

УДК 615.45.16.012:582.794

DOI: 10.25684/NBG.scbook.146.2018.31

К ВОПРОСУ ФИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ И ИНТОДУЦЕНТОВ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА, ОБЛАДАЮЩИХ ДИУРЕТИЧЕСКИМ И ЛИТОЛИТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ

Валерий Владимирович Мелик-Гусейнов¹, Станислав Викторович Герасименко¹,
Фатима Кушбиевна Шериева¹, Фархад Маис оглы Меликов²

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт- филиал государственного бюджетного общеобразовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532 Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11
E-mail: pharmval@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» 298648, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, спуск Никитский, д. 52
E-mail: priemnaya-nbs-nnc@yandex.ru

В работе приведены результаты исследований, проведённых с дикорастущими и культивируемыми в условиях Северного Кавказа растениями, обладающими диуретическим и литолитическим действием. В качестве объектов для исследования предложены четыре вида: репейничек аптечный – *Agrimonia eupatoria* L., шиповник собачий – *Rosa canina* L., лапчатка белая – *Potentilla alba* L. и подсолнечник однолетний – *Helianthus annuus* L. По каждому объекту дана фитохимическая характеристика, представлены методы выделения и идентификации биологически активных соединений: фенольных и полифенольных веществ, органических кислот, сахаров и полисахаридов.

Ключевые слова: диуретическое и литолитическое действие; фитохимический анализ; репейничек аптечный; шиповник собачий; лапчатка белая; подсолнечник однолетний

Введение

В течение последних нескольких лет нами проводились фитохимические исследования дикорастущих и культивируемых растений региона с целью создания комплексного растительного препарата диуретического действия [1,2]. В результате исследований было установлено, что ряд растений, произрастающих на Северном Кавказе, оказывают не только диуретическое (репейничек аптечный, лапчатка белая) [7,9,12], но и литолитическое действие (шиповник собачий, подсолнечник однолетний) [5,11].

В этой связи была поставлена задача – определить химический состав мажорных компонентов исследуемых растений, которые отвечают за соответствующую фармакологическую активность. Исследовались такие биологически активнее соединения, как фенольные и полифенольные вещества, сахара, полисахариды и органические кислоты [6,8].

Объекты исследования

Репейничек аптечный – *Agrimonia eupatoria* L., сем. Розоцветные – Rosaceae Juss.

В качестве объекта исследования использованы местные образцы воздушно-сухой травы, собранные в период цветения в июле в Предгорном районе

Ставропольского края и состоящие из цельных облиственных цветущих верхушек и стеблей длиной до 30 см, толщиной до 5 мм с листьями и цветками.

Шиповник собачий – *Rosa canina L.*, сем. Розоцветные – Rosaceae Juss.

Сырьё заготовлено осенью в Усть-Джигутинском районе Карачаево-Черкесской Республики состоит из цельных или расщеплённых вдоль корней длиной от 10 до 20 – 30 см, в диаметре 1-4, реже 5-6 см. Корни цилиндрические или слегка изогнутые, поверхность покрыта морщинистой красновато- или тёмно-бурой пробкой. Излом корней неровный, от жёлтого до красно-бурого цвета. Запах слабый ароматный. Вкус вяжущий, горьковатый.

Лапчатка белая – *Potentilla alba L.*, сем. Розоцветные – Rosaceae Juss.

Объектами фитохимического исследования явились корневища с корнями лапчатки белой, интродуцированной на территории Эколого-ботанической станции «Пятигорск» БИН РАН (Ставропольский край). Сбор подземных органов интродуцированных растений проводили поздней осенью к концу третьего года жизни растения. Корневища темно-коричневого цвета, разветвленные, многоглавые, цилиндрические, изогнутые. Корни цилиндрические. Поверхность неочищенных подземных органов морщинистая, часто со следами отмерших листьев и стеблей. Излом зернистый.

Подсолнечник однолетний *Helianthus annuus L.*, сем. астровые - Asteraceae Dumort.

Объектом исследований явились корни подсолнечника однолетнего сорта СПК, собранные в Предгорном районе Ставропольского края в фазу созревания семян (после сбора урожая семян).

Подземные органы растения представлены мощным горизонтальным маловетвистым корневищем, покрытым многочисленными мелкими придаточными корнями. Корневища темно-коричневого цвета, иногда изогнутые. Корни многочисленные, тонкие, цилиндрические. Поверхность неочищенных подземных органов слабоморщинистая

Методы исследования

Определение флавоноидов

Для обнаружения флавоноидов готовили этанольное извлечение из предварительно очищенного от липофильных веществ сырья. Для этого 2,0 г измельченного сырья обрабатывали хлороформом в аппарате Сокслетта до обесцвечивания растворителя. Сырьё высушивали до удаления запаха хлороформа, затем трижды экстрагировали 70% этанолом (1:10) в конической колбе на 100 мл с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 минут с момента закипания. Полученный экстракт упаривали до 20 мл и проводили соответствующие качественные реакции на флавоноиды.

Для установления количественного содержания флавоноидов в сырье использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом.

Определение состава полифенольных соединений методом ВЭЖХ

Изучение качественного состава фенольных соединений проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSTON», модель 305, ФРАНЦИЯ; инжектор ручной, модель RHEODYNE 7125 USA с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «Мультихром» для «Windows». В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 4,6x250 мм KROMASILC18, размер частиц 5 микрон. Это оборудование и методики были применены и в дальнейшем для

качественного/количественного определения и других биологически активных соединений.

В качестве подвижной фазы использовали систему: метанол-вода-фосфорная кислота концентрированная в соотношении 400:600:5. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0,8 мл/мин. Продолжительность анализа 60 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора "GILSTON" UV/VIS модель 151, при длине волны 254 нм.

В качестве эталонных образцов использовали растворы сравнения в 70% спирте этиловом: рутина, кверцетин, лютеолин, лютеолин-7-гликозида, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, коричной кислоты, цикориевой кислоты, гиперозида, геспередина, апигенина, феруловой кислоты, изоферуловой, дигидрокверцетина, умбеллиферрона, танина, дикумарина.

Определение дубильных веществ

Предварительный анализ на данную группу биологически активных веществ проводили по следующей методике: около 1 г сырья при нагревании на водяной бане экстрагировали 100 мл воды в течение 20-30 мин, после чего фильтровали и использовали для проведения испытаний.

Количественное содержание дубильных веществ в растительном сырье определяли фармакопейным методом (ГФ XIII).

Идентификация сахаров и органических кислот методом ВЭЖХ

В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 6.5x300 мм ALTECHNOA-1000 OrganicAcids.

В качестве подвижной фазы 0,05М раствор серной кислоты. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Температура колонки 20°C.

Продолжительность анализа 20,38 минут. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора при длине волны 190 нм. Исследование проводили в водном извлечении.

Для сравнения готовили серию растворов сравнения сахаров и органических кислот: по 0,60 г рамнозы, ксилозы, мальтозы, сорбитола, глюкозы, лактозы, арабинозы, сахарозы, фруктозы, галактозы; по 0,025 г – аскорбиновой, лимонной, щавелевой, яблочной (маликовой), янтарной и виннокаменной кислот.

Изучение полисахаридного состава

Для выделения полисахаридных комплексов использовали метод последовательного фракционного выделения полисахаридов [10].

Выделенные комплексы из растительного сырья были разделены на фракции, содержащие водорастворимые полисахариды (ВРПС), пектиновые вещества (ПВ), гемицеллюлозы А и Б (ГЦА и ГЦБ). Для выделения ВРПС использовали корневища с корнями л. белой. 100 г сырья экстрагировали 1,0 л. воды при температуре 20-25°C при постоянном перемешивании в течение 5 часов. Фильтрат полученного извлечения осаждали двойным объемом 96% спирта этилового. Выпавшие осадки после фильтрации и промывания спиртом этиловым сушили до постоянной массы и взвешивали. Оставшийся шрот использовали для получения пектиновых веществ (ПВ). Шрот экстрагировали смесью 0,5% раствора кислоты щавелевой и оксалата аммония (1:1) при 100°C в течение 1 ч. Полученное извлечение фильтровали, ПВ осаждали однократным объемом 96% спирта этилового. После фильтрации и промывания спиртом этиловым осадок сушили до постоянной массы и взвешивали.

Шрот, после выделения ПВ, использовали для идентификации гемицеллюлозы А и Б. Шрот экстрагировали 7,5% раствором натрия гидроксида в течение 15 ч. Полученное извлечение фильтровали, доводили до pH 6-7 кислотой ледяной уксусной. Осадок ГЦА отделяли центрифугированием, сушили до постоянной массы и взвешивали. Над

осадочную жидкость после выделения ГЦА диализовали против воды в течение 18 часов. ГЦБ осаждали двукратным объёмом 96% спирта этилового. Выделившийся осадок ГЦБ отделяли центрифугированием, сушили до постоянной массы и взвешивали.

При установлении моносахаридного состава (ВРПС, ПВ, ГЦА, ГЦБ) полисахаридного комплекса растения проводился их гидролиз 2 н кислотой серной при температуре 100°C 8 ч для ВРПС и двое суток для остальных комплексов полисахаридов.

Индивидуальные моносахариды определяли в гидролизатах методом хроматографии на бумаге FN-4 в системе растворителей н-бутанол- уксусная кислота - вода (4:1:5), с эталонными образцами моносахаридов. Полученную хроматограмму обрабатывали анилинфталатным реактивом, в результате чего, моносахариды проявлялись на ней в виде пятен различной окраски.

Результаты и обсуждение

Agrimonia eupatoria. Из надземной части растения выделена сумма флавоноидов в количестве 1,66±0,04% (в пересчёте на рутин в абсолютно сухое сырьё).

Количественное содержание дубильных веществ в траве репейника составило 7,02±0,27% (в пересчёте на танин, в абсолютно сухом сырьё).

При определении состава полифенольных соединений методом ВЭЖХ в траве репейника аптечного было установлено наличие 12 соединений, в том числе: галловая кислота, ЭКГгаллат, катехин, эпикатехин, хлорогеновая, кофейная, феруловая, изоферуловая кислоты, а также витексин, лютеолин-7-гликозид, гиперозид, рутин.

Методом ВЭЖХ в траве растения были идентифицированы следующие органические кислоты и сахара: щавелевая, лимонная, аскорбиновая, винная, янтарная и фруктоза.

Rosa canina. В корнях шиповника собачьего методом перманганатометрии определили количественное содержание дубильных веществ, сумма которых составила 9,37±0,12% (в пересчёте на танин, в абсолютно сухом сырьё).

При определении состава полифенольных соединений методом ВЭЖХ в корнях шиповника собачьего было установлено наличие 7 соединений, в том числе: галловая кислота, ЭКГгаллат, хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная, коричная кислоты, рутин.

Методом ВЭЖХ в корнях растения были идентифицированы 3 органические кислоты: щавелевая, аскорбиновая и янтарная [8].

Potentilla alba. Спектрофотометрическим методом, основанным на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом установлено, что содержание флавоноидов в пересчете на рутин в корнях и корневищах лапчатки белой составило 0,660±0,002%.

Различными методами определено количественное содержание дубильных веществ в корневищах с корнями лапчатки белой. Содержание дубильных веществ в корневищах с корнями лапчатки белой, определенное перманганатометрически, составило 16,37±0,12%.

Методом ВЭЖХ определен состав фенольных соединений корневищ с корнями лапчатки белой. Установлено, что мажорными фенольными соединениями являются коричная кислота (15,2% от суммы фенольных соединений), ЭКГгаллат (12,7% от суммы фенольных соединений), и феруловая кислота (8,8% от суммы фенольных соединений). При этом кофейная, феруловая кислоты, гесперидин и лютеолин-7-гликозид в сырье лапчатки белой были идентифицированы впервые.

Спектрофотометрическим методом, основанным на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом установлено, что содержание флавоноидов в пересчете на рутин в корнях и корневищах лапчатки белой составило 0,660±0,002%.

В составе органических кислот корневищ с корнями лапчатки белой были идентифицированы и количественно определены щавелевая кислота (79,95 % от суммы

органических кислот) и маликовая (яблочная) кислота (1,18% от суммы органических кислот).

В результате проведённых исследований установлено, что полисахариды лапчатки белой представлены 3 фракциями: водорастворимыми полисахаридами (ВРПС), пектиновыми веществами (ПВ) и гемицеллюлозой Б (ГЦ Б).

Установлено, что углеводный комплекс представлен ПВ, ГЦ Б, общий выход которых составил 9%. Методом бумажной хроматографии установлен их качественный моносахаридный состав. Преобладающими в исследуемом полисахаридном комплексе являются ГЦ Б [9,10].

Helianthus annuus. Перманганатометрически установлено количественное содержание дубильных веществ в извлечении из корней подсолнечника однолетнего, собранных в фазу созревания семян ($0,36 \pm 0,025\%$).

Хроматографически определен состав фенольных соединений корней подсолнечника. Мажорными фенольными соединениями корней подсолнечника, собранных в фазу созревания семян, являются хлорогеновая кислота, галловая кислота и кофейная кислоты.

Методом ВЭЖХ в водном извлечении из корней растения, собранных в фазу созревания семян, идентифицированы лактоза, глюкоза и рамноза и органические кислоты (лимонная, винная, янтарная, маликовая и фумаровая). Мажорной органической кислотой является янтарная кислота.

Методом УФ-спектрофотометрии установлено, что содержание полисахаридов в корнях подсолнечника, собранных в фазу созревания семян, составляет $0,63 \pm 0,02\%$.

Установлено количественное содержание суммы фруктозанов и фруктозидов в пересчете на инулин в корнях подсолнечника, собранных в фазу созревания семян ($0,46 \pm 0,01\%$) [3,4].

Выводы

В результате проведённых исследований из четырёх изученных растений (репейника аптечного, шиповника собачьего, лапчатки белой и подсолнечника однолетнего) выделены и идентифицированы основные биологически активные соединения, определён их качественный и количественный состав. Современными методами анализа было установлено наличие фенольных и полифенольных соединений, органических кислот, углеводов и других веществ.

На основании полученных результатов, анализа состава и количества биологически активных соединений исследуемых растений, их фармакологической активности, разработаны лабораторные технологические регламенты на производство сухих растительных экстрактов, которые в дальнейшем можно использовать для создания лекарственных форм.

Проведённые исследования являются одним из первых и предварительных этапов работы, позволяющей в дальнейшем подойти к созданию высокоэффективных растительных препаратов, обладающих мочегонным и литолитическим действием.

Список литературы

1. Блажнова Г.Н., Бондарева Н.Н., Кулешова С.А., Мелик-Гусейнов В.В., Писков С.И., Реккандт С.А., Ржепаковский И.В., Сизоненко М.Н., Тимченко Л.Д., Хмельщиков Ю.В. Растительные комбинированные препараты на основе криопорошков // Пат. 2 617 434 С2. Рос. Федерация: МПК А61К 36/73 (РФ). – 2015134225/15; заявл.14.08.2015; опубл. 25.04.2017, Бюлл. № 12. – 26 с.

2. Блажнова Г.Н., Бондарева Н.Н., Кулешова С.А., Мелик-Гусейнов В.В., Писков С.И., Реккандт С.А., Ржепаковский И.В., Сизоненко М.Н., Тимченко Л.Д., Хмельщиков

Ю.В. Растительные комбинированные препараты на основе сухих экстрактов // Пат. 2 599 515 С 1. Рос. Федерация: МПК А61К 36/738 (РФ). – 2015134223/15; заявл.14.08.2015; опубл. 10.10.2016, Бюлл. № 28. – 22 с.

3. Герасименко С.В., Мелик-Гусейнов В.В. Динамика накопления органических кислот и сахаров в корнях подсолнечника однолетнего // Научные проблемы современного мира и их решения: // Сб. науч. тр. по материалам Междунар. науч.-практ. конф. 08 октября 2013г.- Липецк, 2013, С.17-19.

4. Мелик-Гусейнов В.В., Герасименко С.В. Идентификация фенольных соединений в подземных органах подсолнечника однолетнего (*Asteraceae*) // Вестник МГОУ. № 3. Серия «Естественные науки», 2013. С.34-36.

5. Мелик-Гусейнов В.В., Герасименко С.В., Тимченко Л.Д., Писков С.И. Изучение литолитической и диуретической активности экстрактов корня подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - №4. – URL: <http://www.science-education.ru/118-14299> (дата обращения 16.08.2014).

6. Мелик-Гусейнов В.В., Добриева З.У. Шиповники Ингушетии: ботанико-фармакогностический обзор. LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. – 2011. – 137с.

7. Мелик-Гусейнов В.В., Добриева З.У., Реккандт С.А. Способ получения средства из репейника аптечного, обладающего диуретическим, противомикробным, антиоксидантным действием // Пат. 2432958 Рос. Федерация: МПК А61К 36/73 (РФ). – 2010121395/15; заявл.26.05.2010; опубл. 10.11.2011, Бюлл. № 31. – 6 с.

8. Мелик-Гусейнов В.В., Реккандт С.А. Разработка комплексного растительного препарата «Агрирозин». LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. – 2017. – 125 с.

9. Мелик-Гусейнов В.В., Шериева Ф.К. Лапчатка белая – новый интродуцент Северного Кавказа. Некоторые данные по биологии и химии активных веществ. PALMARIUM Academic Publishing GmbH & Co. KG. – 2016. – 137 с.

10. Мелик-Гусейнов В.В., Шериева Ф.К., Лизай Л.В. Полисахаридный комплекс лапчатки белой, интродуцированной на Северном Кавказе // Вестник Московского гос. обл. ун-та (МГОУ). Серия: Естественные науки. – 2016. - № 3. - С. 42-45.

11. Писков С.И., Тимченко Л.Д., Мелик-Гусейнов В.В., Ржепаковский И.В. Обработка и контроль воспроизведения «этиленгликолевой модели» нефролитиаза у белых крыс // Инновационные подходы в ветеринарной и зоотехнической науке и практике: материалы междунар. науч.- практич. интернет-конф. 1-5 февраля 2016г. – Ставрополь, 2016. – С. 68-73.

12. Реккандт С.А., Мелик-Гусейнов В.В., Кулешова С.А., Шериева Ф.К. Исследование диуретического действия криопорошков корня шиповника и травы репейника // Вестник Московского гос. обл. ун-та (МГОУ). Серия: Естественные науки. – 2016. - № 2. - С.71-75.

Melik-Guseinov V.V., Gerasimenko S.V., Sherieva F.K., Melikov F.M. On the issue of phytochemical research of some wild and introduced plants having diuretic and litholytic action in the North Caucasus // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2018. – Vol. 146. – P. 195 – 200.

The present work reports the results of research on wild and cultivated plants having diuretic and litholytic action in the conditions of growing in the North Caucasus. The objects of research were taken to be the following four species: *Agrimonia eupatoria* L., *Rosa canina* L., *Potentilla alba* L. and *Helianthus annuus* L. Each object is given phytochemical characteristics in the paper which presents the techniques for extraction and identification of the bioactive compounds: phenol and polyphenol substances, organic acids, sugars and polysaccharides.

Key words: diuretic and litholytic action; phytochemical analysis; *Agrimonia eupatoria*; *Rosa canina*; *Potentilla alba*; *Helianthus annuus*