

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

Озими́на И. И., Фролова О. О.

Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: oxifarm@mail.ru

Выявление биогенетической связи между отдельными классами биологически активных веществ в растениях способствует целенаправленному поиску лекарственного растительного сырья с прогнозируемым фармакологическим действием. На примере широко распространенных в природе и издавна используемых лекарственных растений (цветки ромашки аптечной и трава душицы обыкновенной) объясняется закономерность обнаружения таких важных групп биологически активных веществ, как аминокислоты, фенолокси́лоты, кумарины, флавоноиды, органические кислоты. Выявлены их биогенетические связи и описаны терапевтические эффекты. Полученные данные позволят в дальнейшем предсказать новые химические соединения в известных лекарственных растениях и расширить представления об их фармакологических свойствах. Изучение биогенетических взаимоотношений химических компонентов растений будет способствовать экономичному научному подходу к созданию новых эффективных отечественных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: аминокислоты, биогенез, метаболиты, биологически активные вещества, ромашка аптечная, душица обыкновенная.

PURPOSEFUL SEARCH OF THE BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES IN PLANTS

Ozimina I. I., Frolova O. O.

Pyatigorsk branch of the State Budgetary Educational Establishment of Higher Professional Education "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Public Health Services of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, Kalinin avenue, 11), e-mail: oxifarm@mail.ru

A revelation of biogenetic ties between individual classes of biological active substances in plants assists to purposeful search of medicinal raw material with prognostic pharmacological activity. On example of widespread in nature and long since used medicinal plants (*Matricaria recutita* flowers and *Origanum vulgare* herb) it has been explained the regularity of discovery such important groups of biological active substances as aminoacids, phenolic acids, kumarins, flavonoids, organic acids. The study of biogenetic reciprocity of plants chemical components will be assisted for the economical scientific approach to creation of new effective native medicinal preparations. There were revealed biogenetic relations and there were described therapeutic effects. The obtained data permit to predict new chemical compounds in famous medicinal plants further and to expand representations about their pharmacological properties. white willow bark.

Keywords: aminoacids, biogenesis, metabolits, biological active substances, *Matricaria recutita* (camomile), *Origanum vulgare*.

Введение

Создание эффективных отечественных лекарственных средств – одна из первоочередных задач российского здравоохранения. Препараты природного происхождения имеют преимущественное применение в профилактике и поддерживающей терапии целого ряда заболеваний, смертность от которых в настоящее время весьма значительна. Поиск растений, содержащих биологически активные вещества (БАВ), для производства таких препаратов может быть реально облегчен, если применять научные подходы. В связи с этим перспективным является направление по выявлению закономерностей содержания в растительном сырье фармакологически важных составляющих.

Близость биогенетических путей различных классов биологически активных соединений предполагает, что изучение промежуточных метаболитов, в том числе аминокислот, может способствовать направленному и более углубленному фитохимическому анализу лекарственного растительного сырья.

Цель исследования – определение роли аминокислот в биогенезе БАВ на примере таких известных лекарственных растений, как ромашка аптечная и душица обыкновенная.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны ромашка аптечная – *Matricaria recutita* (L.) Rauschert, сем. Asteraceae и душица обыкновенная – *Origanum vulgare* L., сем. Lamiaceae.

Для получения извлечений с высоким содержанием действующих веществ необходимо было выбрать качественное растительное сырьё. Оптимальным, на наш взгляд, явилось использование сырья промышленной заготовки, поскольку оно стандартизировано и доступно. На основании предварительного анализа из 7 промышленных образцов сырья различных производителей были отобраны для дальнейшего изучения соцветия *M. recutita* серии 010605 ЗАО «СТ-Медифарм» (г. Москва) и трава *O. vulgare* серии 010505 ООО «Иванчай» (г. Москва).

Одним из основных направлений исследования явилось изучение состава аминокислот – веществ первичного метаболизма, необходимых для протекания важных биохимических процессов в живом организме. Для анализа аминокислот получали водные извлечения по следующей методике: 12 г сырья заливали 500 мл воды дистиллированной и нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане. Полученное извлечение фильтровали через ватно-марлевый тампон и упаривали под вакуумом до 1/5 от исходного объема. Качественное обнаружение аминокислот проводили в полученных извлечениях с помощью нингидриновой реакции (наблюдали сине-фиолетовое окрашивание) и хроматографически. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Silufol» с использованием подвижной фазы бутанол: кислота уксусная ледяная: вода (8:2:2). Хроматограммы высушивали на воздухе, обрабатывали 0,1 % спиртовым раствором нингидрина и сушили при температуре 60 °С в сушильном шкафу. Аминокислоты обнаруживались в виде цветных пятен, которые сравнивались по окраске и величине R_f с пятнами образцов достоверных свидетелей. Количественное определение аминокислот проводили с помощью аминокислотного анализатора АА-33 (Microtecha, Чехия) после кислотного гидролиза белков, входящих в состав исследуемого лекарственного растительного сырья. Методика приготовления извлечения заключалась в следующем: навеску воздушно-сухого сырья (0,2 г) помещали в колбу объемом 20 мл, добавляли 6 капель

96 % этанола, 10 мл кислоты хлористоводородной 6 М, закрывали пробкой и подвергали гидролизу в автоклаве в течение 3 часов при температуре 137 °С под давлением 2 атм. Полученный гидролизат выпаривали на водяной бане, охлаждали, добавляли 10 мл буферного раствора (рН 2,2), через 10 минут фильтровали. Далее проводился анализ гидролизата. Идентификация аминокислот осуществлялась по временам удержания методом тестеров, а количественный расчет содержания аминокислот – по площадям пиков методом внутреннего стандарта.

Исследуемые образцы также были исследованы по известным методикам на наличие следующих групп БАВ:

- флавоноиды (качественные реакции; ТСХ в системах растворителей бутанол : уксусная кислота: вода (4:1:5), бензол : уксусная кислота (9:2), хлороформ: уксусная кислота (9:1), хроматограммы просматривали в УФ-свете, а также при обработке парами аммиака);
- кумарины и фенолоксилоны (качественные реакции; ТСХ в системах растворителей бутанол : уксусная кислота: вода (4:1:5), н-гексан : бензол : спирт этиловый 96 % (5:4:1), хлороформ : этилацетат : муравьиная кислота (2:1:1), проявитель – 10 % спиртовый раствор гидроксида натрия и диазореактив Паули по Кутачеку);
- органические кислоты (ТСХ в системе растворителей н-пропанол: 2М NH₃ (7:3), проявитель – 0,04 % раствор бромкрезолового зеленого).

Хроматографические исследования проводили в присутствии стандартных образцов свидетелей, используя хромогенные реактивы.

Наличие соединений из вышеперечисленных групп подтверждали также методом ВЭЖХ. Хроматографический анализ извлечений из растительного сырья проводили в режиме градиентного элюирования при линейном изменении концентрации ацетонитрила в 0,1 % водном растворе трихлоруксусной кислоты от 10 до 40 % в течение 25 мин, а затем в течение 5 минут до 100 %. Скорость подачи элюента составляла 100 мкл/мин. Детектирование проводили при длинах волн 260, 280, 300, 360 нм.

- жирорастворимые витамины (анализ проводился методом обращено-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования; в качестве элюента использовали систему метанол: хлороформ (98:2); детектирование анализируемых соединений осуществляли при длинах волн 290 и 325нм).

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования методом ТСХ были идентифицированы 7 аминокислот в водном извлечении из соцветий *M. recutita* (гистидин, глицин, серин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин, тирозин) и 5 аминокислот в водном извлечении из травы *O. vulgare* (орнитин, пролин, глицин, аспарагиновая кислота, тирозин). В отличие от данных

литературы в соцветиях *M. recutita* мы установили наличие тирозина и глутаминовой кислоты, но не обнаружили триптофан и аланин [4]. В траве *O. vulgare* помимо аминокислот, известных из литературных источников, были идентифицированы глицин, аспарагиновая кислота, орнитин, и не обнаружены цистеин, серин, валин [3].

Проблема в установлении истинного аминокислотного состава методом ТСХ заключается в том, что некоторые аминокислоты имеют близкие или совпадающие значения R_f . Кроме того, возможно совпадение значений R_f свободных аминокислот и коротких пептидов, содержащихся в извлечениях. Более объективную оценку состава содержащихся в растениях аминокислот дало исследование всего их комплекса с помощью аминокислотного анализатора. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотный состав соцветий *M. recutita* и *O. vulgare* (в воздушно-сухом состоянии)

Аминокислоты	Содержание, %	
	Соцветия <i>M. recutita</i>	Трава <i>O. vulgare</i>
1. Глутаминовая кислота	0,82	1,09
2. Аланин	0,57	0,72
3. Лейцин	0,53	0,73
4. Фенилаланин	0,51	0,62
5. Лизин	0,50	0,38
6. Глицин	0,42	0,65
7. Аспарагиновая кислота	0,41	0,61
8. Серин	0,36	0,44
9. Тирозин	0,34	0,46
10. Треонин	0,31	0,38
11. Валин	0,28	0,35
12. Аргинин	0,26	2,00
13. Изолейцин	0,17	0,21
14. Гистидин	0,14	0,28
15. Метионин	0,03	0,03
Всего:	5,65	8,95

Было установлено, что общее содержание аминокислот в соцветиях *M. recutita* составляет 5,65 %, а в траве *O. vulgare* – 8,95 %. При этом в изученных растениях обнаружили 15 протеиногенных аминокислот, в том числе 7 из 8 незаменимых и 2 частично заменимых (аргинин и гистидин). Преобладающими в соцветиях *M. recutita* оказались глутаминовая кислота, аланин, лейцин, фенилаланин и лизин, а в траве *O. vulgare* – аргинин, глутаминовая кислота, лейцин, аланин, глицин, фенилаланин и аспарагиновая кислота. Интересным, на наш взгляд, является то, что содержание фенилаланина в этих растениях выше, чем в таком высокобелковом продукте, как казеин молока, и широко применяемом источнике аминокислот – цветочной пыльце, а содержание лейцина такое же, как в

цветочной пыльце. Полученные нами результаты подтвердили, что наиболее распространенными у высших растений являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, а также лейцин, участвующие в белковом обмене.

Было отмечено высокое содержание аргинина в траве душицы обыкновенной (2,00 %). Данная аминокислота участвует в орнитинном цикле и поэтому закономерно обнаружение в водном извлечении душицы обыкновенной самого орнитина. Наличие тирозина в водных извлечениях из исследованных нами образцов объясняется, по нашему мнению, высоким содержанием предшественника его биосинтеза в растениях – фенилаланина (0,51 % в соцветиях *M. recutita*, 0,62 % в траве *O. vulgare*).

Сравнение результатов качественного анализа и данных, полученных с использованием аминокислотного анализатора, позволило предположить, что большая часть аминокислот в изученных растениях находится в связанном виде в составе белков, пептидов и других химических соединений. Уже само исследование аминокислотного состава ромашки и душицы представляет практический интерес, поскольку увеличивает число источников получения аминокислотсодержащих комплексов. Как известно, сами аминокислоты и их комплексные препараты обладают широким спектром фармакотерапевтической активности (гипотензивное, иммуномодулирующее, цитокинетическое, гепатопротекторное, противовоспалительное, детоксицирующее действие и др.). Выявлена эффективность применения аргинина, серусодержащих аминокислот, а также концентратов заменимых и незаменимых аминокислот при лечении онкозаболеваний [5]. Кроме того, аргинин действует как предшественник оксида азота, который высвобождается из клеток внутренних стенок сосудов и способствует расширению сосудов, предотвращая тем самым образование и развитие атеросклеротических бляшек. Одновременно аминокислоты являются основными веществами в биосинтезе других биологически активных соединений.

Ароматические аминокислоты – вещества первичного метаболизма – являются предшественниками таких вторичных метаболитов, как фенолоксилоты, а последние, в свою очередь, являются звеном цепочки:



(гидроксикоричные кислоты)

Исходя из этого вполне логична идентификация в объектах исследования кислоты феруловой, ведь содержание в ромашке и душице фенилаланина и тирозина, из которых она образуется, весьма велико. Стоит отметить, что в доступных нам литературных источниках не обнаружено сведений о присутствии в траве *O. vulgare* кислоты феруловой.

Предшественниками кислоты феруловой в растениях также являются п-кумаровая и кофейная кислоты, которые, в соответствии с данными литературы, были идентифицированы в соцветиях *M. recutita* [7]. Часто фенолокислоты находятся в растениях в виде сложных эфиров. Выявленная нами в соцветиях *M. recutita* хлорогеновая кислота подтвердила этот факт. Обнаружение в траве душицы кислоты феруловой открывает новые возможности в использовании широко известного лекарственного растения, поскольку установлено, что эта кислота эффективна при цитотоксических повреждениях, оказывает церебро- и кардиопротекторное действие [6].

Фенолокислоты, как было отмечено выше, биогенетически связаны с кумаринами. Наличие последних в изученных растениях подтверждено нами качественными реакциями и согласуется с опубликованными ранее сведениями [8]. Известно, что кумарины проявляют разностороннюю биологическую активность: противовоспалительную, антикоагулянтную, противоопухолевую, антиаллергическую и др. [1].

Коричные кислоты участвуют в синтезе и такой важной группы БАВ как флавоноиды. В траве *O. vulgare* нами идентифицированы апигенин, лютеолин и лютеолин-7-глюкозид, а в соцветиях *M. recutita* – рутин, лютеолин и апигенин. Эти результаты соответствуют данным литературы [8]. Флавоноиды – класс соединений, давно зарекомендовавший себя многосторонней биологической активностью. Они применяются при терапии сердечно-сосудистых заболеваний благодаря антиоксидантному и эндотелиопротекторному действию, а также как дополнительные средства при лечении онкологических, воспалительных и многих других заболеваний [10].

Один из путей биосинтеза флавоноидов – шикиматный – объясняет образование таких соединений, как аминокислоты (фенилаланин и тирозин) и токоферолы. Последний факт послужил причиной поиска витамина Е в изучаемом растительном сырье и подтвердился высоким его содержанием в траве *O. vulgare* (22,4 мг/г), которое было установлено нами впервые. Витамин Е (группа токоферолов) обладает выраженными антиоксидантными свойствами, поэтому широко применяется в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, для уменьшения побочных реакций при лечении химиотерапевтическими препаратами и при ряде других патологий [5].

Ключевыми соединениями в синтезе основных протеиногенных аминокислот являются окси- и оксо-кислоты. Поэтому мы исследовали растения на содержание кислот, участвующих в цикле Кребса – одном из главных путей биосинтеза. В результате эксперимента в обоих растениях была обнаружена лимонная кислота, а в соцветиях *M. recutita*, кроме того, яблочная и янтарная кислоты. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее сведениями [7]. Известно о многогранной биологической

активности янтарной кислоты, которая перспективна при острой и хронической ишемической болезни сердца, в нейрореаниматологии, при поражениях печени различной этиологии, для повышения устойчивости организма человека к неэлектролитному действию алкоголя, к ионизирующим излучениям и ядам, а также как антистрессорное средство [2]. Яблочная кислота, в свою очередь, участвует в биосинтезе углеводов. В этой связи обоснованным является присутствие в изучаемых объектах аскорбиновой кислоты – одного из производных альдогексоз и общепризнанного биологически активного вещества, участвующего в регулировании окислительно-восстановительных процессов, углеводного обмена, свертываемости крови, регенерации тканей. Кроме того, она нормализует проницаемость капилляров и положительно влияет на липидный обмен при атеросклерозе [5].

Из вышеизложенного следует, что ромашка аптечная наряду с известными фармакологическими эффектами (противовоспалительным, антиаллергическим, регенерирующим, спазмолитическим, антисептическим, вяжущим [5]) может проявлять дополнительно:

- гипотензивное, иммуномодулирующее, цитокинетическое, гепатопротекторное, детоксицирующее действие за счет аминокислот;
- антикоагулянтную и противоопухолевую активность за счет содержания кумаринов;
- антиоксидантную и эндотелиопротекторную активность за счет флавоноидов (рутина, лютеолина и апигенина);
- противоишемическую, гепатопротекторную, радиопротекторную, антистрессорную активность за счет наличия янтарной кислоты;
- эффект, нормализующий окислительно-восстановительные процессы, углеводный и липидный обмен, свертываемость крови, регенерацию тканей и проницаемость капилляров за счет кислоты аскорбиновой;

В свою очередь душица обыкновенная, применяемая в настоящее время в качестве отхаркивающего и антисептического средства, а также улучшающего моторику ЖКТ [5], может оказывать и другие эффекты:

- в связи с содержанием аминокислот: гипотензивный, иммуномодулирующий, цитокинетический, гепатопротекторный, детоксицирующий, а за счет высокого содержания аргинина (предшественника оксида азота) – сосудорасширяющий эффект;
- в связи с содержанием кислоты феруловой: цитопротекторный, церебро- и кардиопротекторный эффект;
- в связи с содержанием кумаринов – противовоспалительный, антикоагулянтный, противоопухолевый, антиаллергический эффект;

- в связи с содержанием флавоноидов апигенина, лютеолина и лютеолин-7-глюкозида – антиоксидантное и эндотелиопротекторное действие;
- в связи с содержанием витамина Е – антиоксидантный эффект;
- в связи с содержанием кислоты аскорбиновой душица может действовать нормализующе на окислительно-восстановительные процессы, углеводный и липидный обмен, свертываемость крови, регенерацию тканей и проницаемость капилляров.

Заключение. Нашими исследованиями подтверждено, что на основании единства путей биогенеза возможен целенаправленный поиск биологически активных веществ в лекарственных растениях. Это, в свою очередь, будет способствовать расширению показаний по применению известных видов лекарственного растительного сырья и созданию новых высокоэффективных отечественных фитопрепаратов.

Список литературы

1. Антропова И. Г. Радиационно-химические превращения кумарина и его производных в водно-органических растворах: Автореф. дис... канд. хим. наук. – Москва, 2010. – 24 с.
2. Ивницкий Ю. Ю. Янтарная кислота в системе метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма: монография. – СПб.: Лань, 1998. – 82 с.
3. Копытько Я. Ф., Костенникова З. П., Тимохина Е. А. Исследование аминокислотного состава настоек гомеопатических матричных мяты перечной, Melissa лекарственной, душицы обыкновенной, шалфея лекарственного // Фармация. – 1997. – № 6. – С. 31-34.
4. Максютин Г. В. Аминокислоты в листьях *Plantago major* L. и соцветиях *Matricaria recutita* L. // Раст. ресурсы. – 1972. – Вып.1. – С. 110-112.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства: в 2 т. – 14-е изд., перераб. и доп. – М.: Новая волна, 2006.
6. Назарова Л. Е., Оганова М. А., Абисалова И. Л. Активность кислоты феруловой в условиях цитотоксического повреждения: монография. – Пятигорск: ООО РИА на КМВ, 2010. – 115 с.
7. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Органические кислоты лекарственных растений *Matricaria recutita*, *M. matricarioides* // Химия прир. соед. – 2005. – № 6. – С.594-595.
8. Растительные ресурсы СССР: цветочные растения, их химический состав, использование; семейства *Hydrophyllaceae* – *Lobeliaceae*. – СПб.: Наука, 1991. – 200 с.

9. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52. – №. 4. – P. 673–751.

Рецензенты:

Вергейчик Евгений Николаевич, доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической химии, Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск.

Компанцев Владислав Алексеевич, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой неорганической химии, Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск.