

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ТРАВЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ НА СОСТАВ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ

Денисенко Ю.О., Андреева И.Н., Денисенко О.Н., Федорова Е.П., Челова Л.В.

ГБОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия», г. Пятигорск (357500, ул. Кучуры, 1), don1945@yandex.ru

Настоящая работа посвящена сравнительному химическому анализу биологически активных веществ эхинацеи пурпурной, содержащихся в спирто-водных извлечениях, полученных из травы высушенной и травы свежей. Установлено, что извлечение из свежей травы преимущественно содержит феруловую кислоту, а из сухой травы – хлорогеновую и кофейную кислоты. Это свидетельствует о происходящих в процессе сушки растительного сырья биотехнологических процессах с накоплением вторичных метаболитов.

Изучение качественного и количественного состава гидроксикоричных кислот травы эхинацеи пурпурной проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Условия проведения анализа: хроматограф Waters Alliance 2695 с ДМД 2996.

В извлечении из свежего сырья преобладает феруловая кислота, а в извлечении из сухого сырья в большей степени накапливаются хлорогеновая и кофейная кислоты.

Ключевые слова: эхинацея, гидроксикоричная кислота.

INFLUENCE OF THE WAY OF RECEPTION EXTRACTION OF PREPARATIONS FROM GRASS ECHINACEA PURPLE ON STRUCTURE HYDROXYCINNAMIC ACIDS

Denisenko J.O., Andreeva I.N., Denisenko O.N., Fedorova E.P., Chelova L.V.

Pyatigorsk state pharmaceutical academy, Pyatigorsk, (357500, st. Kuchura, 1), don1945@yandex.ru

The present paper is devoted to a comparative chemical analysis of biologically active compounds of Echinacea purpurea contained in the alcohol-water extracts obtained from dried herbs and fresh herbs. It is established that the extraction of fresh grass contains mainly ferulic acid, and from the dry grass - chlorogenic and caffeic acids. This indicates a place in the process of drying plant material of biotechnology processes, with accumulation of secondary metabolites.

The study of qualitative and quantitative composition of hydroxycinnamic acid herb Echinacea purpurea was performed by high performance liquid chromatography. Conditions of analysis: - Waters Alliance 2695 chromatograph with a DMD in 2996.

In the extraction of fresh material predominates ferulic acid, and extracted from dry raw materials to a greater extent accumulate chlorogenic acid and caffeic.

Key words: echinacea, hydroxycinnamic acids.

Введение

В настоящее время отмечается широкое распространение вторичных иммунодефицитов, связанных с урбанизацией, химизацией повышенной стрессовой нагрузки. Такие состояния нуждаются в иммунокоррекции, в этой связи актуальной проблемой является поиск новых и использование уже известных лекарственных растений, обладающих иммуномодулирующим действием. Известно, что растительное сырье по-разному влияет на иммунную систему, некоторые из лекарственных растений, обладающих иммуностимулирующим действием, оказывают стимулирующее влияние на иммунный статус, но большинство характеризуются как модуляторы. При этом

лекарственные растения и препараты из них нельзя рассматривать как простое органическое вещество. По мере того как фармакологические исследования выявляют новые возможности растений, возрастает необходимость изучения биологически активных соединений и механизма их действия на организм животных и человека [1].

Применение эхинацеи пурпурной, обладающей иммуностимулирующим действием, для лечения больных, страдающих хроническими рецидивирующими заболеваниями на фоне вторичных иммунодефицитов, является весьма перспективным. Эффект лекарственного растения, приводящий к неспецифической стимуляции иммунной системы, может быть использован параллельно с лекарственной терапией, а возможно, и как альтернатива стандартной химиотерапии инфекций [2; 3].

На мировом фармацевтическом рынке представлено множество различных препаратов, содержащих водный и спиртовой экстракт эхинацеи, свежесобранный и концентрированный соки, настойка и т.д., как монопрепарат или в комбинации [4; 5].

Биологическая активность готовых препаратов эхинацеи зависит от технологических факторов и качества исходного сырья. Известно, что препараты из свежих растений по активности превышают экстракционные препараты из высушенных растений.

Целью представленного фрагмента было изучение состава фенольных соединений в водно-спиртовых извлечениях травы эхинацеи пурпурной в зависимости от камеральной обработки растительного сырья.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали надземную часть растения эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*), собранную в фазу цветения в Ботаническом саду Пятигорской ГФА. Собранное сырье подвергали камеральной обработке. Свежее сырье измельчали на измельчителях тканей до кашицеобразного состояния. Часть сырья доводили до сухого состояния высушиванием на воздухе и измельчали до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями 3 мм на траворезках лабораторного типа. Экстракционные препараты из подготовленных образцов сырья готовили с использованием стандартных методов экстракции.

Из свежесобранного сырья готовили настойку методом ремацации водно-спиртовыми растворами в соотношении 1 : 10 на трех ступенях экстракции. Первую ступень экстракции проводили 90%-ным спиртоводным раствором в соотношении 1 : 3, две последующие экстракции проводили 40%-ным спиртоводным раствором в соотношении 1 : 3 и 1 : 4. Длительность настаивания на каждой ступени экстракции – 12

часов. Все извлечения объединяли, выдерживали на холоде (15 °С) три дня и фильтровали. Из сухо-воздушного сырья травы эхинацеи готовили спиртоводный экстракт на 40%-ном спиртоводном растворе методом реперкаляции в соотношении 1 : 1 с незаконченным циклом на трех ступенях, длительность настаивания извлечения на каждой ступени – 24 часа. Извлечения объединяли, выдерживали на холоде (15 °С) три дня и фильтровали.

Анализ спиртовых извлечений проводили по методике количественного определения гидроксикоричных кислот в препарате Иммунал по НД 42-4501-07 «Иммунал». Изучение качественного и количественного состава гидроксикоричных кислот травы эхинацеи пурпурной проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [6].

Условия проведения анализа: хроматограф Waters Alliance 2695 с ДМД 2996; колонка Zorbax SB-C18 150 * 4,6 + 12,5 * 4,6 mm 3.5 mkm; ПФ В: Вода : Ацетонитрил : фосфорная кислота (900 : 100 : 4); ПФ D: Вода : Ацетонитрил : фосфорная кислота (150 : 850 : 4); расход ПФ 1 мл/мин; объем пробы 20 мкл; температура колонки – 30 °С; длина волны детектирования – 320 нм; растворитель (метанол : вода 1 : 1); градиент:

	Time	Flow	% В	% D	Curve
1	0,01	1,00	100,0	0,0	6
2	17,00	1,00	100,0	0,0	6
3	37,00	1,00	85,0	15,0	6
4	40,00	1,00	30,0	70,0	6
5	42,00	1,00	30,0	70,0	6
6	43,00	1,00	100,0	0,0	6
7	58,00	1,00	100,0	0,0	6

Приготовление растворов

Стандартный раствор

Раствор А. Точную навеску стандартного образца кофейной кислоты растворяли во флаконе (предварительно взвешенном) в метаноле и количественно переносили в мерную колбу на 100 мл (после чего флакон высушивали и взвешивали – масса навески), перемешивали, доводили объем раствора в колбе до метки метанолом и помещали на ультразвуковую (УЗ) баню на 5 мин.

Исходя из точной массы навески кофейной кислоты (18,5 мг), 0,5 мл полученного раствора Б помещали в мерную колбу на 100 мл, доводили объем раствора до метки

растворителем (метанол : вода 1 : 1), перемешивали, фильтровали через 0,45 мкм ($C_{\text{кофейной кислоты}} = 0,000925$ мг/мл).

Стандарт кофейной кислоты Fluka lot1228735, содержание 99,6%.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы

Раствор Б. Точную навеску стандартного образца хлорогеновой кислоты (содержание мин. 95%) помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли метанол, растворяли на УЗ-бане 5 мин., доводили до метки метанолом. Масса навески = 11,6 мг.

Раствор В. Точную навеску стандартного образца феруловой кислоты помещали в мерную колбу на 50 мл, добавляли метанол, растворяли на УЗ-бане 5 мин., доводили до метки метанолом. Масса навески = 4,3 мг.

Приготовление раствора. В мерную колбу на 100 мл помещали 0,5 мл раствора А, 1,0 мл раствора Б и 1,0 мл раствора В, доводили объем раствора до метки растворителем, фильтровали через 0,45 мкм ($C_{\text{кофейной кислоты}} = 0,000925$ мг/мл, $C_{\text{феруловой кислоты}} = 0,00086$ мг/мл, $C_{\text{хлорогеновой кислоты}} = 0,00116$ мг/мл).

Для уточнения времени удерживания хлорогеновой кислоты был приготовлен раствор: в мерную колбу на 100 мл помещали 1,0 мл раствора Б, доводили до метки растворителем, фильтровали через 0,45 мкм ($C_{\text{хлорогеновой кислоты}} = 0,00116$ мг/мл).

Испытуемый раствор: 2,0 мл предварительно перемешанного экстракционного препарата помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора до метки растворителем, перемешивали, фильтровали через 0,45 мкм.

Иммунологические исследования проводили на мышах обоего пола линии СВА, весом 18–20 граммов, в количестве 40 особей. Исследуемое вещество вводили однократно в количестве 5 мл/кг массы животного в желудок за двое суток до иммунизации. Мышей иммунизировали внутрибрюшно эритроцитами барана (ЭБ) 2×10^9 кл/мл, забивали на пятые сутки после иммунизации и проводили исследования [7].

Влияние экстракционных препаратов на клеточный иммунитет оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана. Животным за сутки до забоя проводили сенсibilизацию и вводили им разрешающую дозу антигена. Контролем служили интактные мыши, которым эритроциты барана вводили в соответствующие сроки для опытных групп.

Результаты исследования

Анализ спиртовых извлечений травы эхинацеи, полученных из сырья с различной камеральной обработкой, позволил выявить существенное различие в составе мажорных биологически активных веществ – гидроксикоричных кислот. Сравнение пиков на

хроматограммах ВЭЖХ показало, что в извлечениях травы эхинацеи, полученных различными способами, присутствует один набор следующих гидроксикоричных кислот: хлорогеновая (8,963), кофейная (10,731), цикориевая (11,454, по данным литературы), неидентифицированная (12,546), феруловая (27,472), кумаровая (28,439). Однако количественное соотношение этих кислот в сумме гидроксикоричных кислот в двух извлечениях различается (рис. 1, 2).

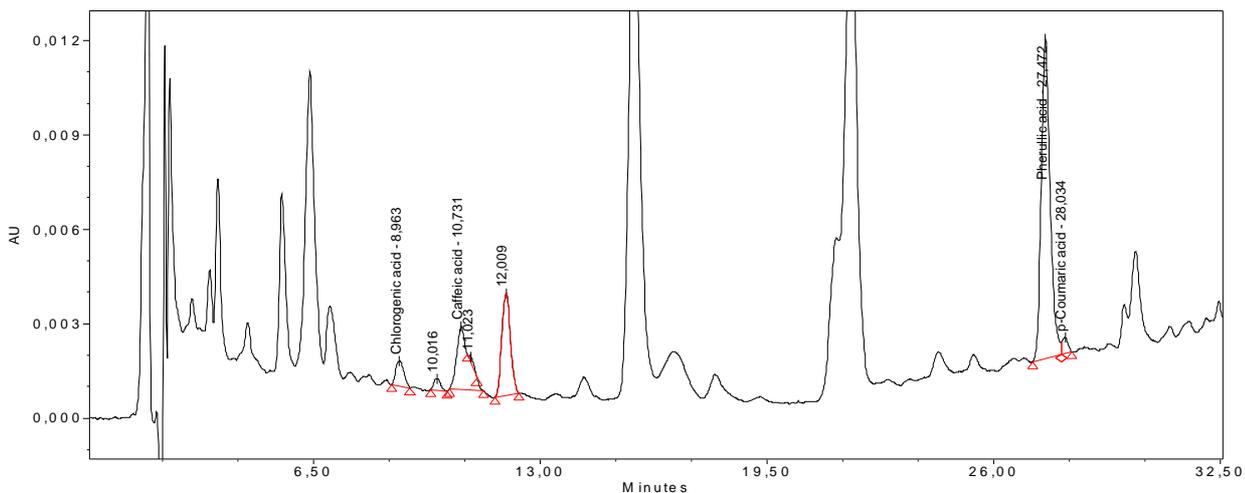


Рисунок 1. Хроматограмма (ВЭЖХ) экстракционного препарата из свежей травы эхинацеи пурпурной.

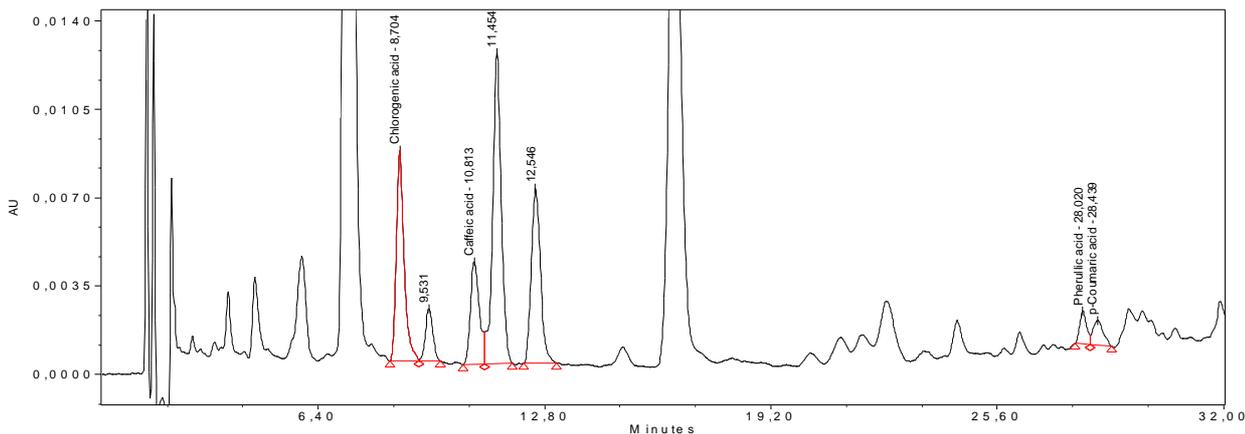


Рисунок 2. Хроматограмма (ВЭЖХ) экстракционного препарата из высушенной травы эхинацеи пурпурной.

Количественное соотношение гидроксикоричных кислот в экстракционных препаратах травы эхинацеи приведено в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты количественного соотношения гидроксикоричных кислот в извлечениях травы эхинацеи

Образцы экстракционных препаратов эхинацеи	Содержание гидроксикоричных кислот в их сумме (X, %)				
	Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	Цикориевая кислота	Феруловая кислота	Кумаровая кислота
Экстракт свежей травы	3,6	4,0	3,8	84,1	4,5
Экстракт сухой травы	32,0	13,3	45,3	5,4	4,0

Как следует из данных таблицы 1, в извлечении из свежего сырья преобладает феруловая кислота, содержание которой достигает 84%, а в извлечении из сухого сырья в большей степени накапливаются цикориевая и хлорогеновая, которые, по-видимому, образуются в растении как вторичные метаболиты в процессе высушивания. Остальные оксикоричные кислоты присутствуют в следовых количествах.

Известно, что гидроксикоричные кислоты обладают выраженной антиоксидантной и иммуностимулирующей активностью. Фармакологическая активность травы эхинацеи пурпурной объясняется суммарным действием всего набора присутствующих в растении гидроксикоричных кислот. Однако интенсивность иммуномодулирующего действия может различаться у препаратов эхинацеи в зависимости от преобладания той или иной оксикоричной кислоты.

Данное предположение нами было подтверждено в эксперименте по изучению влияния полученных спиртовых извлечений эхинацеи на формирование первичного иммунного ответа по клеточному типу в организме животного. Как установлено при изучении первичного ответа по клеточному типу, экстракт эхинацеи из сухой травы снижал индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на 31,8% ($17,18 \pm 1,26$) по сравнению с контролем ($25,28 \pm 1,37$), в то время как препарат из свежего растительного сырья снижал индекс реакции ГЗТ на 47,9% ($13,17 \pm 1,19^*$), проявляя иммунодепрессивный эффект более выражено, нежели экстракт из сухой травы.

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что способ обработки травы эхинацеи пурпурной в процессе получения экстракционных препаратов влияет на количественное соотношение извлекаемых гидроксикоричных кислот: хлорогеновой, кофейной, цикориевой, феруловой, кумаровой. Установлено, что феруловая кислота преимущественно извлекается в случае использования свежей травы, а цикоревая и хлорогеновая кислоты – при экстракции сухого сырья эхинацеи, что отразилось на иммунодепрессивной активности при изучении первичного иммунного ответа по клеточному типу, которая была более выражена у препарата свежесобранного сырья.

Список литературы

1. Иммуномодуляторы растительного происхождения (обзор) / Бакуридзе А.Д., Курцикидзе М.Ш., Писарев В.М. и др. // Хим.-фармац. журн. – 1993. – Т. 27. – № 8. – С. 43–47.
2. Фитохимический состав представителей рода эхинацеи (*Echinacea Moench*) и его фармакологические свойства (обзор) / В.Н. Самородов [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 1996. – Т. 30. – № 4. – С. 32–37.
3. ВФС 42-2371-94. Трава эхинацеи пурпурной. – 8 с.
4. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* (L.) Moench / В.А. Куркин [и др.] // Растит. ресурсы. – 1998. – Т. 34. – Вып. 2. – С. 81–85.
5. Разработка способов анализа суппозиторий, содержащих экстракт эхинацеи / А.С. Саушкина, В.А. Карпенко, Е.П. Федорова, О.Н. Денисенко // Регион. конф. по фармации и фармакологии (59; 2004; Пятигорск) : материалы. – Пятигорск : Пятигорская ГФА, 2004. – С. 213–214.
6. НД 42-4501-07 «Иммунал» – 6 с.
7. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. [и др.] – М. : Медицина, 1987. – 386 с.

Рецензенты:

Сбежнева В.Г., д.фарм.н., доцент кафедры, факультет последипломного образования, кафедра фармации, ГБОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пятигорск.

Коновалов Д.А., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии, ГБОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пятигорск.