

УДК 582.998.1:606

Шутова Анна Геннадьевна,*к.б.н., доцент, зав. лабораторией
оранжерейных растений,**ГНУ «Центральный ботанический сад
НАН Беларуси»***Матвеева Надежда Анатольевна,***д.б.н., зав. лабораторией адаптационной
биотехнологии***Дуплий Владимир***к.б.н., старший научный сотрудник,***Ратушняк Яков***к.б.н., старший научный сотрудник,**Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины***Шабуня Полина Станиславовна***к.б.н., в.н.с.,***Фатыхова Светлана Анатольевна***с.н.с.,**Лаборатория физико-химических методов исследования,
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»***Shutava Hanna***PhD, Associate Professor,**head of laboratory of greenhouse plants,**State Scientific Institution «Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus»***Matvieieva Nadiia***Doctor of Biological Sciences,**head of the Laboratory of Adaptive biotechnology,***Volodymyr Duplij***PhD, senior scientist,***Ratushniak Yakiv,***PhD, senior scientist,**Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of
Ukraine***Shabunya Polina***PhD, leading researcher,**Fatykhava Sviatlana senior researcher,**Laboratory of Physical and Chemical Research Methods,
Institute of Bioorganic Chemistry, NASB*

ПОЛЫНЬ ОДНОЛЕТНЯЯ КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ

Аннотация. Проанализирован состав фенольных соединений из образцов наземной массы, собранной в период цветения, и линий трансформированных корней *Artemisia annua* L., а также оценена эффективность их извлечения при использовании ультразвуковой и СВЧ-обработки при различных продолжительности и температуре процесса. Методом жид-

костной хроматографии с масс-селективным и диодно-матричным детекторами определены химический состав образцов, в частности, содержание кофеилхинных кислот и их производных как основных действующих веществ в экстрактах полыни однолетней.

Ключевые слова: *Artemisia annua* L., «бородатые» корни, гидроксикоричные кислоты, экстракция, обработка ультразвуком

ФЕНОЛДУК ЖАРАТЫЛЫШТАГЫ БИОЛОГИЯЛЫК АКТИВДУУ ЗАТТАРДЫН БУЛАГЫ КАТАРЫ БИР ЖЫЛДЫК ШЫБАК

Аннотация. *Artemisia annua* L. гүлдөө мезгилинде чогултулган жер үстүндөгү массасынын үлгүлөрү жана трансформацияланган тамырларынын линиялык фенолдук кошулмаларынын курамы талдоого алынган. Процессин ар кандай узактыгында жана температураларында ультра үн жана микротолкундардын жардамы менен аларды экстракциялоонун натыйжалуулугу бааланган. Суюк хроматографиялык ыкма жана массалык тандоочу, диоддук-матрицалык детекторлор менен үлгүлөрдүн химиялык курамы аныкталды, анын ичинде кофеилхиндик кислоталардын жана алардын туундулары бир жылдык шыбактын экстракттарында таасир этүүчү негизги активдүү заттар катарында каралууда.

Негизги сөздөр: *Artemisia annua* L., «сакалдуу» тамырлар, гидроксикоричтик кислоталар, экстракция, ультраүн менен иштеп чыгуу.

ARTEMISIA ANNUA AS A SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PHENOLIC NATURE

Abstract. The composition of phenolic compounds from samples of the above-ground mass collected during the flowering period and the lines of transformed roots of *Artemisia annua* L. was analyzed. The efficiency of bioactive compounds extraction using ultrasonic and microwave treatment at different duration and temperature of the process was evaluated. The chemical composition, in particular, the content of caffeoylquinic acids and their derivatives as the main active substances in the extracts of wormwood were determined by liquid chromatography with mass-selective and diode-array detectors.

Key words: *Artemisia annua* L., “hairy” roots, hydroxycinnamic acids, extraction, ultrasonic treatment

Интерес к полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) связан с выделением в 1970-х годах китайскими учеными высокоэффективного противомалярийного соединения – артемизинина. Прежде всего он рассматривается в качестве составной части решения проблемы малярии, устойчивой к другим лекарствам [1]. Растение введено в государственную фармакопею Вьетнама и Китая. Немаловажным является и то, что у артемизинина и родственных соединений обнаружена цитотоксическая активность, что позволяет использовать их в противораковой

терапии. Экстракты этого растения также обладают противовоспалительными, антибактериальными и антимикробными свойствами. Имеются сведения об активности полыни против SARS-CoV-2 [2]. Экстракты *A. annua* также считаются перспективными для создания ранозаживляющих средств. В частности, такие агенты не цитотоксичны, способствуют пролиферации клеток и в то же время проявляют антибактериальные свойства [3].

В промышленном масштабе артемизинин до настоящего времени получают экс-

тракцией из сухих листьев полыни однолетней. Однако данное растение может служить источником и других ценных биологически активных соединений благодаря высокому содержанию эфирного масла и фенольных веществ в надземной массе.

В северных регионах семена полыни однолетней, как правило, не успевают вызреть, поэтому поиск альтернативных вариантов ее культивирования является актуальной задачей. Современные возможности генетической инженерии позволяют создавать «искусственные» продуценты биологически активных веществ, к которым относятся культуры «бородатых» корней, получаемые путем трансформации растений с помощью фитопатогенных бактерий *Agrobacterium rhizogenes*. Такие трансформированные корни характеризуются быстрым ростом биомассы при достаточно простых условиях выращивания, не требуют дополнительного освещения и применения дорогостоящих реагентов [4,5]. Кроме того, поскольку генетическая трансформация и перенос в геном растений *rol* генов *A. rhizogenes* может приводить к активации синтеза биологически активных соединений в «бородатых» корнях, а селекция с использованием доступных методов позволяет получать линии-суперпродуценты ценных соединений. В ряде исследований выявлена возможность увеличения продукции полифенолов и других веществ в культурах «бородатых» корней растений разных видов. Например, корни *Raphanus sativus*, полученные путем трансформации *A. rhizogenes* МТСС 2364 и МТСС 532, синтезировали кверцетин в количестве до 114,8 мг/г, что было выше, чем в контроле [6].

В связи с важностью задачи увеличения биологической ценности лекарственных растений целью нашей работы была оценка состава фенольных соединений в надземной массе и образцах трансформированных корней полыни однолетней, а также оптимизация методов извлечения биологически активных веществ.

Материалы и методы анализа. Использовали надземную массу полыни однолетней, собранную в период цветения, выращенную на опытном участке в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси, а также трансформированные корни *A. annua*, которые выращивали в течение 4 недель на агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макросолей и 20 г/л сахарозы при температуре +24°C в лаборатории адаптационной биотехнологии Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины. Для ВЭЖХ анализа был использован хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным детектором и масс-селективным детектором (тройной квадруполь) Agilent QQQ 6410. Разделение компонентов проб проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1×150 мм; 1,8 мкм) при температуре +40°C. Температура в автосамплере составляла +12°C, объем инъекции – 2 мкл. Детекция при длине волны 330 нм (количественный анализ). В качестве подвижной фазы А использовали 0,15 об.% раствор уксусной кислоты в деионизованной воде (рН 3,5), а подвижной фазы В – 100% ацетонитрил. Скорость потока – 0,3 мл/мин. Был использован градиентный режим элюирования от 0 до 85% фазы В за 20 минут. В качестве интерфейса ионизации был электроспрей в режиме регистрации положительных или отрицательных ионов. Параметры работы масс-детектора: температура и скорость потока осушающего газа +350°C и 7 л/мин. Время анализа 21 минута (для исходных экстрактов) и 30 минут (для сконцентрированных экстрактов).

Параметры работы масс-детектора: температура осушающего газа +350°C; скорость потока осушающего газа 7 л/мин; давление на распылителе 40 psi; напряжение на капилляре 4000 вольт; напряжение на фрагменторе – 135 вольт (положительные ионы), 200 вольт (отрицательные ионы). Для проведения анализа использовали режимы полного сканирования (MS2-Scan) в диапазоне масс (m/z) от 100 до 2000 Da. В качестве

интерфейса ионизации был электроспрей в режиме регистрации положительных или отрицательных ионов.

Для построения калибровочной кривой были использованы стандарты хлорогеновой (Aldrich, С 3878, 95%) и кофейной (Sigma C0625, $\geq 98\%$) кислот. Сток-растворы стандартов готовили в концентрации 10 мг/мл в 80%-ном этаноле. Диапазон калибровочных растворов – от 25 до 500 мкг/мл. Для веществ, присутствующих на хроматограммах, зарегистрированных при 330 нм (максимум поглощения фенольных кислот), были проанализированы масс-спектры при положительной и отрицательной ионизациях. В экстрактах разных видов при

сравнении с масс-спектрами и УФ-спектрами представленными в литературе удалось идентифицировать 11 веществ.

Общее содержание фенольных соединений определяли по методу Фолин – Чокальтеу [7], содержание флавоноидов и гидроксикоричных кислот – по методике [8], содержание экстрактивных веществ – по Государственной Фармакопее РБ [9].

Анализ растений полыни однолетней, выращенной на опытном участке Центрального ботанического сада НАН Беларуси, показал высокое содержание в надземной массе фенольных соединений, в частности гидроксикоричных кислот (табл.1).

Таблица 1.

Фенольные соединения *A. annua*, мг/г сухого растительного сырья

Группы соединений	Содержание, мг/г сухого растительного сырья
Гидроксикоричные кислоты	20,3±1,1
Флавоноиды	4,5±0,1
Фенольные соединения	28,4±2,7

В трансформированных корнях полыни также было установлено наличие флавоноидов и гидроксикоричных кислот, в том чис-

ле было обнаружено присутствие 6 гидроксикоричных кислот, некоторых из них – в значительных количествах (табл. 2).

Таблица 2

Фенольные кислоты растений *Artemisia annua* L., мг/г сухого сырья трансформированных корней

Образцы	Содержание биоактивных соединений, мг/г сухого сырья						
	Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	Дикофеоилхинная кислота			3- кофеоилхинная кислота	Общее количество фенольных кислот
			Изомер 1	Изомер 2	Изомер 3		
Растения, выращенные в полевых условиях							
	5,93	-	7,14	6,13	0,78	0,15	20,13
Трансформированные корни, линии №№							
1	1,52	-	2,83	5,25	1,12	-	10,72
2	0,76	-	1,18	2,03	0,37	0,16	4,50
3	0,94	0,11	2,76	3,66	1,28	1,31	10,06
4	0,78	-	2,36	2,71	0,82	0,47	7,14
5	1,78	-	4,93	7,50	2,65	1,43	18,29
6	2,77	0,14	5,80	14,48	2,41	1,26	26,86

Для практического использования биологически активных веществ любого растительного сырья необходимо подобрать оптимальный метод экстракции, обеспечи-

вающий максимальное извлечение целевых соединений. Было оценено влияние следующих факторов на выход экстрактивных и действующих веществ: способ экстракции

(ультразвуковая обработка, СВЧ обработка), продолжительность экстракции, температура экстракции.

На рисунке 1 приведены данные по содержанию фенольных соединений и экс-

трактивных веществ в экстрактах (г), полученных из 100 г трансформированных корней при различных методах экстракции.

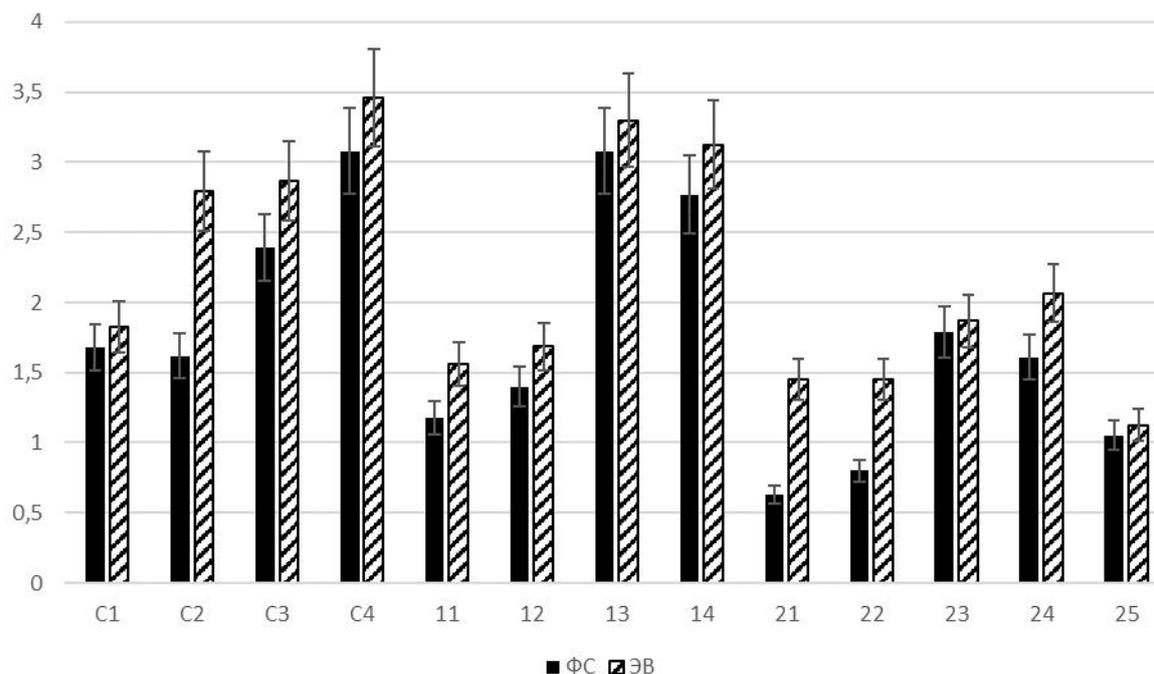


Рисунок 1. Содержание (г/100 г) фенольных соединений (ФС) и экстрактивных веществ (ЭВ) при различных методах экстракции *Artemisia annua*:

В обозначении первый знак: С – контроль корни *in vitro*,

1 – трансформированная линия 2–3, 2 – трансформированная линия 2–14;

в обозначении второй знак: экстракция 50 % этанолом с ультразвуковой обработкой: 1 – 45 мин при 20 °С, 2 – 75 мин при 20 °С; 3 – 45 мин при 60 °С, 4 – 75 мин при 60 °С; 5 – СВЧ обработка 20 с

Как видно из рисунка 1, линия 2–3 является более продуктивной по накоплению фенольных соединений и экстрактивных веществ по сравнению с трансформированной линией 2–14. Обработка ультразвуком была наиболее эффективной при повышенной температуре в сравнении с экстракцией при 20 °С. Во всех случаях повышение температуры экстракции обеспечивало достоверное увеличение выхода фенольных соединений.

Фенольные соединения составляли от 78 до 93% от количества экстрактивных веществ при использовании повышенной температуры. При проведении экстракции при комнатной температуре в ряде случаев содержание фенольных соединений по отношению к экстрактивным снижалось и составляло 43 – 55% для линии 2–14, 76–83% для линии 2–3, 58–92% для контрольных растений (табл. 3).

Таблица 3

Доля фенольных соединений в общем количестве экстрактивных веществ в образцах полыни однолетней (обозначения номеров как на рисунке 1)

Номер образца	Содержание фенольных соединений по отношению к количеству экстрактивных веществ, %
C1	92,0
C2	58,0
C3	83,4
C4	89,0
11	75,6
12	83,0
13	93,3
14	88,6
21	43,3
22	55,0
23	95,7
24	77,9
25	93,2

Увеличение времени экстракции положительно повлияло на выход фенольных соединений только для контрольных растений при нагреве, в остальных случаях повышение продолжительности экстракции не привело к увеличению выхода целевых веществ.

Наиболее эффективной среди изученных способов экстракции являлась ультразвуковая обработка при температуре 60°C в течение 45 мин. Повышение времени ультразвукового воздействия до 75 мин оказалось нецелесообразным.

Использование СВЧ обработки привело к более эффективному извлечению фенольных соединений из трансформированной линии 2–14 в сравнении с обработкой ультразвуком при 20°C. При этом доля извлечен-

ных фенольных соединений по отношению к содержанию экстрактивных веществ повысилась до 93%, однако СВЧ воздействие было менее эффективным, чем ультразвуковая обработка при 60°C.

Экстракты корней полыни были проанализированы методом жидкостной хроматографии с масс-селективным и диодно-матричным детекторами. Оказалось, что основными компонентами экстрактов являются кофеилхинные кислоты и производные кофейной кислоты (табл.4). Следует отметить, что содержание некоторых соединений, в частности, дикофеоилхинной кислот 2, 3 и 4, а также трикофеилхинной кислоты 2, в образцах «бородатых» корней полыни было значительно выше, чем в образцах контрольных растений.

Таблица 4

**Содержание индивидуальных фенольных соединений в экстрактах
Artemisia annua в зависимости от способа экстракции**

Название	Содержание фенольных соединений							
	г/100 массы корней				% от экстрактивных веществ			
Номер образца	C4	13	14	23	C4	13	14	23
Кофеилхинная кислота 1*	0,04	0,04	0,07	0,07	1,1	1,1	2,3	3,5
Хлорогеновая кислота*	0,13	0,14	0,28	0,11	3,9	4,4	9,0	6,0
Кофеилхинная кислота 2*	0,04	0,04	0,08	0,07	1,0	1,1	2,6	3,8
Феруилхинная кислота*	0,03	0,03	0,06	0	1,0	1,0	2,0	0
Эфир 2-х хинных кислот и кофейной кислоты или ацетилированный эфир трех кофейных кислот	0,07	0,06	0,12	0,07	2,1	1,8	3,9	3,9
Дикофеилхинная кислота 1	0,10	0,13	0,23	0,08	3,0	4,0	7,4	4,5
Дикофеоилхинная кислота 2	0,14	0,22	0,44	0,08	3,9	6,8	14,1	4,5
Дикофеилхинная кислота 3	0,23	0,33	0,74	0,09	6,7	10,1	23,7	4,8
Дикофеилхинная кислота 4	0,10	0,14	0,30	0,08	2,9	4,3	9,5	4,4
Трикофеилхинная кислота 1	0,05	0,04	0,10	0	1,3	1,4	3,3	0
Трикофеилхинная кислота 2	0,05	0,07	0,13	0	1,5	2,1	4,0	0
Сумма идентифицированных соединений	1,03	1,26	2,56	0,66	29,8	38,1	81,8	35,4
Содержание фенольных соединений по Фолину-Чокальтеу	3,08	3,08	2,77	1,79				
Содержание экстрактивных веществ	3,46	3,3	3,13	1,87				

Примечания: * помеченные вещества обсчитывались по калибровке для хлорогеновой кислоты, все остальные – для кофейной кислоты

Закключение. Проанализирован состав фенольных соединений из образцов надземной массы, собранной в период цветения, и линий трансформированных корней *Artemisia annua*, и оценена эффективность их извлечения при использовании ультразвуковой и СВЧ-обработки при различных продолжительности и температуре. Наиболее эффективной среди изученных способов экстракции для трансформированных корней *A. annua* была ультразвуковая обработка при температуре 60°C в течение 45 мин, причем повышение продолжительности

экстракции не приводило к увеличению выхода целевых веществ. Методом жидкостной хроматографии с масс-селективным и диодно-матричным детекторами определены состав и содержание кофеилхинных кислот и их производных как основных действующих веществ в образцах полыни однолетней, выявлено повышение содержания таких соединений как дикофеоилхинные кислоты 2, 3, 4, а также трикофеилхинная кислота 2.

Работа выполнена в рамках международного проекта № Б21УКРГ-005.

Литература

1. *Daddy N.B., Kalisya L.M., Bagire P.G., Watt R.L., Towler M.J., Weathers P.J.* (2017). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 2017. 32, 37–40.
2. *Nair M.S., Huang Y., Fidock D.A., Polyak S.J., Wagoner J., Towler M.J., Weathers P.J.* (2021). *Journal of ethnopharmacology*, 2021. 274, 114016.
3. *Mirbehbahani F.S., Hejazi F., Najmoddin N., Asefnejad A.* *Progress in biomaterials*, 2020. 9(3), 139–151.
4. *Uozumi N.* *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 2004. 91, 75-103.
5. *Srivastava S., Srivastava A.K.* *Crit Rev Biotechnol*, 2007 .27 (1): 29-43.
6. *Balasubramanian M., Anbumegala M., Surendran R., Arun M., Shanmugam G.* *Biotech.*, 2018. 8 (2), 128.
7. *Ikawa M., Schaper T.D., Dollard C.A., Sasner J.J.* *J. Agric. Food Chem.*, 2003. 515, 1811–1813.
8. *Косман В.М., Зенкевич И.Г.* *Растительные ресурсы*, 2001. 37 (4), 123–129.
9. *Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 2 томах. Минск. 2012. 1. 201.*