

КОМПЛЕКСНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ГЛИКАНОВ И ФЛАВОНОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, Э.М. Сульман, Е.В. Ожимкова

Введение

В последние годы значительно возрос интерес исследователей к препаратам растительного происхождения. Растения являются источниками получения биологически активных веществ (БАВ), при этом качественный и количественный состав веществ, содержащихся в лекарственных растениях, зависит от условий произрастания растения, фазы развития, времени сбора, способов сушки и хранения сырья и других факторов [1]. Среди БАВ растительного происхождения особое место занимают гликаны и флавоноиды.

Гликаны (полисахариды) – это полимерные углеводы, молекулы которых построены из моносахаридных остатков, соединенных гликозидными связями [2]. Среди гликанов выделена группа неперевариваемых, так называемых пребиотических полисахаридов, легко ферментирующихся кишечной микрофлорой. Они обладают иммуностимулирующими свойствами и способствуют росту полезной микрофлоры кишечника [3]. Неперевариваемые гликаны содержатся в достаточно высоком количестве в растениях (до 25%) и могут быть успешно выделены из растительного сырья водной экстракцией. Количественное определение гликанов проводится по сухому остатку [2].

Флавоноиды – это обширная группа фенольных соединений (полифенолов) растительного происхождения, имеющих общую дифенилпропановую структуру [4]. Флавоноиды и другие полифенолы содержатся практически во всех растениях, и более 4000 из этих веществ идентифицированы [5]. Наиболее богаты этими веществами листья, цветки, а также стебли и кора растений (в них может содержаться до 3% флавоноидов). Некоторые из этих соединений являются более сильными антиоксидантами, чем β -каротин и витамины С и Е. Флавоноиды и другие полифенолы широко используются для профилактики рака и болезней сердечно-сосудистой системы [6]. Для извлечения флавоноидов из растительного сырья наиболее часто используют длительную мацерацию в растворе этанола с последующим выпариванием [7]. Наиболее эффективным методом количественного определения флавоноидов в экстрактах является метод, основанный на спектрофотометрировании комплексов флавоноидов с ионами Al^{3+} [8].

В данной работе в качестве источников гликанов и флавоноидов использовались лекарственные растения: календула лекарственная (*Calendula officinalis*), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla*), тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*).

Календула лекарственная (*Calendula officinalis*) – однолетнее растение, род растений семейства сложноцветных, широко используется как декоративная и лекарственная культура [7, 9]. Цветочные корзинки содержат флавоноиды (до 3,5%, в частности, 3–О-гликозиды изорамнетина и кверцетина, астрагалин, гиперозид, изокверцитрин и рутин), полисахариды, тритерпеновые сапонины (календулозиды), эфирные масла, сесквитерпены, каротиноиды, дубильные вещества, витамин С и другие вещества [9 – 12]. Календула применяется в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, антисептического, желчегонного, спазмолитического, успокаивающего, противовирусного средства [10, 12].

Ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla*) – однолетнее растение семейства сложноцветных, растет на лугах, в степях, на сорных местах [7, 9]. В ее цветочных корзинках содержатся эфирное масло, обладающее интенсивным синим цветом, обусловленным хамазуленом, флавоноиды (до 8% сухого веса, в том числе - производные апигенина, лютеолина и кверцетина), полисахариды, органические и жирные кислоты, никотиновая кислота, β-каротин, витамин С, кумарины, тритерпеновые спирты и другие компоненты [9, 13, 14]. Средства из ромашки аптечной оказывают противовоспалительное, обезболивающее, спазмолитическое, противогипоксическое, противовирусное, противоаллергическое, желчегонное, кардиотоническое, успокоительное действие [13, 14].

Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*) – многолетнее травянистое растение семейства сложноцветных. Растет повсеместно, но предпочитает сухие луга, степные склоны, опушки леса, часто встречается как сорняк по краям полей и дорог [7, 9]. Содержит полисахариды, обладающие иммуностимулирующими свойствами (до 4,6%), флавоноиды (до 3% в основном - лютеолин, лютеолин-7-глюкопиранозид, апигенин-7-глюкопиранозид (космосиин), а также рутин, 5-гидрокси-3,6,7,4-тетраметоксифлавоон, артеметин, кастицин, гликозиды кверцетина, кемпферола, изорамнетина), эфирные масла, кумарины, дубильные вещества, танины, органические кислоты, витамины С, К, β-каротин [15-17]. Препараты тысячелистника оказывают кровоостанавливающее, противомикробное, противовоспалительное, болеутоляющее, умеренное успокаивающее, мочегонное, спазмолитическое, сосудорасширяющее действие [14, 17].

Целью данной работы являлась последовательная экстракция гликанов и флавоноидов из растительного сырья: – цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis*), цветков ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*), травы тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*) – и определение содержания гликанов и флавоноидов в полученных составах.

Экспериментальная часть

1. Методика проведения экспериментов

1.1. Реактивы и материалы

В процессе работы использовались следующие реактивы и материалы: цветки календулы лекарственной (*Calendula officinalis*), цветки ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*), трава тысячелистника обыкновенного

(*Achillea millefolium*) (ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика»); $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Реахим); ледяная уксусная кислота (Мосреактив); рутин (Sigma), спирт этиловый ректификованный (40 и 70%-ный, ООО «Химмедсервис»); вода дистиллированная; HCl (конц., ООО «Химмедсервис»).

1.2. Экстракция гликанов из календулы, ромашки и тысячелистника

Для экстракции полисахаридов растительное сырье предварительно высушивалось на воздухе при комнатной температуре в течение суток. Экстракцию проводили в воде в течение 6 часов при соотношении растительное сырье : вода 1:20 (вес).

1.3. Определение содержания гликанов в экстрактах

Содержание гликанов в экстрактах определяли по сухому остатку и кинематической вязкости. Перед определением сухого остатка проба фильтровалась для отделения взвешенных частиц. Анализируемую пробу помещали в тигель, переносили в сушильный шкаф при температуре 105–110°C и высушивали до постоянного веса. Величину сухого остатка (% от массы исходного сырья) определяли по разности масс остатка пробы до и после высушивания. Измерение кинематической вязкости η (Па·с) полученных экстрактов гликанов проводили с помощью вискозиметра Уббелюде с диаметром капилляра 0,99 мм.

1.4. Экстракция флавоноидов из календулы, ромашки и тысячелистника

Экстракцию сырья проводили в 40 и 70%-ном этиловом спирте согласно Государственной Фармакопее [7], сочетая при этом способ мацерации в течение 24 часов с нагреванием до температуры 85–90°C на водяной бане.

1.5. Определение содержания флавоноидов в экстракте

В мерную колбу вместимостью 25 мл перенесли с помощью пипетки 1 мл экстракта, затем довели до метки 40%-ным этиловым спиртом (раствор 1). 3 мл раствора 1 поместили в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавили 5 мл 3%-ного раствора AlCl_3 , 1 каплю ледяной уксусной кислоты и довели до метки 40%-ным этиловым спиртом, перемешали и оставили на 40 минут (раствор 2). 3 мл раствора 1 поместили в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавили 1 каплю ледяной уксусной кислоты и довели до метки 40%-ным этиловым спиртом, перемешали и оставили на 40 минут (раствор сравнения). Далее измерили оптическую плотность раствора 2 относительно раствора сравнения при длине волны 400 нм в кювете толщиной 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в экстракте в пересчете на рутин Φ (%) определяли по оптической плотности стандартного раствора рутина:

$$\Phi = \frac{D \cdot m_0 \cdot 25}{D_0 \cdot 3},$$

где D – оптическая плотность раствора 2; D_0 – оптическая плотность стандартного раствора рутина; m_0 – навеска рутина, г.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Экстракция гликанов календулы, ромашки и тысячелистника

Динамика изменения количества сухого остатка в экстрактах в процессе экстракции приведена на рис. 1.

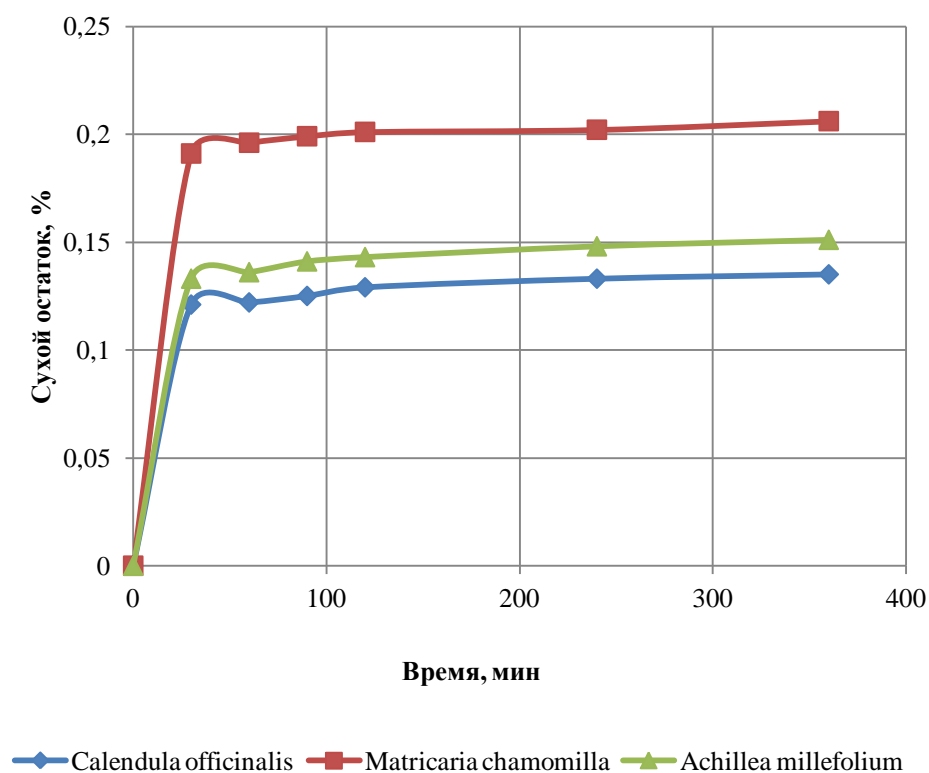


Рис. 1. Изменение содержания сухого остатка в экстрактах в зависимости от времени экстракции

Как видно из рисунка, наиболее высокий выход гликанов (около 0,2%) был получен из *Matricaria chamomilla*, наименьший (0,135%) – из *Calendula officinalis*, что также подтверждается значениями кинематической вязкости полученных экстрактов (рис. 2).

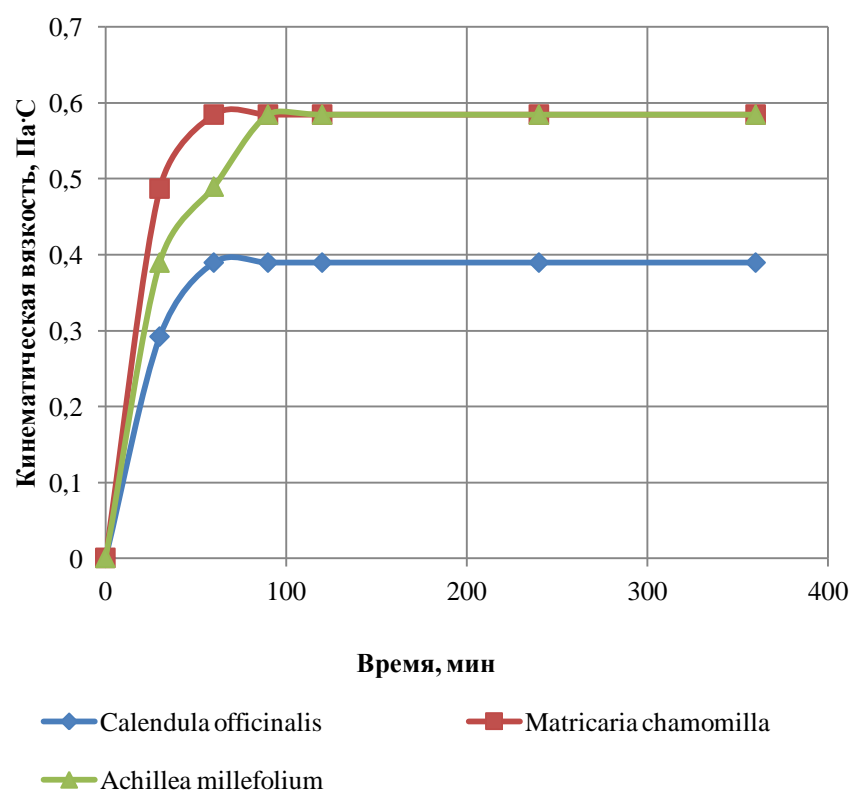


Рис. 2. Изменение кинематической вязкости экстрактов в зависимости от времени экстракции

Кроме того, следует отметить, что и вязкость, и сухой остаток экстрактов увеличиваются в процессе экстракции только до определенного времени (около 1 часа), а далее остаются практически постоянными. Это свидетельствует о том, что наибольшая доля гликанов извлекается в первый час экстракции.

2.2. Экстракция флавоноидов из календулы, ромашки и тысячелистника

Содержание флавоноидов в полученных спиртовых экстрактах, определенное по стандартному раствору рутина, приведено в табл. 1.

Таблица 1. Содержание флавоноидов в экстрактах календулы, ромашки и тысячелистника

Растительное сырье	Экстрагент	Ф, % от массы исходного сырья
<i>Calendula officinalis</i>	Этанол (40%)	1,10
	Этанол (70%)	2,02
<i>Matricaria chamomilla</i>	Этанол (40%)	1,10
	Этанол (70%)	2,76
<i>Achillea millefolium</i>	Этанол (40%)	1,28
	Этанол (70%)	1,28

Таким образом, наибольшее количество флавоноидов было экстрагировано из ромашки аптечной, что согласуется с данными литературы, свидетельствующими о том, что цветки *Matricaria chamomilla* содержат в 2 раза больше флавоноидов, чем цветки *Calendula officinalis* и трава *Achillea millefolium* [12, 13, 15]. Также по результатам экспериментов очевидно, что использование 70%-ного этанола в качестве экстрагента обеспечивает значительно более высокий выход флавоноидов по сравнению с 40%-ным.

Выводы

Была проведена последовательная водно-спиртовая экстракция гликанов и флавоноидов из цветков *Calendula officinalis* и *Matricaria chamomilla* и травы *Achillea millefolium* и определено количественное содержание этих компонентов в экстрактах. Наибольшее количество гликанов (0,2% от массы исходного растительного сырья) и флавоноидов (2,76%) было получено из *Matricaria chamomilla*. Выделенные экстракты, содержащие гликаны и флавоноиды могут быть использованы в качестве добавки к рецептуре традиционных пищевых продуктов (в частности, хлебобулочных изделий) с целью получения функциональных продуктов питания.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Библиографический список

1. Ушанова, В.М. Исследование влияния компонентов лекарственного растительного сырья на состав получаемых экстрактов [Текст] / В.М. Ушанова, В.М. Воронин, С.М. Репях // Химия растительного сырья. 2001. № 3. С. 105–110.
2. Кочетков, Н.К. Химия углеводов [Текст] / под ред. Н.К. Кочеткова, А.Ф. Бочкова. М.: Химия. 1967. 674 с.
3. Sarkar S. Potential of prebiotics as functional foods – a review [Текст] // Nutrition & Food Science. 2007. Vol. 37(3)3. P. 168–177.
4. Лобанова, А.А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья [Текст] / А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия растительного сырья. 2004. №1. С. 47–52.
5. Vinson J. A. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods [Текст] / J. A. Vinson, Y. Hao, X. Su, L. Zubik // J. Agric. Food Chem. Vol. 46, No. 9. 1998. P. 3630–3634.
6. Kähkönen M.P. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds [Текст] / M.P. Kahkonen, A.I. Hoppa, H.J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47. P. 3954–3962.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. М. 2008.

8. Авторское свидетельство СССР № 1507394. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье / В.В. Беликов, Н.Т. Колесник. 1989.
9. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия [Текст] / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. М. 2002. 656 с.
10. Varljen J. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immunostimulating activity from *Calendula officinalis* [Текст] / J. Varljen, A. Liptak, H. Wagner // *Phytochemistry*. 1989. Vol.28. P.2379–2383.
11. Слуева, Е.К. Оценка содержания суммы флавоноидов в настойке календулы [Текст] / Е.К. Слуева, Е.Н. Жукович, Л.А. Шарикова, Т.Ф. Прибыткова, Е.Б. Деревщикова // *Фармация*. 2003. Т. 51. №1. С. 13–15.
12. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Volume 2 [Текст] // WHO. 2004. 358 p.
13. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Volume 1 [Текст] // WHO. 1999. 295 p.
14. Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение [Текст] / А.Д. Турова, Е.Н. Сапожникова. М. Медицина. 1982. 600 с.
15. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Volume 4 [Текст] // WHO. 2009. 456 p.
16. Куцик, Р.В. Тысячелистник обыкновенный. *Achillea millefolium* L. (Аналитический обзор) [Текст] / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук // *Провизор*. 2002. № 14. С. 34–38.
17. Ткаченко, Е.К. Разработка лабораторной технологии получения и количественное определение суммарного содержания полифенолов в концентрате надземной части *Achillea Millefolium* L. [Текст] / Е.К. Ткаченко, С. В. Носийчук // *Вестник стоматологии*. 2009. № 2. С. 82–85.
18. Anderson E. The composition of flaxseed mucilage [Текст] / E. Anderson, H. Lowe // *J. of Biol. Chem.* 1947. Vol. 168. P. 289–297.