

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *ACHILLEA MICRANTHOIDES* KLOK.

Дуюн И. Ф.

*Запорожский государственный медицинский университет,
кафедра фармакогнозии, фармацевтической химии и технологии лекарств
ФПО
г. Запорожье*

Ключевые слова: тысячелистник подовый, эфирное масло, витамин K₁, трава, газовая хроматография с мас-спектрометрической детекцией, спектрофотометрия.

Резюме: перспективным растительным источником для получения современных фитопрепаратов являются виды рода *Achillea* L. Биологическая активность перспективного вида *Achillea micranthoides* Klok. связана с накоплением эфирного масла (до 3,11±0,28%) и филлохинона (витамин K₁) (до 3,92±0,19%). Присутствие и содержание этих веществ установлено методами ТСХ, ГХ-МС, спектрофотометрии. Трава *Achillea micranthoides* Klok. перспективна для заготовки в биоценозах и возделывания в специализированных хозяйствах для получения новых лекарственных средств.

Resume: the perspective herbal source for the receipt of the modern herbal preparations there are species of *Achillea* L. genus. The biological activity of perspective specie of *Achillea micranthoides* Klok. is related with accumulation in herbal raw material of essential oils (up to 3,11±0,28%) and phyloquinone (vitamin K₁) (up to 3,92±0,19%). The presence and content of these substances is established by the methods of TLC, GC-MS, Spectrophotometry. The herbal raw material of *Achillea micranthoides* Klok. specie is promising for harvesting in biocenoses and cultivation in specialized farms for obtaining new herbal drugs.

Актуальность. Род *Achillea* L. (тысячелистник) семейства астровых известен своим морфологическим и видовым разнообразием. В настоящее время идентифицировано более 200 его видов, широко распространенных по всему земному шару. Однако большинство из них встречается в северном полушарии, где произрастает более 150 основных видов. Большой теоретический и практический интерес представляют виды, накапливающие в вегетационный период высокие концентрации эфирного масла и др.. биологически активных веществ. Среди них перспективным представителем секции *Filipendulinae* (DC.) Afan. для применения в медицине является *Achillea micranthoides* Klok. (т. подовый).

Это многолетнее травянистое растение со стержневой корневой системой, короткими подземными и лишенными розеток надземными побегами. Листья дважды или трижды перисторассеченные, с узким, цельнокрайним и некрылатым стержнем. Образует сложный, чаще негустой щиток. Обертка корзинки яйцевидная или продолговато-яйцевидная, 1-2 мм длиной. Образует 5-6 краевых язычковых цветков, с желтыми язычками 0,3-1,5 мм длиной. Растение часто встречается в природных биоценозах по территории юга Европы, степях Черноморского побережья. Предпочитает открытые степные регионы. Период цветения включает июль-октябрь [7, 8]

Установлено, что трава видов рода *Achillea* L. накапливает в своем составе: эфирное масло, витамины K₁ и C, флавоноиды, фенольные соединения,

гидроксикоричные кислоты, полисахариды, аминокислоты, жирные кислоты, дубильные вещества, неорганические элементы [2, 12-21].

В современной официальной и народной медицине траву растений и фитопрепараты на их основе применяют для остановки кровотечений различной природы: раневых, кишечных, легочных, маточных, геморроидальных. Они эффективны при лечении воспалительных процессов, фибромиом, обильных менструаций. Повышают секреторную активность желудка, расширяют желчные протоки и активизируют желчеотделение. Нормализуют деятельность желудочно-кишечного тракта. Их назначают также при плохом аппетите, гипоацидном гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенных спастических колитах, заболеваниях мочевого пузыря, почек, печени. Проявляют выраженную эффективность в различных схемах лечения в качестве бактерицидных, кровоостанавливающих, тонизирующих кожу, противовоспалительных средств. Эффективны для заживления ран и язв различной этиологии, фурункулов, лоскутного лишая, стимулировании роста волос [5, 6, 13, 14, 16, 18].

Широко известны комплексные фитопрепараты и лекарственные средства из растительного сырья видов рода *Achillea* L.: настой травы (1:10), экстракт тысячелистника, масляный экстракт тысячелистника, противогеморoidalный, противопоносный, аппетитный, желудочный чай (Украина); Вундехил, Ротокан, настойка сложная Панкова, Фитон СД, фитобальзам “Старый рецепт” (Российская Федерация); *Origanal grosser Bittner balsam*, *Menodoron-Tropfe* (Австрия); *Siligital-Tropfen Floradix Multipretten Kruuter-Dragees*, *Stomachysat Burger*, *Doppelherz*, *Befelka-Tinctur*, *Salus Schafgraben-Tropfen*, *Alasenn Krutergranulat*, *Schamill Schafgarbe-Extrakt*, *Dr. Kleinschrod’s Cor-Insuffin-Tropfen*, *Tonzilgon*, *Salus Schafgraben-Tropfen*, *Kneipp Schafgarbe-Pflanzensaft Frauentrost*, *Chtsranthol*, *Marianon “Dr. Klein” N*, *Chelidophyt N*, *Diacur*, *Cesrasanol*, *Gallexier* (Германия); ЛИВ-52 (Индия), *Sanofi* (Польша), *Romazulan* (Румыния), *Cicaderma*, (Франция) [9]. Химический состав и накопление биологически активных веществ в траве перспективного для заготовки и возделывания в специализированных хозяйствах *Achillea micranthoides* Klok. до настоящего времени не изучен.

Цель: провести фитохимическое изучение травы *Achillea micranthoides* Klok. на содержание эфирного масла, его основных компонентов и витамина К₁ в период цветения.

Задачи: методом ГХ-МС и спектрофотометрии установить присутствие и накопление эфирного масла и витамина К₁ в траве *Achillea micranthoides* Klok. в период цветения (июль-октябрь).

Материал и методы. Траву растения (соцветия и прилегающие листья) заготавливали в период цветения (июль-сентябрь) в условиях востока и юго-востока Украины (2015–2017 гг.) в соответствии с требованиями ГФУ [4]. Сушку проводили в сушильном шкафу «Termolab СНОЛ 24/350» (t=30-35⁰ С) в течении 10 час. Эфирное масло из предварительно измельченного растительного сырья (d=1-2 мм) выделяли методом Клевенджера.

Анализ качественного состава и количественного содержания компонентов

проводили методом ГХ-МС на приборе Agilent Technology 6890N с масс-спектроскопическим детектором 5973N. Применяли капиллярную кварцевую колонку HP-5MS (l=30 м, d=0,25 мм). Температура термостата 50⁰ С в запрограммированном режиме (3⁰ С/мин. до 220⁰ С). Газ носитель гелий. Температура детектора и испарителя 250⁰ С. Скорость потока газа-носителя составляла 1 мл/мин. Ввод пробы с делением потока составлял 1/50. Анализ присутствия и количественного содержания витамина К₁ (2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинон) проводили методом ГХ-МС на приборе GC/MS Agilent Technologies 6890/5973 N; капиллярная колонка HP 19091 S-433 (HP-5 MS) (l=30 м, d=0,32 мм), Скорость потока газа-носителя (гелий) 1,5 мл/мин., инжектор автоматический (7683, Split 20:1). Температура испарителя (t = 250⁰ С; T_{нач.} = 100⁰ С; скорость нагревания 15⁰ С/мин., T_{кон.} = 280⁰ С). Детектор – масс-селективный; ионизация электронным ударом. Энергия ионизации 0 эВ, температура ионного источника (T = 230⁰ С); температура квадруполя (T = 150⁰ С); объем пробы - 1 мкл. Скорость потока газа-носителя (гелий) - 1 мл/мин. Введение пробы проводилось с разделением потока (1:50). Также применяли метод спектрофотометрии 96% извлечений на приборе Specord-200 Analytic Jena UV-vis, при длине волны 265 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно в идентичных условиях анализировали растворы витамина К₁ фирмы «Superleko Analytical, Sigma-Aldrich» (США). Идентификацию витамина К₁ в траве растения проводили методом ТСХ на пластинках «Silufol UV-254», «Silufol UV-366», «Sorbfil» ПТСХ-А-УФ и «Merk silica gel F₂₅₄» в системе бензол : петролейный эфир (1:1).

Навеску (1,0 г) измельченного растительного сырья (d=1 мм), вносили в мерную колбу (V=15 мл), добавляли 10 мл н-гексана, перемешивали на механическом встряхивателе 10 мин., выпаривали на кипящей водяной бане «ВБ-4 micromed» (t=100⁰С) в течении 5 мин. до 1 мл. Объем 0,1 мл извлечения наносили на линию старта хроматографических пластин.

Высушивали на устройстве «УСП-2» ООО «ИМИД» при температуре 40⁰ С 2-3 мин. и просматривали в УФ - свете 2 мин. На пластинах наблюдали пятна с желто-зеленой флюоресценцией, что свидетельствовало о присутствии витамина К₁ (Rf=0,67). Параллельно измеряли Rf 1% раствора стандартного образца витамина К₁ фирмы «Superleko Analytical, Sigma-Aldrich» (США). При последующем опрыскивании полученных хроматограм 5% раствором фосфорно-молибденовой кислоты, наблюдали буро-красное окрашивание п'яте.

Определение количественного содержания витамина К₁ в траве проводили методом спектрофотометрии на приборе «Specord-200 Analytic Jena UV-vis» [1].

Точную навеску (0,5 г) растительного сырья, предварительно измельчали до диаметра частиц (d=1 мм), вносили в коническую колбу вместимостью 100 мл и экстрагировали 3 раза по 25 мл этанолом 96% на кипящей водяной бане «ВБ-4 micromed» (t=100⁰С) в течении 15 мин., охлаждали.

Объединенные извлечения фильтровали через фильтр «Filtrak (FN 7)» в колбу вместимостью 100 мл, предотвращая попадание растительного сырья на фильтр, промывали 10 мл этанола 96%. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре «Specord-200 Analytic Jena UV-vis» при длине волны (λ=265 нм) в

кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали этанол 96 %.

Параллельно в тех же условиях определяли оптическую плотность раствора стандартного образца витамина К₁ фирмы «Superleko Analytical, Sigma-Aldrich» (США) (10 мкг/мл).

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных экспериментов было установлено, что содержание эфирного масла в траве растения составляло до $3,11 \pm 0,28\%$, а количество ингредиентов до 30 (1,8-цинеол, терпинен-4-ол, α -терпинеол, кариофилен, гермакрен D, элемол, кариофиленоксид, гвайол, γ -евдесмол, β -евдесмол, хамазулен и др.), Концентрация витамина К₁ составляла до $3,92 \pm 0,19\%$. Трава *Achillea micranthoides* Klok. перспективна для заготовки и возделывания в специализированных хозяйствах и перспективна для получения новых эффективных лекарственных средств.

Выводы:

1. Методом ГХ-МС в траве *Achillea micranthoides* Klok. в период цветения (июль-октябрь) установлено содержание эфирного масла (до $3,11 \pm 0,28\%$) и его компонентный состав (до 30 соединений) .

2. Методами ТСХ, ГХ-МС, спектрофотометрии в траве *Achillea micranthoides* Klok. в период цветения (июль-октябрь) установлено накопление витамина К₁ до (до $3,92 \pm 0,19\%$).

3. Трава *Achillea micranthoides* Klok. перспективна для заготовки и возделывания в специализированных хозяйствах для получения новых эффективных лекарственных средств.

Литература

1. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств /Под ред. член.-кор. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Х.: НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
2. Вариабельность содержания вторичных метаболитов *Achillea nobilis* L. в условиях Южного Урала / А. В. Щербаков, Г. Г. Бускунова, А. А. Аминова и др. // Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 198 – 204.
3. Верниковская Н. А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н. А. Верниковская, З. А. Темердашев // Аналитика и контроль. – 2012. – Т.16, №2. – с. 188-195.
4. Державна Фармакопея України. Доповнення 2. / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2004. – 617 с.
5. Кортиков В. Н. Полная энциклопедия лекарственных растений / В. Н. Кортиков, А. В. Кортиков. - Ростов н/Д: Феникс, 2008. - 797 с.
6. Кьосев П. А. Лекарственные растения: самый полный справочник / П. А. Кьосев. М.: Эксмо – Пресс, 2011. – 939 с.
7. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброчаева [и др.] ; под. ред. Ю. Н. Прокудина. – К. : Наук. Думка, 1987. – 548 с.
8. Тысячелистники /К. М. Сытник, А. Ф. Андросук, М. В. Клоков и др. – Киев: Наук. думка, 1984. – 272 с.
9. Фармакогнозія: базовий підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. (фар мац. ф-тів) ІV рівня акредитації / В. С. Кисличенко, І. О. Журавель, С. М. Марчишин та ін.; за ред. В. С. Кисличенко.– Харків: НФаУ: Золоті сторінки, 2015. – 736 с.
10. Цвелев Н. Н. Определитель сосудистых растений Северо – Западной России / Н.Н. Цвелев. - СПб.: Изд-во СПУВА, 2000. -781 с.
11. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств

(в пределах бывшего СССР). Русское издание / С. К. Черепанов.– СПб., 1995.–992 с.

12. Analysis of Aroma and Phenolic Components of Selected Achillea Species / Sh. Dokhani, T. Cottrell, J. Khajeddin, G. Mazza // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2005. – Vol. 60.– P. 55- 62.
13. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus Achillea / S. Saednia, AR. Gohari, N. Mokhber- Dezfuli, F. Kluchi // *Journal of Pharmaceutical Sciences*.– 2011.– Vol. 19, № 3. – P. 173-186.
14. Benedek B. Achillea millefolium L. s. l. – is the anti - inflammatory activity mediated by protease inhibition / B. Benedek, B. Kopp, M. F. Melzig // *J. Ethnopharmacol*. – 2007. – Vol. 113, N 2. – P. 312 – 317.
15. Characterization of Volatile Compounds of Eleven Achillea Species from Turkey and Biological Activities of Essential Oil and Methanol Extract of A. hamzaoglu Arabact& Budak / F. P. Turkmenoglu, O. T. Agar, G. Akaydin, M. Hayran et al. // *Molecules*.– 2015.– Vol. 26, № 20. – P. 11432-11458.
16. Chemical composition and biological activity of the volatile extracts of Achillea millefolium . / D. Fakconieri, A. Piras, S. Porsedda, B. Marongiu et al. // *Nat. Prod. Commun*.– 2011.– Vol. 6, № 10.– P. 1527-1530.
17. Intraspecific variability of yarrow (Achillea millefolium L. s.l.) in respect of developmental and chemical traits / K. Baczek, O. Kosakowska, J. L. Przybyl, P. Kuzma et al. // *Herba Polonica*.– 2015.– Vol. 61, № 3. – P. 37-52.
18. In Vitro Antioxidant and Antifungal Properties of Achillea millefolium L. / I. Fierascu, C. Ungureanu, S. M. Avramescu, R. C. Fierascu et al. // *Romanium Biotechnological Letters*.– 2015.– Vol. 20, № 4. – P. 10626-10636.
19. Phenolic compounds from Achillea millefolium L. and their bioactivity / S. Vitalini, G. Beretta, M. Iriti, S. Orsenigo et al. // *Acta Biochimica Polonica*.– 2011.– Vol. 58, № 2. – P. 203-209.
20. Phylloquinone (vitamin K₁) content of vegetables / M. Damon, N. Z. Zhang, D. B. Haytowitz, S. L.Booth // *Journal of Food Composition and Analysis*.– 2005.– Vol. 18, № 8. – P. 751-758.
21. The Essential Oil of Achillea millefolium L. cultivated under Tropical Condition in India / M. M. Nadin, A. A. Malik, J. Ahmad, S. K. Bakshi // *World Journal of Agricultural Sciences*.– 2011.– Vol. 7, № 5.– P. 561-565.