

ИЗУЧЕНИЕ КОРНЕЙ ПОЛЫНИ ОДНОЛЕТНЕЙ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Коновалов Д. А., Тираспольская С. Г., Алфимова Г. В., Саморядова А. Б.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, Россия (353532, Ставропольский край, Пятигорск, Калинина, 11), e-mail: abc-bac@mail.ru

Корни полыни однолетней – перспективное сырье в качестве лекарственного средства. Целью данной работы является изучение морфолого-анатомических признаков и определение биологически активных соединений корней полыни однолетней. В результате исследования морфолого-анатомического строения корней полыни однолетней выявлены основные диагностические признаки и установлены товароведческие показатели сырья. Проведено фитохимическое изучение корней полыни однолетней. Установлено содержание в них дубильных веществ конденсированной структуры, азотистых оснований, кумаринов, флавоноидов, 20 микроэлементов. Сумму сесквитерпеновых лактонов из корней полыни однолетней извлекали, используя экстракцию петролейным эфиром. Количественное содержание суммы лактонов определяли методом гравиметрии, оно составило $2,03 \pm 1,45$ % в пересчете на абсолютно сухое сырье. Методом ТСХ провели разделение и идентификацию сесквитерпеновых лактонов: артемизинина, деоксиартемизинина, гидропероксида дигидроартемизининовой кислоты и артеаннуина V. Эфирное масло из корней полыни однолетней получали гидродистилляцией по методу №2 (ГФ XI). Определены физико-химические константы эфирного масла. Подтверждена его антимикробная активность по отношению к микроорганизмам: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli*.

Ключевые слова: полынь однолетняя, корни, эфирное масло, сесквитерпеновые лактоны (артемизинин и его производные), дубильные вещества конденсированной структуры, азотистые основания, кумарины, флавоноиды, микроэлементы, антимикробная активность.

STUDYING THE ARTEMISIA ANNUA ROOTS WITH THE PURPOSE OF CREATION NEW NATIONAL MEDICINES

Konovalev D. A., Tiraspol'skaya S. G., Alfimova G. V., Samoryadova A. B.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of GBOU VPO «Volgograd State Medical University», Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia (353532, Stavropol, Pyatigorsk, Kalinina 11), e-mail: abc-bac@mail.ru

Artemisia annua roots are promising raw material as a national medicines. The aim of this work is a study of the morphological and anatomical characteristics and determination of biologically active compounds of *Artemisia annua* roots. The study of morphological and anatomical structure of the of *Artemisia annua* roots identified the main diagnostic features and merchandising materials, parameters were set. The phytochemical study of the roots of *Artemisia annua* has been done. Tannins with considered structure, nitrogenous bases, coumarins, flavonoids, 20 micronutrients were found. The amount of sesquiterpene lactones from the roots of *Artemisia vulgaris* were extracted using extraction with petroleum ether. Quantification of the amount of lactones was determined by gravimetry, it was $2,03 \pm 1,45\%$ in terms of dry raw materials. Sesquiterpene lactones: artemisinine, deoxyartemisinine, dihydroartemisinine acid, hydroperoxide and arteannuine V. were separated and identified by TLC method. Essential oil from the roots of *Artemisia annua* has been got by distillation method №2 (GF XI). Physicochemical constants of essential oil were determined. Its antimicrobial activity against microorganisms: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli* was confirmed.

Key words: *artemisia annua*, roots, essential oil, sesquiterpene lactones (artemisinin and its derivatives), tannins with condensed structure, nitrogen bases, coumarins, flavonoids, minerals, anti-microbial activity.

Введение

В настоящее время прослеживается устойчивая тенденция к увеличению потребительского спроса на лекарственные растительные средства. По данным ВОЗ, около

80 % жителей мира пользуются, главным образом, медикаментами природного происхождения. Это связано с тем, что ряд биологически активных веществ растительного происхождения обладают более высокой активностью по сравнению с синтетическими, к тому же они не токсичны и могут применяться в течение длительного времени, не вызывая побочных явлений [6]. В работе приведены результаты исследований по изучению корней полыни однолетней (*Artemisia annua* L., сем. Asteraceae). Ранее в результате изучения надземной части растения – стеблей, листьев, соцветий, был выделен сесквитерпеновый лактон – артемизинин [8]. По данным литературы он обладает противомаларийной, противораковой, противовирусной, противотуберкулезной активностью [8,9]. Кроме того, артемизинин подавляет рост возбудителя описторхоза [8]. Сесквитерпеновый лактон артеаннуин В. был выделен и идентифицирован позднее.

Изучение данных литературы показало, что наименее изучена подземная часть растения (корни), составляющая значительную часть растительной массы. Поэтому фитохимическое изучение корней полыни однолетней, выделение групп биологически активных соединений (БАС) и стандартизация сырья представляют определенный интерес для получения препаратов отечественного производства, учитывая, что в РФ природные популяции полыни однолетней произрастают на Кавказе, в Приморском крае, в Сибири и др.[6].

Цель исследования. Выявить диагностические признаки корней полыни однолетней, изучить сырье на присутствие БАС, провести сравнительное изучение условий экстракции сесквитерпеновых лактонов (СЛ) различными методами, выбрав оптимальный вариант экстракции, разработать методики стандартизации лекарственного растительного сырья по содержанию СЛ в эфирном масле (ЭМ), исследовать антимикробную активность ЭМ из корней полыни однолетней.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили корни полыни однолетней, собранные в районе КМВ и ряде районов Ставропольского края во время цветения растения (август – сентябрь 2011 г.). На предварительном этапе выявляли основные диагностические признаки сырья. Для этого сырье предварительно замачивали в смеси 95 % спирта: глицерина:воды (1:1:1), готовили срезы, используя серную кислоту конц. (срез № 1), флороглюцин (срез № 2), метиленовый синий (срез № 3), судан-III (срез № 4), исследовали их с помощью микроскопа. По методикам ГФ XI и XII определяли основные товароведческие показатели сырья [1,3]. Для предварительной идентификации БАС сырья были получены водные и спиртовые извлечения различной концентрации. Для получения извлечений 10,0 г (точная навеска) измельченных корней заливали соответствующим

экстрагентом и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Вытяжки сливали, фильтровали. Извлечения, полученные после трехкратной экстракции объединяли, упаривали до 50 мл, использовали для проведения качественных реакций по методикам ГФ XI и ГФ XII [2,3]. Водные вытяжки применяли для определения дубильных веществ, азотистых оснований, производных антрацена, сапонинов, белка и аминокислот, а спиртовые – кумаринов и флавоноидов.

Выделение СЛ из растительного сырья проводили различными методами. Для выбора оптимального метода извлечения суммы СЛ использовали экстракцию петролейным эфиром, спиртовую и хлороформную экстракцию. Экстракция суммы СЛ из сырья петролейным эфиром обеспечивала наибольший выход последних и позволяла получить наиболее чистое извлечение, не содержащее примесных соединений. Для исчерпывающей экстракции СЛ из корней полыни однолетней предварительно изучили степень измельчения сырья, соотношение сырье-экстрагент, время и кратность экстракции.

Методика: Около 15,0 г (точная навеска) измельченного до 2 мм сырья полыни однолетней исчерпывающе экстрагировали петролейным эфиром в аппарате Сокслета. Экстракт с липофильными компонентами удаляли. Шрот после удаления растворителя высушивали сначала при комнатной температуре, затем в сушильном шкафу при температуре 60–65 °С.

Около 10,0 г шрота (точная навеска) помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливали 40 мл спирта 95 %, присоединяли к обратному холодильнику и экстрагировали в течение 30 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтровали через воронку с вложенным ватным тампоном в плоскодонную колбу вместимостью 200 мл. Исползованную вату помещали в колбу с сырьем и прибавляли еще 40 мл спирта 95 %. Экстракцию повторяли четыре раза в тех же условиях. К еще теплomu объединенному спиртовому экстракту для осаждения примесных соединений добавляли 5 мл 10 % раствора ацетата свинца, после 10 мин перемешивания экстракт фильтровали, фильтр с осадком промывали дважды 10 мл спирта 95 %. Фильтрат переносили в круглодонную колбу и отгоняли экстрагент на роторном испарителе при пониженном давлении и температуре 50–55 °С до объема 1,5–2 мл, затем количественно переносили во взвешенную колбу и продолжали отгонку до полного удаления растворителя. Колбу вместе со смолкой помещали в сушильный шкаф и выдерживали 8 час. при температуре 75–80 °С до полного удаления растворителя и летучих веществ. К высушенной смолке прибавляли спирт 95 % в соотношении 1:1 для растворения суммы веществ. К полученному раствору добавляли эфир

в соотношении 1:2 и оставляли для кристаллизации. Образовавшийся осадок отфильтровывали через стеклянный фильтр № 4, промывая вещество на фильтре сначала трехкратно эфиром, а затем хлороформом. Хлороформ отгоняли при пониженном давлении и температуре 40–45 °С для получения сухого остатка. Сумму СЛ в пересчете на абсолютно сухое сырье определяли гравиметрически.

Разделение суммы СЛ и их идентификацию осуществляли методом ТСХ, предварительно растворив пробу в хлороформе [4]. Оптимальное разделение суммы лактонов наблюдали при использовании системы растворителей: гексан-этилацетат (9:2), проявителя-смеси спирта 95 % – кислоты серной конц. – кислоты уксусной конц. – анисового альдегида (170:10:20:1) с последующим нагреванием хроматограммы в сушильном шкафу при 100–105 °С в течение 50 мин. На хроматограмме обнаружили четыре зоны адсорбции, отличающиеся значением R_f и окраской пятен и соответствующие следующим СЛ: соединение с R_f 0,81 соответствовало СО деоксиартемизинину, соединение с R_f 0,55 – артемизинину, соединение с R_f 0,42 – гидропероксиду дигидроартемизининовой кислоты, с R_f 0,32-артеаннуину В. Пятно артемизинина окрашивалось в ярко-розовый цвет.

Количественное определение артемизинина как базисного действующего вещества СЛ в сырье определяли также методом УФ-спектрофотометрии. Аналитическая длина волны – 293 нм, растворитель – 0,005 М раствор натрия гидроксида. Расчет содержания артемизинина в корнях полыни однолетней проводили сравнением с СО артемизинина. Ошибка определения $\pm 0,96$ %.

Эфирное масло из корней полыни однолетней получали гидродистилляцией по методу №2 ГФ XI [1]. Экспериментально установили, что процесс интенсивной отгонки масла из сырья при использовании прибора Клевенджера в модификации Лошкарева заканчивается через три часа отгонки при соотношении сырья и воды 1:30. При увеличении времени перегонки возрастают процессы гидродиффузии, значительно снижающие выход эфирного масла. Полученное масло для удаления остатка воды пропускали через молекулярное сито А4. По внешнему виду эфирное масло представляло собой легко летучую жидкость желтого цвета горьковатого вкуса с характерным запахом. Далее определяли выход эфирного масла, % и физико-химические константы эфирного масла корней полыни однолетней (удельный вес, показатель преломления, угол вращения, кислотное число, эфирное число, эфирное число после ацетилирования) [1, 3].

Содержание макро- и микроэлементов определяли спектральным методом на базе испытательной лаборатории при ФГУП «Кавказгеолсъемка» (г. Ессентуки) по методике предприятия. Пробу измельченного сырья массой 10,0 г (точная навеска) минерализовали

методом сухого разложения в фарфоровых тиглях при температуре 450 °С до получения белой золы. Зольный остаток обрабатывали 5 мл смеси, состоящей из концентрированных азотной и серной кислот и воды (1:1:1) и выпаривали досуха. Остаток растворяли в 15 мл 1 % раствора кислоты азотной, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Атомно-адсорбционное определение проводили на спектрофотометре ДФС-8-1 при определенных аналитических параметрах [7].

Изучение чувствительности патогенных микроорганизмов к эфирному маслу из корней полыни однолетней проводили с использованием метода «колодцев» [5]. Тест-микроорганизмами служили: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Веществами для сравнения были цефазолин, фузидин и рифампицин. Для этого толстый слой агара в чашке Петри засеивали 1–2 мл взвеси испытуемого микроорганизма. Излишек взвеси удаляли, подсушивали в течение 30 мин. Затем сверлом диаметром 6 мм делали 4–6 отверстий («колодцев») на расстоянии 2,5 см от центра и на одинаковом расстоянии друг от друга. «Колодец» заполняли испытуемыми веществами. Чашки выдерживали при комнатной температуре 30 мин, чтобы уровень эфирных масел несколько понизился, не переворачивая, строго горизонтально, с целью получения круглых зон. Через 16–18 ч измеряли диаметры зон угнетения роста микроорганизмов.

Результаты исследования и их обсуждение. Изучено анатомическое строение корней полыни однолетней. На поперечном срезе под микроскопом видна покровная ткань, состоящая из нескольких слоев клеток эпидермиса, имеющих вытянутую форму. Первичная кора состоит из крупных вытянутых клеток с неравномерно утолщенными стенками. Эндодерма выражена слабо, представлена несколькими рядами клеток вытянутой формы. В ксилеме корня отмечено большое количество сосудов, расположенных без особого порядка. На продольном срезе корня видно, что сосуды ксилемы имеют сетчатое утолщение.

Товароведческие показатели корней полыни однолетней: влажность 15,0±0,8 %; зола общая – 6,52±0,28 %; зола, нерастворимая в 10 % растворе кислоты хлористоводородной 1,96±0,18 %.

Полученные данные позволили нам рекомендовать оптимальный растворитель для выделения БАС корней полыни однолетней – воду очищенную и спирт 70 %. В водном извлечении из корней полыни однолетней были обнаружены: дубильные вещества конденсированной структуры, азотистые основания, в спиртовом извлечении – кумарины и флавоноиды. Установлено также, что сырье и водное извлечение из него богато

биологически активными макро- и микроэлементами (всего найдено 20 биоэлементов). При этом наибольшее содержание приходится на микроэлементы: марганец, фосфор, медь и цинк.

Экспериментально установлено, что максимальный выход СЛ из корней полыни однолетней наблюдается при использовании экстракции петролейным эфиром с последующей спиртовой экстракцией и обработкой экстракта свинца ацетатом. При этом оптимальное выделение лактонов достигается в аппарате Сокслета при измельченности сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, при пятикратной экстракции спиртом 95 %, при соотношении сырья – экстрагент (1:20). Время для каждой стадии экстракции 30 мин. Сумму СЛ в корнях полыни однолетней определяли методом гравиметрии. Оно составляло $2,03 \pm 1,45$ %.

Использование ТСХ и метода гравиметрии позволило определить %-ное содержание каждого СЛ в корнях полыни однолетней. Установлено, что содержание артемизинина составляет $0,71 \pm 0,28$ %, деоксиартемизинина – $0,53 \pm 0,34$ %, артемизинина – $0,71 \pm 0,28$ %, гидропероксида дигидроартемизининовой кислоты – $0,59 \pm 0,29$ %, артеаннуина В. – $0,22 \pm 0,11$ %.

Практический выход эфирного масла, полученный из корней полыни однолетней, составил $4,54 \pm 1,35$ %. Далее нами были определены физико-химические константы ЭМ из корней полыни однолетней. Получили следующие данные: удельный вес – $0,842 \pm 2,65$ %, показатель преломления – $1,247 \pm 1,75$ %, угол вращения – $5,71 \pm 2,74$ %, кислотное число – $16,04 \pm 0,94$, эфирное число после ацетилирования $31,05 \pm 2,11$ %.

Количественное содержание суммы СЛ в корнях полыни однолетней составляет: $2,03 \pm 1,45$ %, артемизина – $0,71 \pm 0,28$ %, деоксиартемизинина – $0,53 \pm 0,34$ %; гидропероксида артемизининовой кислоты – $0,59 \pm 0,29$ %, артеаннуина В. – $0,22 \pm 0,11$ %. Данные ТСХ показали, что основными ингредиентами сырья корней полыни однолетней являются: деоксиартемизинин (R_f 0,81), артемизинин (R_f 0,55), гидроксипероксид дигидроартемизининовой кислоты (R_f 0,42) и артеаннуин В. (R_f 0,32). Идентификация СЛ подтверждена сравнением ИК-спектров полученных веществ с ИК-спектрами свидетелей.

Результаты изучения антимикробной активности эфирного масла из корней полыни однолетней показали, что оно обладает выраженной антимикробной активностью по отношению к следующим микроорганизмам: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. Зоны угнетения роста указанных микроорганизмов составляют 8, 11 и 12 мм.

Выводы: полученные нами данные по изучению корней полыни однолетней свидетельствуют о перспективности разработки на основе этого вида сырья препаратов отечественного производства с антимикробным действием.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1: Общие методы анализа /МЗ СССР. – XI изд. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
2. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – XI изд. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.
3. Государственная фармакопея РФ. – XII изд. – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – Ч.1. – 704 с.
4. Винюков, Д. Д. Разработка методик оценки качества сырья полыни однолетней по содержанию сесквитерпеновых лактонов / Д. Д. Винюков, Д. А. Коновалов // Современные проблемы фармакологии и фармации: материалы науч. конф. – Новосибирск, 2005. – С.290-291.
5. Гунар О. В., Каметова Н. И., Евтушенко Н. С. и др. Определение антимикробного действия лекарственных веществ. Практические подходы // Фармация. – 2002. – № 2. – С. 4-7.
6. Кьосев П. А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2000. – 992 с.
7. Тираспольская С. Г., Алфимова Г. В., Круглая А. А. и др. Изучение травы белокудренника черного с целью создания новых лекарственных средств // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 5 (3). – С. 727-730.
8. Шретер А. И., Рыбалко К. С., Коновалова О. А. и др. Содержание артемизинина в *Artemisia annua* // Растительные ресурсы. – 1988. – Т. 24. – Вып. 1. – С. 66-72.
9. Haynes, R. K. Vonwiller, Progress in the research of artemisinin and its analogues as antimalarials / R. K. Haynes // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1994. // Vol. 88 (Suppl. 1). – P.23-26.

Рецензенты:

Лазарян Д. С., д.филол.н., профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, г.Пятигорск.

Василенко Ю. К., д.м.н., профессор кафедры биологической химии и микробиологии ПМФИ
– филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, г.Пятигорск.