., Marston A., Schwinn K. E., Slade D., Valant-Vetschera K. M., Veitch N. C., Williams C. A., Wiseman H., Wollenweber E. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, CRC Press, 2006. 1256 p.
2. Murav'yeva D. A., Samylina I. A., Yakovlev G. P. *Farmakognoziya* [Pharmacognosy]. Moscow, Meditsina Publ., 2002. 656 p.
3. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152–178.
4. Navaz Kharazian Identification of flavonoids in leaves of seven wild growing *Salvia* L. (Lamiaceae) species from Iran. *Progress in Biological Sciences*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 81–98.

Информация об авторах

Феськова Елена Владимировна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Леонтьев Виктор Николаевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

Игнатовец Ольга Степановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatovets@belstu.by

Адамцевич Наталия Юрьевна – аспирант. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: natali_adamcevi@mail.ru

Бесараб Анна Юрьевна – студентка. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: annabesarab@rambler.ru

Information about the authors

Feskova Alena – PhD (Engineering), Senior Researcher, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Leontiev Viktor Nikolaevich – PhD (Chemistry), Associate Professor, Head of the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Ignatovets Olga Stepanovna – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatovets@belstu.by

Adamtsevich Natallia Yur'yevna – PhD student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natali_adamcevi@mail.ru

Besarab Anna Yur'yevna – student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail annabesarab@rambler.ru

Поступила 08.11.2018