

Э.Ф. Степанова<sup>1</sup>, А.Г. Курегян<sup>1</sup>,  
С.В. Печинский<sup>1</sup>, Ю.Ю. Жидкова<sup>2</sup>

## Выделение биологически активных веществ из растительных объектов в военно-полевой технологии лекарственных средств на примере крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.)

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт, Пятигорск

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Рассмотрен вопрос рационального использования лекарственного растительного сырья в полевых условиях в военное время. Отмечена роль военно-полевой технологии лекарств как в историческом, так и в современном аспекте. Обозначен подход к выбору сырья, в основе которого лежит структура заболеваемости в военное время и фармакологический эффект лекарственного растительного сырья. Кровотечения и кровопотеря выделены как преобладающие в боевой патологии. На примере крапивы двудомной описан способ выделения биологически активных веществ в военно-полевой технологии, основанный на теоретической гипотезе авторов. Приведен химический состав листьев крапивы двудомной. Эксперимент проводили на модельном экстракте с предварительным определением содержания в нем каротиноидов и хлорофиллов, содержание суммы каротиноидов в листьях крапивы составило около 0,0349%, хлорофиллов – 0,3601%. Фракция каротиноидов детализирована по их виду. Доминирующим соединением признан лютеин. Подробно изложены материалы и методы исследования. Доказана эффективность в качестве экстрагентов петролейного эфира и 95% этилового спирта. Результат был достигнут последовательной обработкой исходного сырья несколькими экстрагентами в порядке уменьшения их полярности. Предложен способ разделения каротиноидов и хлорофиллов методом жидкостной экстракции. Описано изолирование каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов из суммарного липофильного экстракта, не отягощенного другими группами и биологически активных веществ.

**Ключевые слова:** военно-полевая технология, крапива двудомная, экстракция, витамин К, каротиноиды, лютеин, хлорофиллы, ксантофиллы, каротины.

**Введение.** Роль фитотерапии в военном здравоохранении сложно переоценить. В ситуациях, когда запасы лекарственных средств и изделий медицинского назначения исчерпаны или недоступны, использование природных источников с целью терапии и профилактики заболеваний является оправданным. В годы Великой Отечественной войны сбор лекарственных растений для этих целей было делом оборонного значения [6]. Изучение свойств, строения и методов выделения биологически активных веществ (БАВ) из растительных объектов с целью оценки их дальнейшего применения в полевых условиях военного времени легли в основу особого научного направления – военно-полевой технологии и контроля качества лекарственных средств. Основной задачей военно-полевой технологии является подбор перспективных растительных объектов и соотнесение их фармакологических эффектов с терапией патологических состояний и заболеваний, преобладающих в военное время. Так, кровотечения и кровопотери являются наиболее распространенными боевыми патологиями, для лечения которых целесообразно применять фитопрепараты из лекарственного растительного сырья (ЛРС), способствующего увеличению

свертываемости крови, стимулирующего гемопоэз, а на этапе восстановления целесообразно использовать витамин-содержащее ЛРС. Настой крапивы двудомной традиционно использовался для этих целей в медицине. Однако выделение БАВ из крапивы двудомной в аспекте военно-полевой технологии лекарств ранее не проводилось.

Следует отметить, что в контексте реализации Федеральной целевой программы «Развитие медицинской и фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 и дальнейшую перспективу» создание новых лекарственных препаратов на основе БАВ природного происхождения является актуальной задачей отечественного здравоохранения [8]. Реализация этих задач, а также современное состояние аналитических методов обуславливают более детальное изучение уже известных и широко применяемых растительных объектов, как, например, крапивы двудомной [2, 7, 9].

Лист крапивы является богатым источником витамина С, витамина К, а также каротиноидов. Содержание витамина К, предопределяющего кровоостанавливающие и гемопоэтические свойства растения, по данным разных авторов, составляет до 0,044%. В

то же время суммарное содержание каротиноидов, в частности лютеина, неоксантина, виолаксантина, β-каротина, ликопина, в этом виде сырья в некоторых случаях превышает 0,05% [2]. Доминирующим соединением каротиноидной природы является лютеин, относящийся к группе кислородсодержащих каротиноидов – ксантофиллам [3, 5, 6]. Каротиноиды и хлорофиллы являются неотъемлемыми участниками процесса фотосинтеза [5, 11]. Принимая во внимание этот факт, получение индивидуальных каротиноидов из природных источников с высокой степенью чистоты обязательно должно включать этап разделения этих групп БАВ. Разработка унифицированной технологии получения индивидуальных БАВ, в том числе каротиноидов, из растительных объектов могло бы вывести на качественно новый уровень военно-полевую технологию лекарственных средств в качестве особого научного направления военного здравоохранения.

**Цель исследования.** Разработать способ выделения БАВ из листьев крапивы двудомной.

**Гипотеза исследования.** Последовательная экстракция порции сырья растворителями с различной, а в некоторых случаях, специфической элюирующей способностью в отношении различных классов БАВ позволит получить каждую последующую фракцию, «не отягощенную» балластными веществами.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования выбраны две промышленные серии лекарственного сырья отечественных производителей (Закрытое акционерное общество фирма «Здоровье», серия 081214; Общество с ограниченной ответственностью производственно-коммерческая фирма «Фитофарм», серия 040914) и ЛРС, собранное в окрестностях г. Пятигорска в июне 2015 г., которому присвоен номер серии 110615.

Определение внешнего вида, влажности сырья, золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, анализ методом ультрафиолетовой спектрофотометрии проводили в соответствии с Государственной фармакопией XIII. При этом содержание экстрактивных веществ было определено согласно методу 3 общей фармакопейной статьи «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XIII [1].

Модельный экстракт, содержащий суммарную фракцию каротиноидов и хлорофиллов, получали методом ремацерации: шрот, предварительно обработанный водой очищенной и спиртом этиловым 40 и 70%, заливали 6 частями экстрагента. В качестве экстрагента были исследованы 95% этилового спирта, ацетон и хлороформ, которые брали из расчета 1:10 (коэффициент поглощения сырья – 1,8). Настаивали в течение 2, 4, 6 и 7 суток с 6 объемами экстрагента, экстрагент сливали. Далее сырье заливали 2 объемами одноименного экстрагента, время экстракции – 24 ч, экстрагент сливали. Затем шрот повторно заливали 2

объемами экстрагента, время экстракции – 24 ч, экстрагент сливали. Экстракты объединяли, упаривали до объема 1 мл и подвергали разделению пигментов.

Объединенный экстракт, содержащий каротиноиды и хлорофиллы, анализировали спектрофотометрически по следующей методике: 5 мл экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора до метки или 95% этилового спирта, или ацетоном, или хлороформом, раствор перемешивали (раствор А).

5 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор Б).

Измеряли спектр поглощения растворов Б в интервале длин волн от 200 до 750 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм, раствор сравнения – 95% этилового спирта (или ацетон или хлороформ).

Для количественных расчетов в качестве аналитической использовали длину волны при 445 нм (95% этилового спирта), 443 нм (ацетон), 458 нм (хлороформ). Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность стандартного образца (СО) лютеина (127-40-2 Sigma-Aldrich).

**Приготовление раствора СО лютеина.** Точную навеску СО лютеина, равную 0,10000 г, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл 95% этилового спирта (или хлороформа, или ацетона) доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор А).

1 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор Б).

5 мл раствора Б переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор В).

Содержание каротиноидов в сырье в пересчете на стандартный образец лютеина в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \times 50 \times 100 \times a_{ст} \times 1 \times 5 \times 100}{a_x \times 5 \times A_{ст} \times 100 \times 100 \times 50} \times \frac{100}{(100 - W)}$$

Расчет содержания каротиноидов и хлорофиллов при совместном присутствии проводили в соответствии с литературными данными [7, 9–11].

Разделение каротиноидов и хлорофиллов проводили методом жидкостной экстракции, используя экстрагенты различной полярности, в частности петролейный эфир и 95% этилового спирта.

**Результаты и их обсуждение.** Для получения достоверных экспериментальных данных необходимо было установить соответствие исходного сырья требованиям ГФ XIII, которое было проанализировано по следующим показателям: внешний вид, влажность (не более 13%), зола общая (не более 20%), зола, нерастворимая в кислоте хлористоводородной (не более 2%). Все три серии лекарственного растительного сырья соответствовали требованиям ГФ XIII. Так как в дальнейшей работе использовали экстракционные методы, то было определено содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой очищенной – 40, 70 и 95% этилового спирта [1].

В связи с тем, что в ходе эксперимента необходимо было получить модельный экстракт, содержащий каротиноиды и хлорофиллы, провели количественное определение этих соединений в исходном сырье методом спектрофотометрии, используя в качестве экстрагентов 95% этилового спирта и ацетон с содержанием 20% воды [9, 10, 12] (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Содержание каротиноидов в исходном сырье\***

Номер серии	Содержание суммы каротиноидов, %			
	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$\Delta x$	$\varepsilon\%$
081214	0,03459	0,00024	0,00061	1,78
040914	0,03523	0,00033	0,00084	2,38
110615	0,03481	0,00037	0,00095	2,74

**Примечание:** \* – данные получены для шести параллельных определений, обработанных статистически,  $p=0,95$ .

Таблица 2

**Содержание хлорофиллов в исходном сырье\*, %**

Номер серии	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$\Delta x$	$\varepsilon\%$
081214	0,36012	0,000423	0,001088	2,99
040914	0,36861	0,000426	0,001094	3,00
110615	0,35007	0,000478	0,001228	3,40

**Примечание:** \* – данные получены для шести параллельных определений, обработанных статистически,  $p=0,95$ .

Из таблиц 1 и 2 следует, что среднее значение содержания суммы каротиноидов в листьях крапивы составляет около 0,0349%, хлорофиллов – 0,3601%, что согласуется с данными, ранее опубликованными другими авторами [2, 5, 7].

Видвинутая нами гипотеза легла в основу теоретической схемы получения модельного экстракта из листьев крапивы двудомной, содержащего каротиноиды и хлорофиллы, представленной на рисунке 1. Достичь абсолютной специфичности растворителей в отношении каждого класса БАВ априори невозможно, однако частичную очистку сырья на каждом последующем этапе осуществить можно.

Нами предложено последовательное использование растворителей в порядке уменьшения их полярности. Дальнейшее подтверждение правильности сделанных предположений было проверено экспериментально.

Выбор условий получения суммарного экстракта включал анализ экстрагирующей способности каждого из экстрагентов, контроль динамики экстракции и установление времени контакта фаз на каждом этапе. Необходимость обработки исходного сырья раствором гидрокарбоната натрия была экспериментально подтверждена ранее [4]. По результатам эксперимента была исключена стадия настаивания с водой очищенной, так как профили спектров поглощения водной вытяжки и вытяжки, полученной с 40% этиловым

спиртом, в ультрафиолетовой области идентичны. Как показал результат эксперимента, 70% этиловый спирт очищает шрот для последующей экстракции малополярными растворителями, являясь оптимальным экстрагентом для флавоноидов, извлекая этот класс БАВ. Далее в соответствии с предложенной схемой были использованы растворители, которые наиболее эффективно экстрагируют каротиноиды из любых объектов – 95% этиловый спирт, ацетон, хлороформ. В ходе получения экстрактов дополнительно изучали динамику экстрагирования. Электронные спектры поглощения экстрактов имели максимумы поглощения в интервале длин волн от 360 до 450 нм и около 660–670 нм, что подтверждает содержание в них суммы каротиноидов и хлорофиллов (рис. 2).

Таким образом, для дальнейшей работы были получены модельные экстракты, содержащие каротиноиды и хлорофиллы. Экспериментально установлены оптимальные условия получения модельного экстракта: экстрагенты, последовательно используемые для получения «очищенного шрота», – 40% этиловый спирт, 70% этиловый спирт; время экстракции на каждом этапе очистки шрота – по 24 ч; экстрагенты для получения модельного экстракта – 95% этиловый спирт, ацетон, хлороформ; метод экстракции – ремацерация; гидромодуль – 1:10.

Для дальнейшего успешного разделения каротиноидов и хлорофиллов и оценки результатов было определено среднее содержание каротиноидов в полученных экстрактах в пересчете на виолаксантин – около 0,0276%, в пересчете на СО лютеина – около 0,0306% и хлорофиллов – около 0,304%. Полученные данные свидетельствуют об эффективности экстракции на уровне 79%.

На следующем этапе исследования теоретически был разработан алгоритм разделения изучаемых пигментов на каротины, ксантофиллы и хлорофиллы, представленный на рисунке 3. При этом учитывались физико-химические свойства этих групп БАВ, растворителей, которые могли бы быть использованы, и способность хлорофиллов подвергаться омылению под действием гидроксида натрия с образованием более полярных, а следовательно, гидрофильных продуктов [3, 5].

Учитывая, что хлорофиллы и ксантофиллы являются более полярными соединениями, чем каротины, и способны экстрагироваться 95% этиловым спиртом, а петролейный эфир является универсальным растворителем для липофильных соединений, упаренные экстракты растворяли в петролейном эфире и прибавляли 25 мл 95% этиловым спиртом. Для четкого разделения органических слоев в систему добавляли 2,5 мл воды очищенной. После экстракции верхний слой содержал каротины и хлорофиллы, нижний слой ксантофиллы и хлорофиллы. Далее нижний слой перенесли в другую делительную воронку.

Фракцию каротинов и хлорофиллов в петролейном эфире обрабатывали раствором натрия гидроксида. Омыленные хлорофиллы экстрагировали этиловым

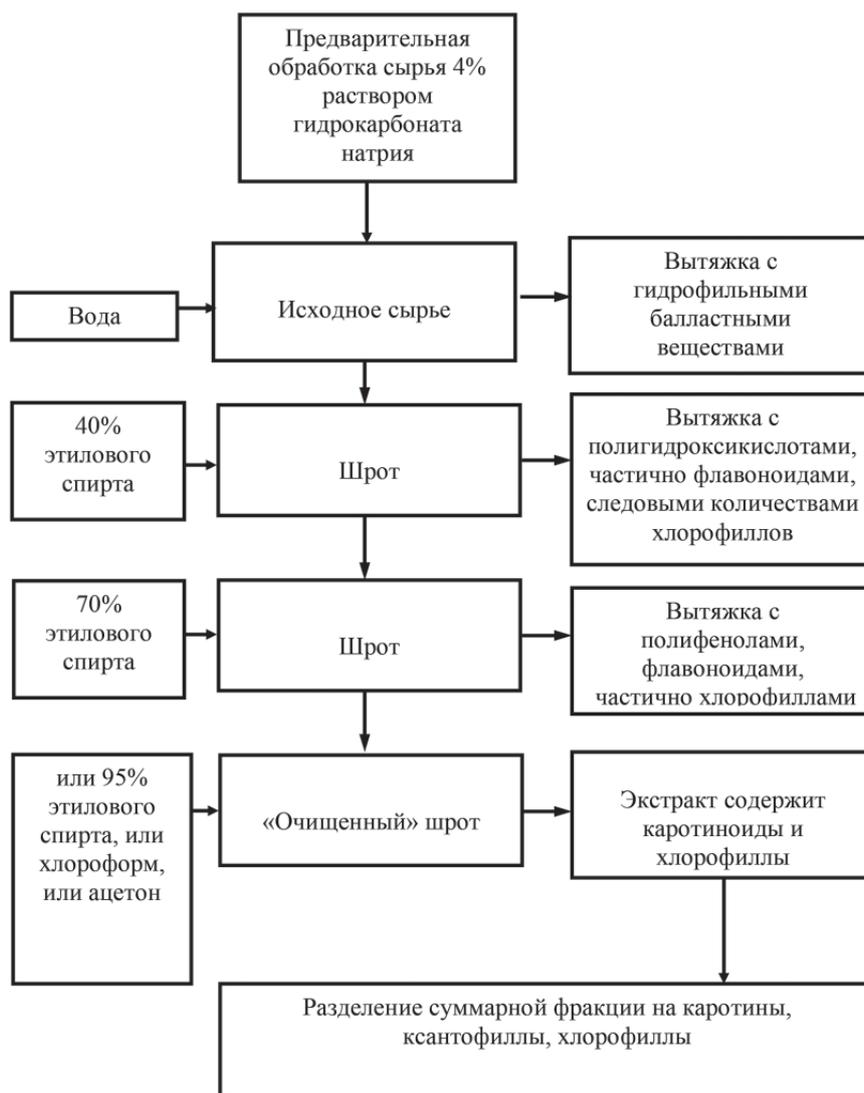


Рис. 1. Теоретическая схема получения модельного экстракта из листьев крапивы двудомной, содержащего каротиноиды и хлорофиллы

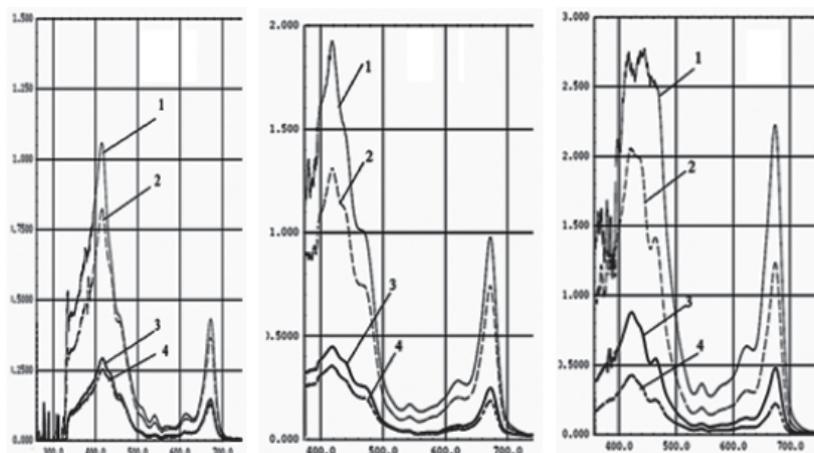


Рис. 2. Динамика экстракции липофильной фракции, содержащей каротиноиды и хлорофиллы: 1 – на 2-е сутки; 2 – на 4-е сутки; 3 – на 6-е сутки; 4 – на 7-е сутки; экстрагент: а – ацетон; б – 95% этиловый спирт; в – хлороформ

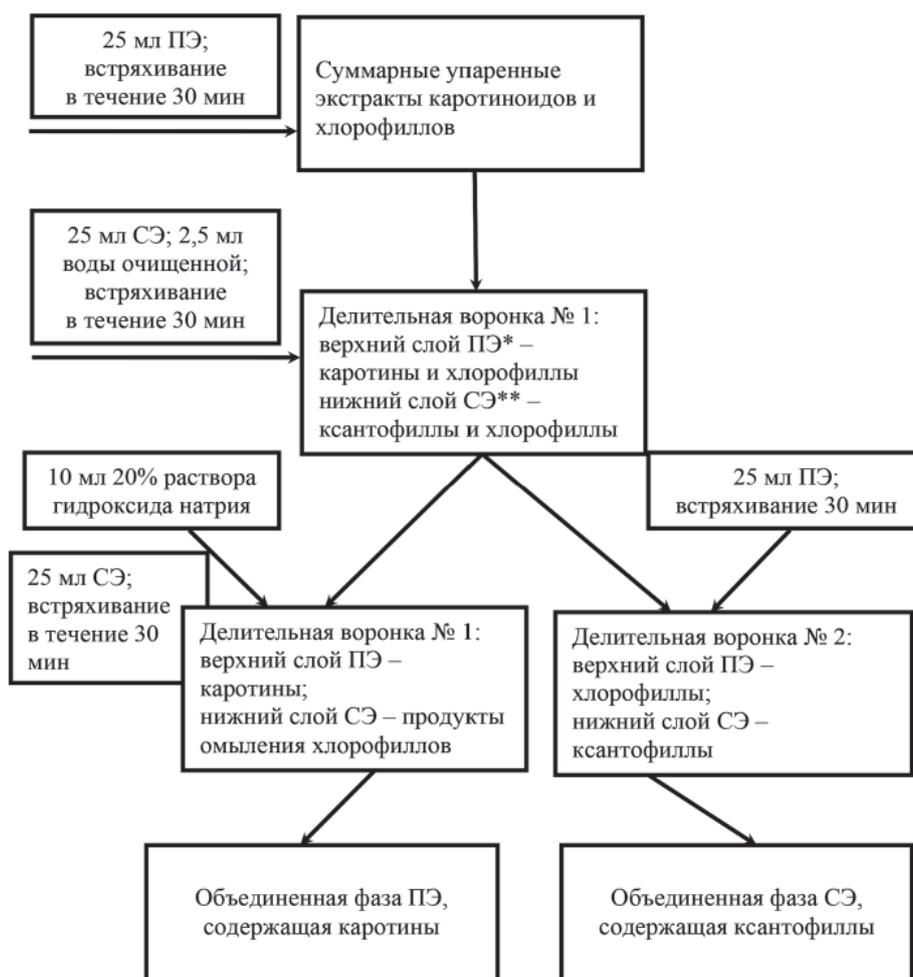


Рис. 3. Схема разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов: \*ПЭ – петролейный эфир; \*\*СЭ – спирт этиловый

спиртом. Петролейная фракция содержала каротины.

Спиртовую фракцию, содержащую ксантофиллы и хлорофиллы, обрабатывали петролейным эфиром. В результате хлорофиллы концентрировались в петролейном эфире, а ксантофиллы как более полярные соединения экстрагировались этиловым спиртом.

Измерение спектра поглощения объединенной спиртовой фракции после разделения ксантофиллов и хлорофиллов показало, что его профиль характерен для ксантофиллов. Наличие трех максимумов поглощения при 422, 445 и 474 нм и сравнение со спектром СО лютеина подтвердило, что в спиртовой фазе преимущественно содержался лютеин.

Спектр поглощения суммарной каротиновой фракции в петролейном эфире имел профиль, характерный для каротинов с положением максимумов поглощения при 426 нм, 451 нм, 478 нм. Количественное определение каротинов показало их содержание на уровне 0,00841%, среднее значение содержания ксантофиллов в пересчете на лютеин составило 0,02090%.

**Заключение.** Изучение условий получения суммарной липофильной фракции, содержащей сумму каротиноидов и хлорофиллы, и экспериментальный выбор условий разделения этих соединений в целом подтвердили правильность изначально предложенного алгоритма и позволили скорректировать некоторые первичные теоретические позиции. В частности, целесообразно исключить стадию настаивания с водой очищенной и оставить стадию настаивания сырья с 40% этиловым спиртом в связи с практически полной идентичностью экстрагируемых соединений. При этом настаивание исходного сырья с растворителями в порядке уменьшения их полярности дало возможность получить суммарный экстракт, содержащий только каротиноиды и хлорофиллы.

На основании вышеизложенного экспериментального материала предложен способ разделения таких растительных пигментов, как каротиноиды и хлорофиллы, методом жидкостной экстракции. Предложенная схема позволила провести изолирование каротинов и ксантофиллов. Разработанный подход

апробирован на трех сериях сырья, соответствовавших требованиям ГФ XIII.

Предложенный способ выделения биологически активных веществ крапивы двудомной может рассматриваться в качестве примера для дальнейшего внедрения в военно-полевую технологию лекарственных средств.

### Литература

1. Государственная фармакопея РФ XIII изд. – М.: ФЭМБ, 2015. – 3768 с.
2. Каримов, Д.Р. Оптимизация условий выделения хлорофиллов из крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и спирулины (*Spirulina platensis*) / Д.Р. Каримов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – № 4. – С. 189–196.
3. Копытько, Я.Ф. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор) / Я.Ф. Копытько, Е.С. Лапинская, Т.А. Сокольская // Хим.-фарм. журн. – 2011. – № 10. – С. 32–41.
4. Курегян, А.Г. Получение каротиноидов и их идентификация методами спектроскопии в ИК- и УФ-областях / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. – 2016. – № 1. – С. 22–27.
5. Курегян, А.Г. Структура и биологические функции каротиноидов (обзор) / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. – 2013. – № 9. – С. 4–15.
6. Мирошниченко, Ю.В. Подвиг фармацевтических работников в годы блокады Ленинграда (к 70-летию полного освобождения советскими войсками Ленинграда от немецко-фашистской блокады) / Ю.В. Мирошниченко [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2014. – № 1 (45). – С. 246–251.
7. Пат. № 2531940 Российская Федерация, МПК G01N33/15. Способ спектрофотометрического количественного определения в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии хлорофилла, каротиноидов и гидроксикоричных кислот / О.В. Тринеева и др.; опубл. 27.10.2014, БИ № 30.
8. Постановление Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. № 305 «Об утверждении государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013 – 2020 годы» // Собр. законодательства РФ. – 2014. – № 18 (ч. 1). – Ст. 2152. – 5 мая.
9. Asmare, A.M. Investigation of microalgae co-cultures for nutrient recovery and algal biomass production from dairy Manure / A. M. Asmare, B. A. Demessie, G. S. Murthy // Applied Engineering in Agriculture. – 2014. – Vol. 30 (2). – P. 335–342.
10. Brix, H. Chlorophylls and carotenoids in plant material / H. Brix // Protokol Plants Chlorophyll a, b carotenoids ethanol. – 2009. – P. 1–3.
11. Nayek, S. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents / I. Choudhury, N. Jaishree, R. Suprakash // Research Journal of Chemical Sciences. – 2014. – Vol. 4 (9). – P. 63–69.
12. Rosdina, R. Carotenoids concentration detection investigation: a review of current status and future trend / R. Rosdina, A. Mohd, S. Mohammad // International Journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics. – 2013. – Vol. 3. – P. 446–472.

E.F. Stepanova, A.G. Kuregyan, S.V. Pechinsky, Yu.Yu. Zhidkova

### Isolation of biologically active substances from plant objects in military field technology by the example of *Urtica dioica* L.

**Abstract.** The issue of rational use of medicinal plant raw materials in the field during wartime is considered. The role of the military field technology of medicines is noted, both in the historical and in the modern aspect. An approach to the selection of raw materials based on the structure of morbidity in wartime and the pharmacological effect of medicinal plant raw materials is outlined. Bleeding and blood loss are highlighted as prevalent in combat pathology. On the example of a nettle, a method for biologically active substances isolation in military field technology is described, based on the theoretical hypothesis of the authors. The chemical composition of nettle leaves is given. The content of carotenoids (up to 0,05% in total) was classified due to their kind. The dominant compound is lutein. The materials and methods of the study are described in detail. The effectiveness of petroleum ether and ethyl alcohol 95% in a role of extractants is proved. The result was achieved by successive treatment of the feedstock with several extractants in the decreasing order of polarity. A method for separating carotenoids and chlorophylls by the method of liquid extraction is proposed. Isolation of carotenes, xanthophylls and chlorophylls from the total lipophilic extract, not contaminated by other groups of biologically active substances, is described.

**Key words:** military field technology, stinging nettle, extraction, vitamin K, carotenoids, lutein, chlorophylls, carotene, xanthophylls.

Контактный телефон: +7-928-919-83-35; e-mail: EFStepanova@yandex.ru