ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ РФ

БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

«ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА: ФИТОТЕРАПИЯ, ФАРМАЦИЯ, ФАРМАКОЛОГИЯ»

8 февраля 2008 г.

Белгород 2008

ББК 42.37+85.118.72
С 65

Печатается по решению
кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии
фармацевтического факультета,
научно-технического совета природного парка
«Нежеголь» Белгородского
государственного университета
Белгородского отделения
Русского ботанического общества

Рецензенты:
А.М. Рабинович, д.фарм.н., профессор ботаники, Заслуженный деятель науки РФ, Всероссийский НИИ ароматических и лекарственных растений РАСХН
Н.Б. Дремова, д.фарм.н., профессор, Курский ГМУ

Редакционная коллегия:
В.Н. Сорокопудов, О.О. Новиков, В.К. Тохтарь

С 65 Лекарственные растения и биологически активные вещества: фитотерапия, фармация, фармакология: матер. междунар. научн.-практич. конф., посвященной Дню Российской науки, Белгород, 8 февраля 2008 г. / Под редакцией профессора В.Н. Сорокопудова. – Белгород: «Политерра», 2008. – 302 с.

В сборник включены материалы докладов, заявленных на международную научно-практическую конференцию, посвященную дню Российской науки 8 февраля 2008 года. Представленные материалы отражают проблемы фитотерапии, фармации, фармацевтического маркетинга, фармакологии, вопросы по интродукции лекарственных, плодовых и ягодных растений.

Сборник предназначен для специалистов в области фитотерапии, фармации, фармацевтического маркетинга, фармакологии, охраны растительного мира, а также для преподавателей, аспирантов и студентов высших учебных заведений фармацевтического и биологического профилей.

© Белгородский государственный университет

Бубенчикова В.Н., Аль-гафри Салех Касем, Паршева Е.В.
ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ И ПЛОДОВ ДУРНИШНИКА БЕЛОВАТОГО (XANTHIUM RIPARIUM LASCH) **96**
Касимова Т.Э.
ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТА ИЗ ПЛОДОВ ХУРМЫ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ. **99**
Ковалев М.Г.
НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ РОДА *CERASUS* L. **106**
Киселева Т.С., Фадеева Д.А., Новиков О.О., Писарев Д.И., Жилякова Е.Т., Васильев Г.В.
СЕБОРЕЯ: ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ПРОБЛЕМЫ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ **108**
Кузьмичева Н.А., Созинов О.В.
РЕСУРСНО-ФИТОХИМИЧЕСКИЕ ОПТИМУМЫ ЗАГОТОВКИ ЛИСТЬЕВ БРУСНИКИ **111**
Литвиненко Ю.А., Музычкина Р.А.
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФИТОПРЕПАРАТОВ НЕКОТОРЫХ КАЗАХСТАНСКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА *RUMEX* **113**
Навальнева И. А, Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н.
ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ ХЕНОМЕЛЕСА ЯПОНСКОГО В УСЛОВИЯХ БОТАНИЧЕСКОГО САДА БЕЛГОРОДСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА **115**
Новикова М.Ю., Жилякова Е.Т., Новиков О.О., Гладченко М.П., Покровский М.В.
ТАУРИН И ТЕРАПИЯ КАТАРАКТЫ **118**
Тимофеев Н.П., Чухчин Д.Г., Майер Л.В.
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ СОСТАВОВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ *(LEUZEA, RHAPONTICUM CARTHAMOIDES)* **123**
Фадеева Д.А, Т.С. Киселева, Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Е.Т. Жилякова, Г.В. Васильев.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 3,5,4'-ТРИГИДРОКСИСТИЛЬБЕНА В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОСЕБОРЕЙНОГО АГЕНТА **129**
Лессовая Ж., Писарев Д.И.
РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ФИТОКОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ **132**

Тимофеев Н.П., Чухчин Д.Г., Майер Л.В. Хроматографический анализ сложных составов из экстрактов левзеи сафлоровидной *(Leuzea, Rhaponticum carthamoides)* / Лекарственные растения и биологически активные вещества: фитотерапия, фармация, фармакология. Белгород, Политерра, 2008. – С. 123-129.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ СОСТАВОВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ *(LEUZEA, RHAPONTICUM CARTHAMOIDES)*

Н.П.Тимофеев[1], Д.Г. Чухчин[2], Л.В. Майер[2]
[1]НПП "КХ БИО", Коряжма, Россия; *timfbio@atnet.ru*
[2]Архангельский ГосТехУниверситет, Архангельск; dimatsch@mail.ru

Введение. *Rhaponticum carthamoides* (Leuzea, левзея, рапонтикум сафлоровидный) и препараты на его основе внесены в Государственную фармакопею СССР IX-XI изданий (1961, 1968, 1987, 1990), Реестр лекарственных средств России (1995, 1998). В реализации биологической активности вида ведущую роль играют фитоэкдистероиды (Сыров и Курмуков, 1976, Slama et al., 1996, Тодоров и др., 2000). В качестве лекарственных средств используются листья, корни и корневища, сухие порошки и вытяжки из лекарственного сырья (отвары, настои и настойки, жидкие и сухие экстракты).

Экстракт вырабатывающие предприятия из корневищ функционируют в Бийске, Томске и Красногорске (Регистр..., 1993; Здравоохранение..., 1994). В Зональном НИИСХ Северо-Востока (г. Киров) на основе экстракта листьевой части растения разработан жидкий ветпрепарат *Биоинфузин* (Ивановский, 2000). В Сибирском государственном медицинском университете (Томск), совместно с Институтом общей химии (Новосибирск), созданы новые лекарственные формы на основе ампульных растворов и сухих экстрактов (Краснов, 2006).

С целью повышения концентрации действующих веществ часто проводят первичную очистку полученного экстракта, без изоляции индивидуальных соединений (препарат "Левзеин" и их аналоги). Технологическая

схема состоит из операций по экстрагированию сырья 20 – 70 % этанолом; очистки от сопутствующих веществ раствором ацетата свинца или других осадителей – с целью удаления белков, пектиновых веществ, таннинов и органических кислот; фильтрования и обессоливания фильтрата с использованием ионообменных смол (Саратиков и др., 1970; Пунегов и др., 1999). На основе высокоочищенных экдистероидов *R. carthamoides* выпускается фармпрепарат *Экдистен* (Машковский, 1993), а также многочисленные его аналоги, таблеточные формы с различной степенью химической чистоты – препараты *Russ Olimpic, Triboxin, Cytodyn ZM* и т.д. (Lafont и Dinan, 2003; Тимофеев, 2004).

Результаты многих сравнительных исследований свидетельствуют, что наблюдается большая разница в дозах и активности экдистероид содержащих субстанций, получаемых из лекарственного сырья *R. carthamoides* (Федоров и др., 1997; Hamburger et al., 2006, Biskup & Eojkowska, 2006). По всей видимости, фармакологическая активность вида обусловлена сложным комплексом фитоэкдистероидов с продуктами основного и вторичного обмена веществ, происходящих путем суммирования эффектов через минорные составы и посредники.

Цели и задачи исследований. Известно, что важную роль в индуцировании факторов активности экдистероидов играют низкомолекулярные стрессовые белки и пептиды (Тимофеев, 2006). Последние не являются промежуточными продуктами в синтезе белка и наделены разносторонней фармакологической активностью (Рукавцова и др., 2006).

В нашем случае разделение и профильный анализ состава многокомпонентных смесей *R. carthamoides* методом эксклюзионной или гельхроматографии было осуществлено для изучения особенностей метаболизма, закономерностей присутствия в лекарственном сырье мажорных экдистероидов, наличия связи с низкомолекулярными белками и пептидами. По совокупности наличия или отсутствия пиков веществ в экстракте метод может применяться также при идентификации вида, комплексной оценке подлинности фармпрепаратов и БАДов из растения, введенных в официальную фармакопею, или же их фальсификации.

Методы. Анализировали подземные и надземные части растений *R. carthamoides* 9-11 года жизни, собранные в разные фазы развития: почки и корневища – в фазе покоя (ноябрь-декабрь), листья – отрастания, бутонизации и цветения (апрель-май-июнь), семена – плодоношения (июль). Растительный материал сушили при температуре 25...40 °С в тени, относительной влажности воздуха 25 – 40 %. Средний образец формировали методом квартования. Сухую навеску испытываемых образцов экстрагировали в течение 24 часов 0.1 М фосфатным буфером. Температура 30 °С, гидромодуль 15, pH=6.9, антисептик азид натрия (0.05%). Затем элюент в течение 10 минут центрифугировали со скоростью 6000 об/мин на лабораторной центрифуге и использовали для хроматографического анализа.

Анализ проводили методом эксклюзионной хроматографии, откалиброванной для анализа белковых соединений, в следующих условиях: хроматограф «Стайер» (г. Москва, НПО «Аквилон»), колонка «Phenomenex» BioSep-SEC-S 3000, размер частиц сорбента – 5 мкм, размер пор – 29 нм, привитая фаза С18, геометрические размеры колонки – 300х7.8мм, объем вводимой пробы 20 мкл, скорость элюирования 1000 мкл/мин, детектор – УФ 280 нм.

Для веществ с высокой молекулярной массой, то есть со временем выхода 10 минут и менее, разделение веществ в колонке проходит по эксклюзионному механизму, по вероятности попадания молекул в поры сорбента. Гидрофильные вещества должны выходить около 11-12 минут, остальные по мере увеличения гидрофобности. После 11 минут из колонки выходят вещества, которые равновероятно способны проникать в поры 29 нм, и принцип разделения превращается в обращенно-фазовый, поскольку на поверхность привита фаза С18.

Калибровочный график строился на стандартных образцах белков и экдистероидов с известной молекулярной массой – свиного тироглобулина, иммуноглобулина А и G, сывороточного и яичного альбумина, миоглобина, а также фитоэкдистероида *20-hydroxyecdysone* 80 % чистоты, сухого полуочищенного экстракта *R. carthamoides* (содержит экдистероиды *20-hydroxyecdysone* и *ecdysone*), парацетамоле и др. По оси абсцисс (X) откладывали значения времени удерживания элюента в хроматографической колонке, характеризующей значения натурального логарифма молекулярной массы, по оси ординат (Y) – пики сигналов.

Результаты. Разделение сложного состава многокомпонентных смесей на молекулы отдельных веществ по размеру, за счет их различной способности проникать в поры сорбента, позволяет провести фракционирование химических веществ с различными молекулярными массами. Получаемые хроматограммы несут информацию об исследуемых веществах, и являются характеристичными для каждого соединения.

Для физиологически активных растительных белков характерным свойством является их высокая гидрофильность и поглощение УФ-лучей при 280 нм, обусловленное наличием ароматических аминокислот. Экдистероиды содержат хромофорную 14а-гидрокси-7-ен-6-он группу с двойными связями, в результате биохимической конверсии они могут образовать двойные связи в положениях 7(9)-11, 24-25, 25-26 или 24-28. При этом происходит сдвиг максимума УФ-поглощения с 242 (254) нм, характерной для химически чистых экдистероидов в растворе этанола, в сторону 300 нм. Большинство фенольных соединений, содержащихся в растительных экстрактах, из-за наличия двойных связей и конъюгации с другими веществами, также обнаруживаются по УФ-отклику в длинноволновой области (≈300 нм).

Выявлено 14 пиков в обобщенном хроматографическом "слепке" экстрактов из надземных и подземных органов *R. carthamoides* (рис. 1). По времени выхода (удерживания) сигнала пики их можно подразделить на 3 зоны: зона пептидов и белковых соединений (левая часть) – 9.5-11.7 мин; зона присутствия экдистероидов (средняя часть) – 11.7-12.3 мин; низкомолекулярных фенольных соединений (правая часть) – 12.7-19.1 мин.

Белки и пептиды. В хроматограммах присутствуют низкомолекулярные белки в диапазоне 6-17 kD – 9.5 мин (17 kD), 10.0 (8.5 kD), 10.3 (5.8 kD); 4 пика пептидов в диапазоне 1-3 kD – 10.7 (3.1 kD), 11.0 (2.0 kD), 11.3 (1.4 kD), 11,7 (0.85 kD). Наличие и относительный уровень концентрации этих соединений четко прослеживаются в экстрактах зимующих органов растений – почках и корневищах (рис. 2). По всей видимости, ткани и органы, подвергнутых экспозиции при аномально высоких или низких температурах, стимулируют синтез стрессовых белков (5.8, 8.5, 17 kD). Короткоцепочные пептиды (M=0.85-1.00) могут выполнять в растениях защитную, сигнальную и гормональную функцию, вызывая системный иммунный ответ на повреждение или проникновение патогенов (антимикробная и антифидантная функция). Для органов, формирующихся в летний период во время фазы бутонизации-цветения, пики этих классов соединений отсутствуют или уровень их минимален.

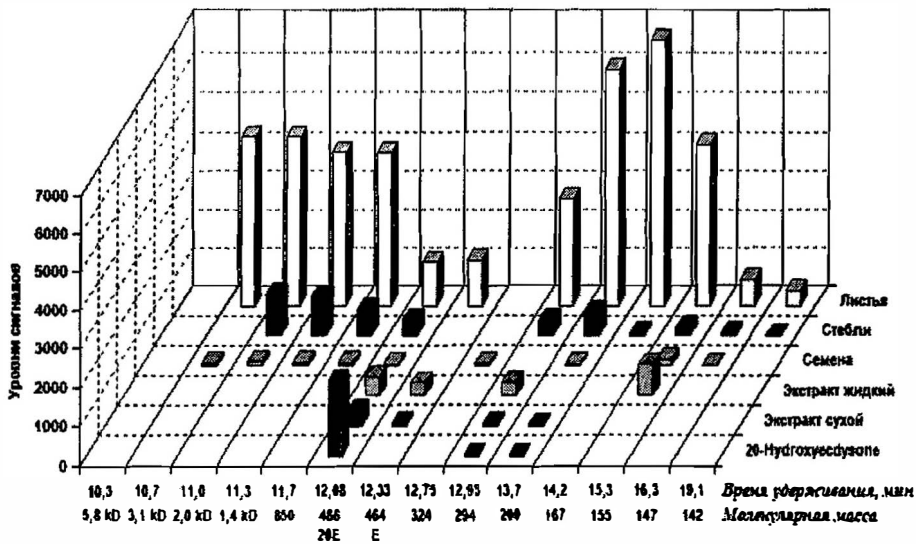

Рис. 1. Хроматографичсский профиль препаратов и экстрактов лсвзси сафлоровидной (*R. carthamoides)*

Экдистероиды. Носителями биологической активности *R. carthamoides* являются экдистероиды, низкомолекулярные гормональные соеди-

нения со структурой C_{27}, C_{28} и C_{29}. В качестве продуктов распада основных экдистероидов могут быть вторичные $C_{19}...C_{24}$ аналоги (Балтаев, 2000). Молекулярные массы $C_{27}...C_{27}$ экдистероидов *R. carthamoides* лежат в области 462 – 540 единиц, из которых являются мажорными, или массовыми, *20-hydroxyecdysone* (M=486, синонимы: 20E или экдистерон) и *ecdysone* (M=464, синонимы: E или экдизон).

При исследовании пиков хроматограмм стандартного образца экдистероида и его характеристик по времени удерживания 12.08 и 12.33 мин (рис. 1), и сопоставленных с другими образцами, они определены как сигналы *20-hydroxyecdysone* и *ecdysone*. Для сухого и жидкого экстракта характерно присутствие сигналов этих двух экдистероидов, и одновременно отсутствие сигналов в области высоко- и низкомолекулярных соединений. Это свидетельствует о происхождении их из экдистероид содержащих растений, а также о прохождении технологических операций по очистке от сопутствующих веществ.

Во всех растительных пробах обнаружено присутствие *20-hydroxyecdysone*, причем, исходя из соотношения высот пиков, относительная его концентрации выше в образцах вегетативных (розеточных) побегов, собранных в более ранние фазы развития (рис. 3). *Ecdysone* содержится в стеблевых листьях генеративных побегов (рис. 1) и практически отсутствует в пробах, представленных тканями почек, молодых корней и розеточных листьев.

Состав мажорных экдистероидов *R. carthamoides*, уровни их содержания в различных органах (рис. 2 – 3) соотносятся с результатами количественного ОФ-ВЭЖХ анализа. Концентрация *20-hydroxyecdysone* в почках составляет 0.3 – 0.4 %, корнях 0.1 – 0.2 %, стеблях 0.1 %; в розеточных листьях она убывает от 0.4 – 0.5 % (фаза отрастания) до 0.25 – 0.35 % (бутонизация) и далее, до 0.2 % (цветение). Состав экдистероидов в начале вегетации представлен *20-hydroxyecdysone* на 98 – 100 % (0 – 2 % E), во время бутонизации – на 94 – 97 % (0 – 5 % E).

Следует указать, что в исходных водных растворах фитоэкдистероиды могут находиться в виде гидратов и тригидратов, образовывать новые диеноновые связи (конверсия хромофорного участка в молекуле), а также закрепляться на белковых структурах, что отражается на смещении времени удерживания сигнала в сторону близлежащей области 11.7 мин (M≈850). Известны и C_{54} экдистероиды – димеры *20-hydroxyecdysone*, *ajugasterone C* (M=960-970), а также экдистероиды, связанные с 3-мя сахарами – *osladin* (M=888).

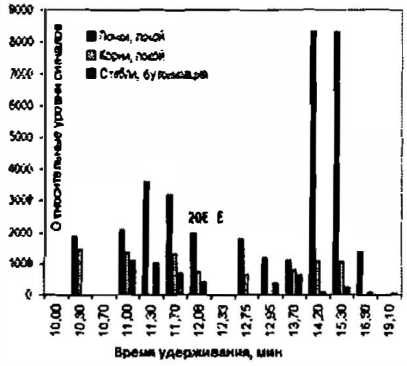

Рис. 2. Хроматограммы экстрактов из зимующих и летнеразвивающихся органов *R. carthamoides*

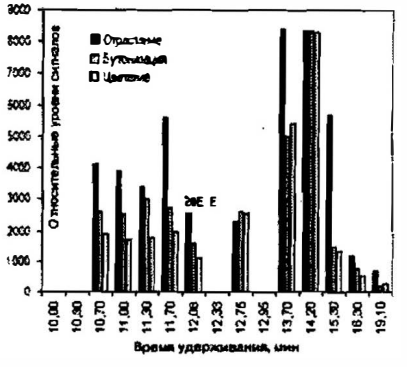

Рис. 3. Хроматограммы экстрактов *R. Carthamoides* из вегетативных побегов по фазам развития

Низкомолекулярные вещества. Присутствие широкого спектра экдистероидных молекул в растениях сопровождается конъюгацией их 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. (Лафон, 1998). Молекулярные массы соединений, которые могут выступать совместно в проявлении биологической активности экдистероидов: ацетонид – 40, ацетат – 42, фосфат – 80, бензоат – 104, сульфат – 106, гликозид – 162, циннамат – 164, пальмитат – 238, линолеат – 262, стеарат – 266, 2-3 гликозид – на 320-480 единиц.

Пирогаллол имел время выхода сигнала из хроматографической колонки 15,3 мин (М=126), гидрохинон – 16,3 мин (М=120), фенол – 17,5 мин (М=94). В нашем случае пики в хроматограммах говорят всего лишь о наличии комплекса низкомолекулярных веществ, и не свидетельствуют в пользу какого-либо из них. Вероятнее всего, подобные вещества (М=300 и менее), являются побочными продуктами биосинтеза лигнина, а также исходным материалом для синтеза таннинов и транспорта экдистероидов.

Исходя из литературных данных, *R. carthamoides* синтезирует значительные количества фенольных и родственных им соединений – 2.0 – 3.9 % флавоноидов, 1.4 – 1.9 % водорастворимых производных фенольных кислот. Содержание полифенольных дубильных веществ (таннинов) достигает 9 – 14 %, а уровень экдистероидов в 10 – 100 тысяч раз превышает содержание их в других растениях. Фенол и бензойная кислота могут связываться не только с экдистероидами, но и с низкомолекулярными пептидами (Чрикишвили и др., 2006).

Литература

1. Biskup, E, Eojkowska, E. Evaluation of Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Lijin Extracts / 54th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 2006, Helsinki, Finland.

2. Lafont, R., Dinan, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update // Journal of Insect Science. – 2003. – Vol. 3. – No 7. – 30 pp.

3. Балтаев, У.А. Фитоэкдистероиды – структура, источники и пути биосинтеза в растениях // Биоорганическая химия. – 2000. – Т. 26. – № 12. – С. 892 – 925.

4. Лафон Р. Фитоэкдистероиды и мировая флора: Разнообразие, распространение, биосинтез и эволюция // Физиология растений, 1998. – № 3. – С. 326-346.

5. Тимофеев, Н.П. Достижения и проблемы в области изучения, использования и прогнозирования биологической активности экдистероидов (Обзор) // Бутлеровские сообщения. – 2006. – Т.8. – № 2. – С. 7 – 34.

6. Федоров, В.Н., Раков, А.А., Смирнов, Н.А. и др. Сравнительная эффективность фармакопейных препаратов адаптогенов / Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье. Симферополь, 1997. – Т. 6-8. – С. 486 – 487.