

**НАКОПЛЕНИЕ И СОСТАВ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ
НАДЗЕМНЫХ И ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ ЛЕВЗЕИ
САФЛОРОВИДНОЙ**

Н.П.Тимофеев , Д.Г. Чухчин '

НИИ "КХ БИО", Коряжма, Россия; timfbio@atnet.ru

²Архангельский ГосТехУниверситет, Архангельск;
dimatsch@mail.ru

Введение. Левзея сафлоровидная - *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin используется в различных отраслях народного хозяйства: в пищевой и фармацевтической промышленности; медицине, технологиях иммунокоррекции, системах жизнеобеспечения и защиты человека в экстремальных условиях;

агропромышленном комплексе. Применяются как подземные, так и надземные части растения в виде порошков, отваров, настоев и настоек, жидких и сухих экстрактов. Комплексная биологическая активность продуктов определяется наличием в их составе веществ разных химических классов, извлекаемых в ходе водной и спиртовой экстракции, среди которых ведущую роль играют экдистероиды (в т.ч. экдистерон, экдизон). Экдистероиды одинаково хорошо извлекаются как в водные, так и спиртовые экстракты [1].

Исходя из анализа литературы, наблюдается большая разница в дозах и активности эк-дистероид содержащих субстанций. Разовые дозы экстрактов *R. carthamoides*, достаточные для проявления физиологических эффектов в организме человека и животных, варьируют от 0.035 до 5-20 мг/кг в пересчете на экдистерон [2], а эффективность самого экдистерона уступает по активности исходным экстрактам [3]. Причина здесь может заключаться в неоднородности состава экстрактов, полученных как из разных органов растения и заготовленных в разные фазы развития, так и элиминацией сопутствующих веществ в процессе очистки.

Цели и задачи исследований. Аналитическое исследование лекарственного сырья *R. carthamoides* было проведено нами для выявления закономерностей накопления экстрактивных веществ, относительной их изменчивости в процессе роста и развития растений, а также выявления спектра соединений, близко связанных с экдистероидами.

Методика. Исследовали подземные и надземные части растений *R. carthamoides* средне-генеративного возраста собранных в разные фазы развития. В составе вегетативных побегов изучали взрослые розеточные листья, отобранные о время отрастания, бутонизации, цветения, плодоношения и повторной вегетации (отава); в составе генеративных - стебли, стеблевые листья, соцветия, венчики, цветоложе и семена (бутонизация-цветение). В составе подземных органов анализировали корневище и придаточные корни (фаза покоя и выход из него).

Растительный материал отбирали в агропопуляции от 20-25 растений, сушили в тени при температуре 20-45 °С, относительной влажности воздуха 25-40 %. Средний образец измельчали на

электромельнице до частиц размером 2-3 мм. Содержание экстрактивных веществ определяли 2 способами: а) водная экстракция (Н²О-экстракт) на водяной бане в соотношении 1:20), б) экстракция 70 % этанолом (EtOH-экстракт) в соотношении 1:10). Экстракты после фильтрации и промывки сушили при 105 °С (2 часа), охлаждали и взвешивали. Концентрация экстрактивных веществ в образцах приведено в пересчете на сухое вещество.

Анализ состава веществ из экстрактов проводили методом эксклюзионной хроматографии. Сухую навеску испытуемых образцов экстрагировали в течение 24 часов 0.1 М фосфатным буфером (температура 30 °С, гидромодуль 15, рН=6.9, антисептик 0.05 % азид натрия). Элюент в течение 10 минут центрифугировали со скоростью 6000 об/мин и использовали для анализа. Оборудование и режимы их работы: хроматограф «Стайер» (г. Москва, НПО «Аквилон»), колонка «Репотепех» BioSep-SEC-S 3000, размер частиц сорбента - 5 мкм, размер пор - 29 нм, привитая фаза C18, геометрические размеры колонки - 300x7.8мм, объем вводимой пробы 20 мкл, скорость элюирования 1000 мкл/мин, детектор - УФ 280 нм. Калибровку проводили на стандартных образцах свиного тироглобулина, иммуноглобулина А и G, сывороточного и яичного альбумина, миоглобина, экдистерона, парацетамола.

Результаты. Сезонное развитие *R. carthamoides* начинается в конце апреля, когда почки возобновления, зимующие на многолетнем корневище, выходят из фазы покоя и в ходе отрастания разворачиваются в вегетативные побеги, состоящие из розеточных листьев. Через 5-7 дней начинают отрастать генеративные (репродуктивные) побеги. Вначале вегетативные побеги опережают в своем развитии генеративные, их рост во время бутонизации (1-2 декада июня) замедляется, а затем, во время фазы цветения (3-я декада июня), приостанавливается [4]. Репродуктивные побеги после семеношения (середина июля) отмирают, розеточные же листья новой генерации продолжают вегетировать до наступления постоянных заморозков.

Накопление и концентрация экстрактивных веществ в различных органах тесно связана с их функцией в жизнедеятельности растения и фазой развития (табл. 1).

Таблица 1. Содержание экстрактивных веществ в различных органах *Rhaponticum carthamoides*

Части и органы растений	Фаза развития	H ₂ O-экстракт	EtOH-экстракт
Подземные части:			
Корни придаточные 44	покой	15.6	17.4
	выход из покоя	22.1	23.2
Корневище Почки	выход из покоя	27.4	12.2
	выход из покоя	21.4	24.4
Вегетативные побеги:			
Листья розеточные (С 44 44 44 44	отрастание	33.5	19.8
	бутонизация	34.8	27.6
	начало цветения	41.3	30.1
	налив семян	37.4	26.0
	плодоношение	16.9	25.6
	завершение вегетации	44.8	25.9
Генеративные побеги:			
Листья стеблевые Стебли	бутонизация	39.9	21.1
	начало цветение	21.7	17.0
Соцветия (корзинки) Венчики соцветия	цветение	19.9	13.3
	цветение	17.4	26.2
Семена 44	цветение	20.9	23.4
	плодоношение	17.9	18.5
	покой	15.5	14.5

Минимальное содержание как водо-, так и спирторастворимых веществ приходится на фазу покоя - 15-17 % (корни и семена). Во время выхода из покоя концентрация водорастворимых веществ увеличивается до 22-27 %, первоначально в подземных органах (корни и корневища). В почках возобновления, представляющих связывающее звено между подземными и надземными органами, концентрация в начале отрастания 21.4 %, а после развертывания розеточных листьев - 33.5 %. Во время активного роста и развития в мае-июне она достигает 35-41 %, а затем, после отцветания и формирования семян, резко снижается до 16.9 % (фаза плодоношения). В новой генерации активно развивающихся вегетативных побегов (отава), содержание водорастворимых веществ вновь повышенное и

составляет 38-45 %. В генеративных побегах наблюдается аналогичная зависимость - максимальная концентрация в стеблевых листьях во время фазы бутонизации (39.9 %), в период активного роста и развития. После вступления в фазу цветения и прекращения роста уровень водорастворимых веществ минимален (17-22 %).

Спирторастворимые вещества содержатся в меньшей концентрации, чем водорастворимые. Концентрация их в пределах 12-24 % для подземных органов, 14-30 % для надземных. Синтез и накопление максимальных количеств совпадает с переходом к фазе репродукции (цветение и формирование семян), минимальных - с фазой покоя.

Состав экстрактов. В хроматографическом профиле экстрактов *R. carthamoides* выявлено 14 пиков. По времени выхода сигнала из колонки их можно подразделить на 3 зоны: а) пептиды и белковые соединения - 9.5-11.7 мин; б) экидистероиды - 11.7-12.3 мин; в) низкомолекулярные соединения - 12.7-19.1 мин. Наличие низкомолекулярных белков (3 пика в диапазоне 6-17 kD, 4 пика пептидов в диапазоне 1-3 kD) характерно для зимующих органов (почки и придаточные корни). Для органов, формирующихся в летний период, сигналы этих классов соединений отсутствуют или уровень их носит следовый характер.

Экидистерон (M=486) обнаружен во всех растительных пробах, экидизон (M=464) содержится в стеблевых листьях и практически отсутствует в тканях почек, молодых корней и розеточных листьев. Исходя из соотношения высот пиков, концентрация экидистерона выше в образцах розеточных листьев, собранных в более ранние фазы развития. Качественный состав экидистероидов и относительные их уровни коррелируют с результатами ВЭЖХ-анализа [4].

Для хроматограмм сухого и жидкого экстракта характерно присутствие экидистерона и экидизона, и одновременно, отсутствие высоко- и низкомолекулярных соединений. Что свидетельствует о происхождении их из экидистероид содержащих растений, а также о прохождении технологических операций по очистке от сопутствующих веществ.

Из комплекса низкомолекулярных веществ интенсивные 3 пика (M= 140-200) характерны для листовых органов, но

минимальны в стеблях; вероятнее всего, они участвуют в метаболизме экистероидов. Известно, что экистерон исходно присутствует в растениях не в чистом виде, а в виде конъюгатов с другими, хорошо растворимыми в воде продуктами вторичного обмена веществ: неорганическими (сульфаты, фосфаты) и органическими кислотами (ацетаты, бензоаты, циннаматы), сахарами (глюкозиды, галактозиды, ксилозиды) и т.д. [5]. Легкие фракции во время фазы покоя в корнях и семенах отсутствуют (менее $M=T55$ и 145).

Выводы. Накопление экстрактивных веществ в органах *R. carthamoides* тесно связано с их функцией в жизнедеятельности растения и фазой развития. Минимальный уровень водных экстрактов (12-17 %) во время фазы покоя (корни и корневища, семена). Во время выхода из покоя и отрастания происходит насыщение (23-24 %). Максимальное количество водорастворимых веществ (35-45 %) накапливается в розеточных и стеблевых листьях в период активного роста и развития (бутонизации и повторной вегетации), в условиях прохладной погоды и оптимальной влажности. Повышенный синтез и накопление спирторастворимых веществ (с 12 до 24 % для подземных органов, с 14 до 30 % для надземных) связан с повышенной температурой воздуха и переходом к репродукции (цветение и формирование семян).

Экистерон содержится в экстрактах из всех органов растения, концентрация его выше в образцах розеточных листьев, собранных в более ранние фазы развития. В генеративных побегах, развивающихся позднее, дополнительно присутствует и экизон. Для экстрактов из зимующих органов (почки и придаточные корни) характерны низкомолекулярные пептиды и белки, из летнеразвивающихся листовых органов - интенсивные пики комплекса низкомолекулярных веществ. Легкие фракции отсутствуют в корнях и семенах во время фазы покоя.

Благодарности. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Гранта Администрации Архангельской области и РФФИ (№ 08-04-98840).

Литература. 1. Тимофеев. Н.П., Лапин А.А., Зеленков В.Н. Оценка качества лекарственного сырья левзеи сафлоровидной

методом бромной антиокислительной емкости // Бутлеровские сообщения, 2006, 8(2): 35-40.

2. Тимофеев Н.П. Достижения и проблемы в области изучения, использования и прогнозирования биологической активности экдистероидов (Обзор) // Бутлеровские сообщения, 2006, 8(2): 7-34.

3. Федоров В.Н., Раков А.А., Смирнов НА. и др. Сравнительная эффективность фармакопейных препаратов адаптогенов. В сб. Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье. Симферополь, 1997, 6-8: 486-487.

4. Тимофеев Н.П., Володин В.В., Фролов Ю.М. Распределение 20-гидроксиэкдизона в структуре биомассы надземной части *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin // Растительные ресурсы, 1998, 34(3): 63-69.

5. Лафон Р. Фитоэкдистероиды и мировая флора: Разнообразие, распространение, биосинтез и эволюция // Физиология растений, 1998, 45(3): 326-346.