

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ *TARAXACUM OFFICINALE WEB.*, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Неверова О.А.¹, Егорова И.Н.²

¹Кемеровский государственный университет, Кемерово, e-mail: nev11@yandex.ru;

²Федеральный исследовательский центр СО РАН (Институт экологии человека), Кемерово, e-mail: nir_kem@mail.ru

Проведена оценка содержания аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ в листьях и корнях *Taraxacum officinale Web.*, произрастающего в различных экологических условиях на территории Кемеровской области – на рекультивированных отвалах разреза «Кедровский» и в условно-чистой зоне. В ходе подбора условий экстракции аскорбиновой кислоты из сырья одуванчика лекарственного установлено, что ее оптимальный выход достигается при измельчении сырья до частиц размером не более 2 мм и использовании в качестве экстрагента 70 % этиловый спирт (1:50), время экстракции 1ч. 30 мин. Анализ показал, что содержание аскорбиновой кислоты в сырье, собранном на отвалах разреза «Кедровский», колеблется в пределах: в листьях от 123,0 до 185,0 мг %; в корнях от 27,0 до 43,0 мг %. Содержание аскорбиновой кислоты в сырье условно-чистой зоны находится в пределах: в листьях от 163,0 до 228,0 мг %; в корнях от 47,0 до 57,0 мг %. Установлено, что максимальное накопление витамина С в листьях одуванчика, на обоих участках приходится на сентябрь месяц. В августе месяце отмечено самое низкое его содержание – от 123,0 до 163,0 мг %. Результаты количественного анализа аскорбиновой кислоты позволяют рекомендовать к использованию сырья *Taraxacum officinale Web.* в качестве витаминного и антиоксидантного средства.

Ключевые слова: растительное сырье, *Taraxacum officinale Web.*, аскорбиновая кислота, ВЭЖХ метод, экстракция.

APPLICATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD IN ASSESSMENT OF ASCORBIC ACID IN PLANTS OF *TARAXACUM OFFICINALE WEB.*, GROWING IN VARIOUS ECOLOGICAL CONDITIONS IN KEMEROVO REGION

Neverova O.A.¹, Egorova I.N.²

¹Kemerovo State University, Kemerovo, e-mail: nev11@yandex.ru;

²Institute of Human Ecology Federal State Budget Scientific Institution «The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Kemerovo, e-mail: nir_kem@mail.ru

The assessment of ascorbic acid in leaves and roots of *Taraxacum officinale Web.*, growing in various ecological conditions in Kemerovo region was studied – in reclaimed dump section “Kedrovskij” and in conditionally clean zone. We have studied that the optimum yields of extraction ascorbic acid from plants of *Taraxacum officinale Web.* was achieved by following conditions: herbs pulverization to fraction size not more than 2mm, as extractant using 70 % ethyl alcohol (1:50), extraction time 1h. 30min. Analysis showed that the content of ascorbic acid in herbs, collected from mine dump of coal mine “Kedrovskij” varies: in leaves from 123.0 to 185.0 mg%; in roots from 27.0 to 43.0 mg %. The content of ascorbic acid in herbs, collected in conditionally clean zone ranges: in leaves from 163.0 to 228.0 mg%; in roots from 47.0 to 57.0 mg%. It was studied, that the maximum accumulation of Vitamin C in leaves of *Taraxacum officinale Web.*, in two areas, account for September. The lowest accumulation of Vitamin C – from 123.0 to 163.0 was observed in August. The results of quantitative analysis of ascorbic acid allow to recommend in use the herb of *Taraxacum officinale Web.* as a vitamin and antioxidant agent.

Keywords: herb, *Taraxacum officinale Web.*, ascorbic acid, high-performance liquid chromatography (HPLC) method, extraction.

В Кемеровской области одно из ведущих мест в секторе экономики занимает угольная промышленность, в структуре которой приоритетным направлением является добыча угля

открытым способом. Площадь нарушенных земель в результате угледобычи составляет более 100 тыс. га, за последние годы было рекультивировано около 20 тыс. га, при этом наряду с биологической рекультивацией идет процесс естественного зарастания нарушенных земель. На 30–35-летних отвалах сформированы и устойчиво функционируют фитоценозы, в составе которых высока доля лекарственных растений.

Одним из первых на породных отвалах угольных разрезов поселяется и занимает большие территории одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Web.) – многолетнее травянистое растение семейства астровых (*Asteraceae*), растет на разных типах отвалов, в составе разнообразных сообществ [6].

В практической медицине применяется корень одуванчика, содержащий в своем составе полисахариды (инулин), тритерпеновые соединения, стеролы (тараксерол, тараксол, стигмастерин), флавоноиды, жирное масло и т.д. Листья одуванчика используются в народной медицине как противогинготное и антиоксидантное средство. В последние годы ученые обратили внимание на надземные органы *Taraxacum officinale* Web., которые широко используются в народной медицине как у нас в стране, так и за рубежом [5,13].

Имеющиеся в литературе данные по количественному содержанию аскорбиновой кислоты в одуванчике лекарственном достаточно противоречивы, отсутствуют пределы их колебания в зависимости от фаз вегетации и мест произрастания [1,2,12].

Информация о содержании аскорбиновой кислоты в *Taraxacum officinale* Web., произрастающем в различных экологических зонах Кемеровской области отсутствует.

Цель и методика исследований

Целью представленной работы являлось изучение динамики содержания аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ в листьях и корнях одуванчика лекарственного, произрастающего в различных экологических условиях Кузбасса – на рекультивированных отвалах разреза «Кедровский» и в условно-чистой зоне.

Исследования проведены на породном отвале «Южный» ОАО разреза «Кедровский». Возраст отвала 30–35 лет. Отвал имеет равнинно-наклонный рельеф с высотой 58 м, площадь составляет 599.3 га. Возраст отвала 30–35 лет, в 2004 г. проведен комплекс работ по его планировке. Породы отвала представлены песчаником (60 %), алевролитами (20 %), аргиллитами (15 %), суглинками и глинами (5 %). [14]. Отвал характеризуется сформированными фитоценозами за счет естественного самозарастания и комплекса работ по биологической рекультивации.

Исследования сосредоточены на двух участках, различающихся экологическими условиями – опытный участок № 1 – на отвале «Южный» угольного разреза «Кедровский» и

участок № 2 – в условно-чистой зоне, расположенной в 10 км северо-восточного направления от породных отвалов.

Опытный участок (№ 1) расположен в северной части отвала «Южный». Из древесных растений на участке *расмываются* *Pinus sylbestris L.*, *Betula pendula Roth.*, *Crataegus sanguinaea Pall.*, *Populus nigra L.*, *Hippophae rhamnoides L.*, *Viburnum opulus L.*, *Populus tremula L.*, *Salix caprea L.*, *Salix fragilis L.*, травянистая растительность представлена *Taraxacum officinale Web.*, *Plantago major L.*, *Fragaria vesca L.*, *Urtica dioica L.*, *Potentilla argentea L.*, *Melilotus officinalis (L.) Pall.*, *Tussilago farfara L.* и др. [3].

Почвы контрольного участка (№ 2) представлены черноземно-луговым среднемошным тяжелым суглинком. В разрезе имеет выраженную зернистую структуру с невысокой водопрочностью. Характеризуются в основном тяжелым гранулометрическим составом. Кислотность меняется от слабокислой в верхних горизонтах и почти нейтральной в нижних (рН водной вытяжки 3.13-6.1), Данная почва отличается высокой обеспеченностью гумусом (9.65 %), сравнительно значительным содержанием фосфора (63.0–83.0 мг/кг) и калия (40.0- 171.0 мг/кг) [10]. Фитоценозы представлены злаково-разнотравным лугом на границе березового леса.

Объектами исследования служили образцы высушенных листьев и корней *Taraxacum officinale Web.*, собранных с мая по сентябрь 2013 г. Заготовку сырья проводили в сухую солнечную погоду, согласно общепринятым правилам.

По ГФ Х1 издания количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном сырье проводят методом титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (ГФХ1). Однако возникающая неустойчивая окраска оттитрованного раствора, за счет использования данного реактива, приводит к получению недостаточно точно воспроизводимых результатов, что отмечают многие исследователи [7,9].

В настоящее время для определения аскорбиновой кислоты в растительном сырье используют различные физико-химические методы (фотоколориметрические, экстракционно-фотометрические и др.). Однако доказано, что наиболее чувствительным и точным методом является метод ВЭЖХ [7,9]. Прежде всего, это связано с высокой эффективностью разделения веществ, благоприятными условиями проведения анализа.

Определение аскорбиновой кислоты проводили методом ВЭЖХ с использованием хроматографа «Милихром А-02». Экстракты анализировали в градиентном режиме с подвижной фазой: А – ацетонитрил и В – перхлорат лития с рН 2,3 при скорости потока 8мкл/мин, температуре 38 °С и УФ-детекции при 240 нм (рис.1). Время регистрации – 9 мин, поток 200 мкл/мин.

В качестве внешнего стандарта при определении использован рабочий стандартный образец (PCO) аскорбиновой кислоты. При хроматографировании в вышеуказанных условиях время удерживания (в мин) составило 0,89. Сбор и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью программ WindowsMe/200/XP ®, МилиХром А-02®, МультиХром®.

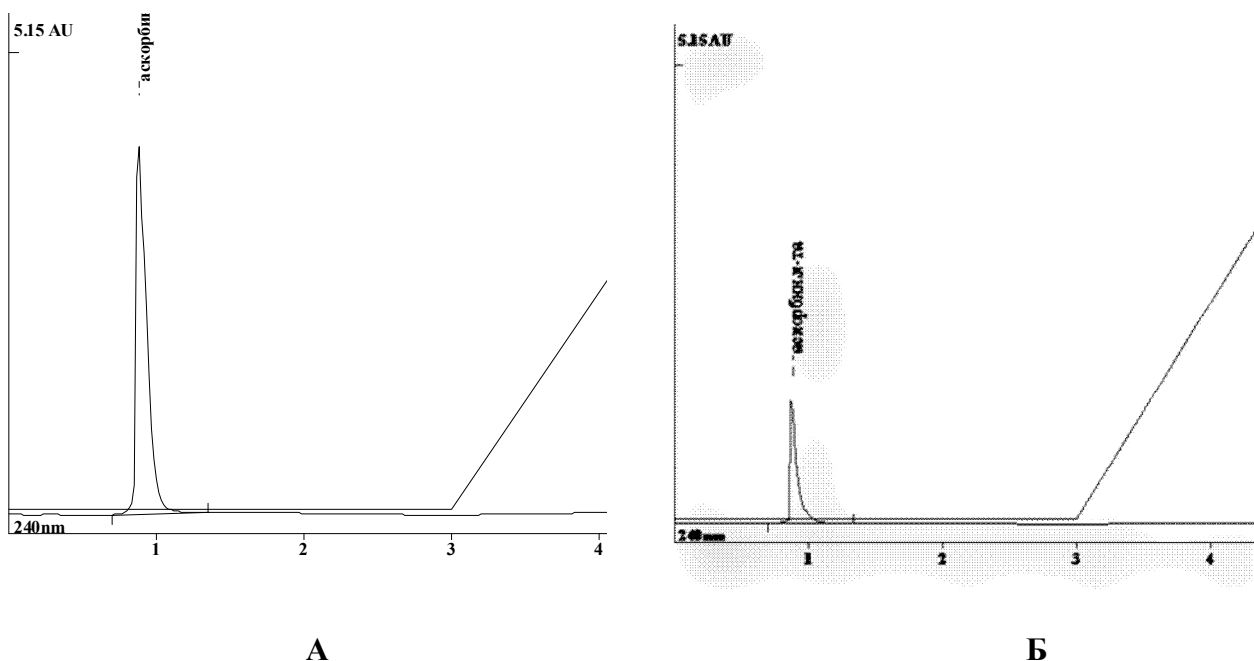


Рис.1. ВЭЖХ-хроматограмм спиртовых извлечений: А – из листьев одуванчика лекарственного; Б – из корней одуванчика лекарственного

В ходе подбора условий экстракции аскорбиновой кислоты из листьев и корней одуванчика лекарственного установлено, что ее оптимальный выход достигается при измельчении сырья до частиц размером не более 2 мм и использовании в качестве экстрагента 70 % этиловый спирт (1:50), время экстракции 1ч. 30 мин. Масса навески до 2 г (точная навеска).

Содержание аскорбиновой кислоты рассчитывали по площадям пиков на хроматограммах испытуемых растворов.

Результаты и их обсуждение

Метрологические характеристики методики количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях и корнях одуванчика лекарственного представлены в табл.

1.

Таблица 1

Метрологическая характеристика количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях и корнях *Taraxacum officinale* Web. методом ВЭЖХ

Сырье	Участок	F	\bar{X} , мг %	S^2	P, %	T(p,f)	$\Delta \bar{x}$	ε , %
листья	№ 1	4	127,0	1,113	95	2,78	4,788	$\pm 4,04$
листья	№ 2	4	227,0	0,764	95	2,78	3,284	$\pm 4,47$
корни	№ 1	4	27,30	0,310	95	2,78	1,334	$\pm 4,88$
корни	№ 2	4	47,33	0,333	95	2,78	1,433	$\pm 3,03$

Согласно результатам статистической обработки проведенных опытов, ошибка единичного определения аскорбиновой кислоты в листьях и корнях одуванчика лекарственного с доверительной вероятностью 95 % не превышала $\pm 4,88$ % (табл.1).

Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях и корнях одуванчика приведены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание аскорбиновой кислоты в листьях и корнях *Taraxacum officinale* Web.

Месяц	Содержание аскорбиновой кислоты, мг %			
	в листьях		в корнях	
	Участок №1	Участок № 2	Участок №1	Участок № 2
май	127,0	227,0	27,0	47,0
июнь	158,0	207,0	41,0	57,0
июль	153,0	165,0	43,0	50,0
август	123,0	163,0	32,0	53,0
сентябрь	185,0	228,0	40,0	51,0

Анализ образцов листьев и корней одуванчика лекарственного с использованием данной методики показал, что содержание аскорбиновой кислоты в сырье, собранном на опытном участке (№ 1), колеблется в пределах: в листьях от 123,0 до 185,0 мг %; в корнях от 27,0 до 43,0 мг % (табл.2).

Содержание аскорбиновой кислоты в сырье на контрольном участке (№ 2) находится в пределах: в листьях от 163,0 до 228,0 мг %; в корнях от 47,0 до 57,0 мг % (табл.2).

Из данных таблицы 2 видно, что максимальное накопление витамина С в листьях одуванчика, как на участке № 1, так и на участке № 2 приходится на сентябрь месяц. В августе месяце отмечено самое низкое его содержание – от 123,0 до 163,0 мг % (рис.2).

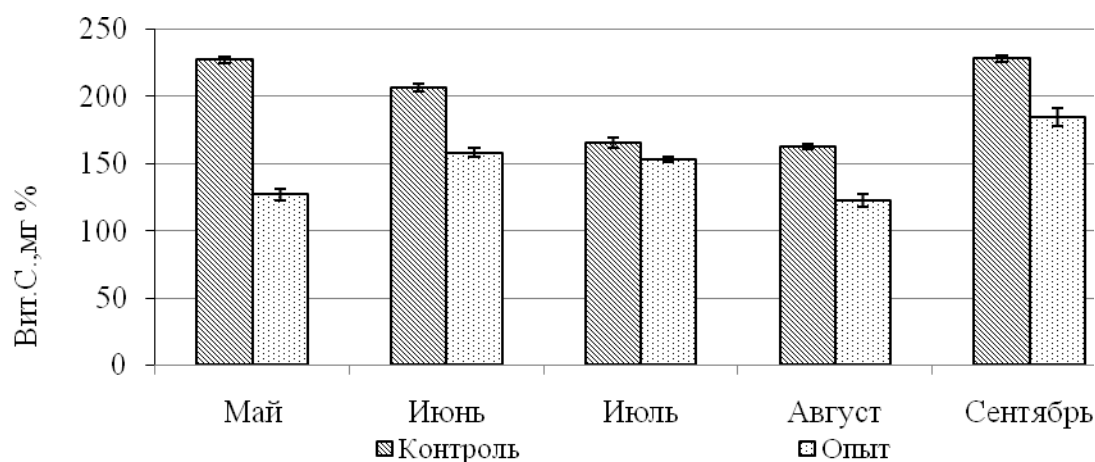


Рис. 2. Динамика содержания аскорбиновой кислоты в листьях *Taraxacum officinale* Web. в период вегетации на контрольном (№ 1) и опытном (№ 2) участках

Кроме того, установлено, что содержание аскорбиновой кислоты в лекарственном сырье (корнях) *Taraxacum officinale* Web. с участка № 1 (контроль) ниже, чем с участка № 2 (опыт) (рис. 3).

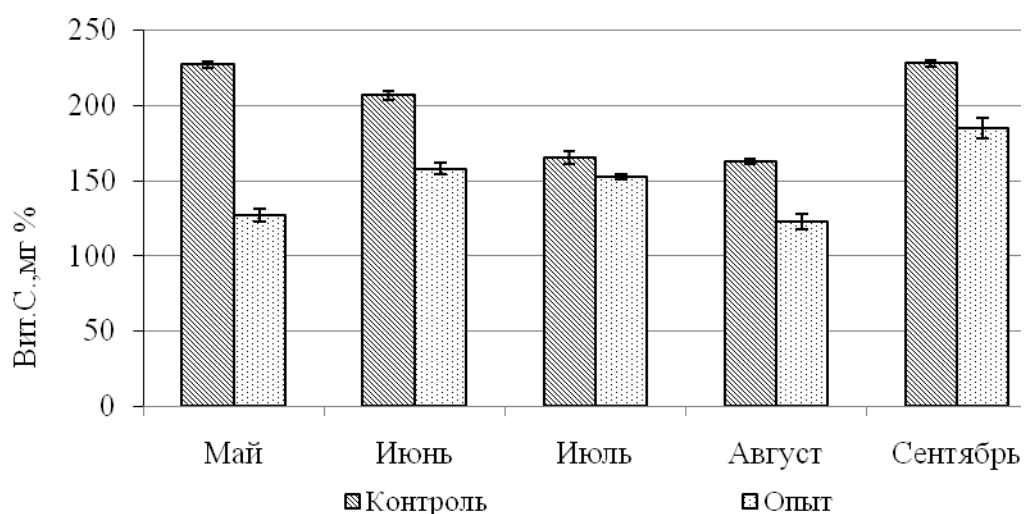


Рис. 3. Динамика содержания аскорбиновой кислоты в корнях *Taraxacum officinale* Web. в период вегетации на контрольном (№ 1) и опытном (№ 2) участках

Это подтверждает тот факт, что на содержание аскорбиновой кислоты могут оказывать влияние различные факторы внешней среды – погодные условия, освещенность, состав почвы, возраст растения, содержание микроэлементов и т.д. [4]. Поэтому на открытом, хорошо освещенном месте накопление аскорбиновой кислоты идет более интенсивно. При сборе сырья необходимо учитывать данный факт.

Количественное содержание аскорбиновой кислоты в корнях одуванчика примерно в 3–4 раза меньше, чем в листьях (табл.2).

Так в сравнении с листьями крапивы, где содержание витамина С для региона Сибири составляет по данным Лупинской и др. (2010) 185,3 мг %, по Скалозубовой (2013) – 33,64 мг %; с листьями земляники лесной -205,9 – 465,7 мг % [6,9]; с листьями черной смородины – 250,0 мг % [9]; высоковитаминным сырьем шиповника, для которого ГФ Х1 издания требует, чтобы содержание аскорбиновой кислоты было не менее 200 мг %, в листьях одуванчика содержание витамина С, с весны по осень, колеблется от 123,0 до 225,0 мг %.

Таким образом, полученные результаты позволяют предложить использовать листья *Taraxacum officinale* Web, произрастающего на территории Кузбасса как витаминное и антиоксидантное средство.

Заключение

Впервые проведен сравнительный анализ содержания аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ в листьях и корнях *Taraxacum officinale* Web., произрастающего на территориях с различной антропогенной нагрузкой, и установлено ее количественное содержание. Экспериментально показана высокая чувствительность метода ВЭЖХ в определении содержания аскорбиновой кислоты в растительных объектах.

Исследования сезонной динамики накопления аскорбиновой кислоты в листьях и корнях *Taraxacum officinale* Web. свидетельствуют о том, что накопление в них витамина С является динамическим процессом, зависящим от многих факторов внешней среды. В условиях породных отвалов содержание витамина С ниже, как в листьях, так и в корнях *Taraxacum officinale* Web. в сравнении с контрольным участком.

Полученные данные по содержанию аскорбиновой кислоты в листьях *Taraxacum officinale* Web., произрастающего на территории Кемеровской области, свидетельствуют о возможности использования данного вида сырья не только традиционно в качестве горечи, но и как источника витамина С, обладающего широкой фармакологической активностью.

Учитывая широкое распространение *Taraxacum officinale* Web. в сформированных фитоценозах возрастных породных отвалов угольных разрезов, необходимы дальнейшие исследования, связанные с подтверждением безопасности сырья для здоровья людей.

Список литературы

1. Гиренко М.М., Зверева О.А. Пряно-вкусовые овощи: пособие для садоводов-любителей. – М.: Ниола-Пресс, 2007. – 256 с.
2. Городинская В.С. Тайны целебных трав – М.: Советская Россия, 1989. – 254 с.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырьё. – М.: Изд-во «Медицина», 1989. – 398 с.

4. Григорьева Л.М. Об антиоксидантной активности шиповника коричневого и шиповника иглистого, произрастающих в южных районах Тюменской области. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://otherreferats.allbest.ru/biology/00290177_0.html.
5. Гудзенко А.В. Фармакогностические исследования надземной части одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) и разработка способов анализа биологически активных веществ: автореф. ... канд. фармац. наук. – Киев, 2008. – 21 с.
6. Манаков Ю.А., Стрельникова Т.О., Куприянов А.Н. Формирование растительного покрова в техногенных ландшафтах Кузбасса. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. – 166 с.
7. Наумова О.А., Попов Д.И. Количественное определение аскорбиновой кислоты в плодах бархата амурского методом ВЭЖХ // Вест. Пермской фармацевтической академии. – Пермь, 2010. – № 7. – С.132-136.
8. Петухова О.В. Фармакогностическое изучение листьев земляники лесной и садовой региона Урала: автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Пермь, 2003. – 21 с.
9. Попова Т.С., Потанина О.Г. Определение аскорбиновой кислоты в почках черной смородины методом ВЭЖХ// Фармация. – 2013. – № 2. – С.11-13.
10. Присянникова О.И. Антропогенная трансформация почв Кемеровской области. – Кемерово, 2005. – С.17-27.
11. Скалзубова Т.А. Изучение метаболома сырья и лекарственных форм крапивы двудомной: автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Москва, 2013. – 21 с.
12. Халматов Х.Х. Растения Узбекистана с диуретическим действие. – Ташкент: Медицина УзССР, 1979. – 180 с.
13. Bevin A. Clare, M.S., Richard S. Conroy, Ph.D., and Kevin Spelman, Ph.D.(Cand.) The Diuretic Effect in Human Subjects of an Extract of *Taraxacum officinale* Folium over a Single Day // The Journal of Alternative and Complementary Medicine – Volume 15, Number 8, 2009, pp. 929–934.
14. Egorova I.N., Neverova O.A. The Estimation of Radionuclide Pollution of Medicinal Raw Material *Taraxacum officinale* Web., Growing on The Broken Coal Mining Lands of Kuzbass //Materials of the 11 International Research and practice conference Vol.11 April 17th, 2013. Westwood, Canada. – 2013. – С.39-43.