

УДК 615.322

Студ. А.Ю. Бесараб

Науч. рук.: ст. науч. сотр. Е.В. Феськова; зав. каф. В.Н. Леонтьев
(кафедра биотехнологии, БГТУ)**ПОДБОР МЕТОДИК И ОЧИСТКА ЭКСТРАКТОВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОТ ХЛОРОФИЛЛА**

Хлорофилл – зеленый пигмент, содержащийся в хлоропластах растений и придающий им зеленый цвет. Существуют два типа хлорофилла: а и b, которые различаются по структуре боковых цепей (в хлорофилле а это CH_3 , в b-изомере – CHO) и в максимумах поглощения в электронных спектрах. В естественных условиях соотношение хлорофиллов соответствует пропорции $3 : 1 = a : b$ [1].

Объектом исследований являлись лекарственные растения из коллекции ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» урожая 2018 года, содержащие флавоноиды, обладающие регенеративными свойствами: цмин песчаный (*Helichrysum arenarium*) (кемпферол-3- β -D-глюкопиранозид) и воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale*) (изокверцитрин). Экстракцию фенольных соединений проводили 50%-ым этиловым спиртом в течение 30 мин при температуре 65°C, соотношение сырья: экстрагент – 1:25. После завершения экстракции образцы фильтровали через бумажные фильтры и упаривали на роторном испарителе досуха.

Необходимость очистки растительных экстрактов от хлорофилла обусловлена тем, что зеленовато-коричневый или бурый цвет многих неочищенных растительных экстрактов снижают их товарную ценность. Для создания препарата, стимулирующего регенерацию тканей на основе растительного сырья, необходимо избавиться от балластных веществ из растительных экстрактов, в частности от хлорофилла.

Отработку методов разделения экстрактов от хлорофилла проводили на экстракте воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale*), целевым компонентом которого является изокверцитрин. Для этого применяли различные подходы: жидкость-жидкостная экстракция; очистка растительных экстрактов фильтрованием через слой силикагеля на фильтре Шотта; адсорбционная хроматография на силикагеле; гель-хроматография на Акрилекс П-2. Контроль очистки экстрактов от хлорофиллов осуществляли по электронным спектрам, зарегистрированным в диапазоне длин волн 250–900 нм на спектрофотометре SPECORD 200 (Analytik Jena, Германия), методами ТСХ на пластинках TLC Silica gel 60 (MERCK, Германия) и ВЭЖХ-МС на хромато-масс-спектрометре (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C_{18} 250×4,6 мм, 5 мкм (Thermo Electron Corporation,

США). Очистку экстрактов от хлорофиллов с помощью жидкость-жидкостной экстракции проводили с использованием двух экстрагентов (*n*-бутилового спирта и метиленхлорида). Для этого навеску высушенного спиртового экстракта растворяли в 10 мл дистиллированной воды (60°C), фильтровали через бумажный фильтр, добавляли 10 мл *n*-бутилового спирта или метиленхлорида и хорошо встряхивали [2]. С помощью делительной воронки отделяли органическую фазу. Затем водную и органическую фазы упаривали на роторном испарителе досуха, к сухому остатку добавляли 5 мл дистиллированной воды и регистрировали электронные спектры.

Результаты проведенной жидкость-жидкостной экстракции и ВЭЖХ-МС показали, что при обработке *n*-бутиловым спиртом экстракта воробейника лекарственного хлорофиллы переходят в органическую фазу, куда в большем количестве переходит и целевой компонент воробейника лекарственного - изокверцитрин. Следовательно, обработка *n*-бутиловым спиртом подходит для очистки от хлорофиллов, но не применима к исследуемым нами экстрактам.

В случае экстракции метиленхлоридом изокверцитрин не был обнаружен в органической фазе, а наблюдался в водной фазе, в которой содержался и хлорофилл. В связи с чем, можно сделать вывод о неэффективности экстракции метиленхлоридом для очистки растительных экстрактов от хлорофиллов.

Очистку растительных экстрактов фильтрованием через слой силикагеля на фильтре Шотта проводили этиловым спиртом с возрастающей концентрацией. В собранных фракциях регистрировали электронные спектры. Полученные результаты показали, что максимумы поглощения при 350 нм и 670 нм (рисунок 1), характерные для изокверцитрина и хлорофиллов соответственно, наблюдаются в одних и тех же собранных фракциях, что свидетельствует о том, что разделение хлорофилла от изокверцитрина не произошло.

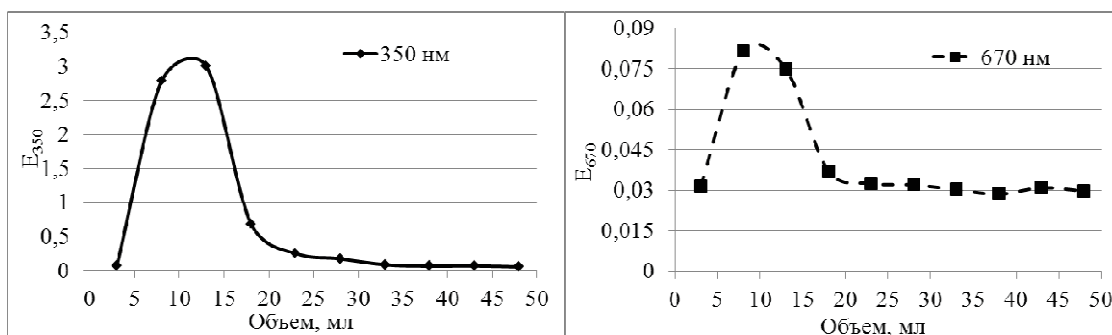


Рисунок 1 – Профили элюирования, построенные на основании измерения экстинкции при $\lambda=350$ нм и $\lambda=670$ нм

Проведенный далее ТСХ анализ подтвердил это предположение. Адсорбционная хроматография на силикагеле проводилась метиловым спиртом и также не дала положительных результатов.

Очистку экстракта воробейника лекарственного от хлорофилла с помощью гель-хроматографии на Акрилекс П-2 проводили следующим образом: навеску сухого экстракта воробейника лекарственного растворяли в 3 мл дистиллированной воды, фильтровали и вносили в колонку. В качестве элюента использовали дистиллированную воду. Во фракциях, собранных на выходе из колонки, регистрировали спектры поглощения, на основании которых фракции объединяли и концентрировали на роторном испарителе, затем проводили ТСХ (элюент этилацетат : метанол : муравьиная кислота = 10 : 2 : 1) и ВЭЖХ-МС анализы.

По результатам ТСХ наблюдали чёткие пятна, указывающие на наличие изокверцитрина в определённых фракциях, а также на отсутствие в них хлорофилла, что было подтверждено ВЭЖХ-МС. Таким образом, Акрилекс П-2 обеспечивает необходимую очистку экстракта воробейника лекарственного от хлорофиллов.

По полученным в ходе исследований результатам аналогично с экстрактом воробейника лекарственного провели очистку экстракта цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*), целевым компонентом которого являлся кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, от хлорофиллов с помощью гель-хроматографии на Акрилекс П-2.

По результатам ТСХ (элюент изопропиловый спирт) наблюдали чёткие пятна, указывающие на наличие кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида в определённых фракциях, и на отсутствие в этих фракциях хлорофилла, что было подтверждено ВЭЖХ-МС.

Таким образом, нами подобран способ очистки экстрактов воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale*) и цмина песчаного (*Helichrysum arenarium*) от хлорофиллов, основанный на гель-хроматографии на носителе Акрилекс П-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хлорофилл [Электронный ресурс] / foodandhealth.ru. – Режим доступа: <https://foodandhealth.ru/komponenty-pitaniya/hlorofill/> – Дата доступа: 02.03.2019.

2. 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.