

ШУТОВА А. Г.¹✉, ШИШ С. Н.¹, ШАБУНЯ П. С.², ФАТЫХОВА С. А.², СКАКОВСКИЙ Е. Д.³, ТЫЧИНСКАЯ Л. Ю.³

¹ ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,
Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

² ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, e-mail: iboh_lfhi@rambler.ru

³ ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»,
Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Сурганова, 13, e-mail: SED@ifoch.bas-net.by

✉ anna_shutova@mail.ru, 8 (017) 284-14-64

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ *ARTEMISIA ANNUA* L. В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В БЕЛАРУСИ

Цель. Целью работы являлась оценка состава биологически активных соединений в растениях полыни однолетней. **Методы.** Растения полыни однолетней выращивались на опытном участке Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Эфирное масло из надземной массы полыни обыкновенной выделяли методом водно-паровой дистилляции. Для анализа содержания флавоноидов и гидроксикоричных кислот использовали метод количественного экстракционно-спектрофотометрического определения суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах растений, для определения содержания фенольных соединений – метод Фолина-Чокальтеу. Анализ содержания фенольных кислот в экстрактах полыни проводили методом ВЭЖХ. Анализ эфирного масла проводили методами ГХ и ЯМР. **Результаты.** Оценен генетический потенциал полыни однолетней *Artemisia annua* L. в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси. Изучен выход и состав эфирного масла, содержание фенольных соединений и флавоноидов, состав фенольных кислот. **Выводы.** Полынь однолетняя в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси накапливает эфирное масло, в составе которого преобладают изоартемизиякетон, β-селинен, β-мирцен и камфора. В надземной массе полыни в составе фенольных соединений преобладают фенольные кислоты, в том числе хлорогеновая, и изомеры дикофеоилхинной кислоты.

Ключевые слова: полынь однолетняя, эфирное масло, фенольные соединения, фенольные кислоты.

Интерес к полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) связан с выделением в 1970-х годах китайскими учеными высокоэффективного противомаларийного 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. В промышленном масштабе артемизинин до настоящего времени получают экстракцией из сухих листьев полыни однолетней. Однако данное растение может служить источником и других ценных биологически активных соединений благодаря высокому содержанию эфирного масла в надземной массе.

Анализ научных литературных данных показывает, что в составе эфирного масла *A. annua* L. из разных стран присутствуют артемизиакетон, 1,8-цинеол, артемизиа спирт, камфора, β-пинен, b-кариофиллен [2]. Считается, что, несмотря на наблюдаемые качественные и количественные различия в накоплении данных соединений, такие компоненты масла, как камфора и артемизиякетон, типичны для полыни однолетней и могут служить веществами-маркерами для идентификации ее сырья.

Полынь может служить источником не только артемизинина и эфирного масла, но и других биологически активных веществ. Например, в полыни однолетней обнаружены флавоноиды: 4-метилвый эфир кверцетина, флавоны, 2,2-дигидрокси-6-метоксихромен и 2,2,6-

тригидроксихромен [3], хризопленетин, кастицин, эвкапин, артемитин.

Поскольку в научной литературе отсутствуют данные о перспективах использования данного растения в Беларуси в качестве источника биологически активных соединений, целью данной работы была оценка состава эфирного масла и фенольных соединений, выделенных из надземной массы полыни однолетней, выращенной в центральной агроклиматической зоне Беларуси.

Материалы и методы

Растения полыни однолетней выращивались на опытном участке Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Образцы собирались в фазе бутонизации и фазе цветения, высушивались и далее подвергались биохимическому анализу. Эфирное масло выделяли методом водно-паровой дистилляции согласно Государственной фармакопее РБ [4]. Оптимальное соотношение сырья и воды при гидродистилляции 1:30, время гидродистилляции – не более 1 часа. Полученное масло для удаления остатка воды обрабатывали безводным сульфатом натрия.

Мажорные компоненты были определены методом ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии при исследовании хлороформных растворов эфирных масел. Спектры ЯМР водных растворов зарегистрированы на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500 и 126 МГц для ядер ^1H и ^{13}C соответственно при температуре 293 К. В качестве внутреннего стандарта в случае ядер ^1H использовали сигнал CHCl_3 (примесь в CDCl_3 , $g = 7,27$ м. д.), для ядер ^{13}C ($g = 77,7$ м. д.) – сигнал растворителя. Все экспериментальные данные получены и обработаны с помощью пакета программ XWIN – NMR 3.5. Для идентификации соединений в эфирном масле в аналогичных условиях записаны спектры ряда индивидуальных соединений.

Разделение компонентов эфирного масла проведено на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-селективным детектором Agilent 5975 в режиме ионизации электронами. Анализ хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MSD ChemStation D 02.00.275 (Agilent Technologies Inc., USA).

Для анализа содержания флавоноидов и гидроксикоричных кислот был выбран метод количественного экстракционно-спектрофото-

метрического определения суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах растений [5]. Для определения общего содержания ФС применяли метод Фолина-Чокальтеу [6]. Для калибровки использовали галловую кислоту в диапазоне концентраций 0,05–0,75 г/л.

Анализ содержания фенольных кислот методом ВЭЖХ проводили в экстрактах полыни, полученных двукратной экстракцией 96 % этанолом. Для количественного и качественного анализа был использован хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. Разделение компонентов проб проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1×150 мм; 1,8 мкм) при температуре +40°C. Детекция при длине волны 330 нм. В качестве подвижной фазы А использовали 0,15 об. % раствор уксусной кислоты в деионизованной воде (pH 3,5); подвижной фазы В – 100 % ацетонитрил. Скорость потока – 0,3 мл/мин. Был использован градиентный режим элюирования. Время анализа – 32 минуты. Для расчета содержания фенольных кислот были использованы стандарты хлорогеновой и кофейной кислоты. Содержание ди- и трикофеилхиновых кислот определяли в пересчете на кофейную кислоту. Производные кофейной кислоты были идентифицированы по масс-спектрам, которые содержали характерные ионы $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 517 для дикофеоилхиновых кислот и с m/z 679 для трикофеоилхиновой кислоты. Также масс-спектры этих соединений содержали характерный фрагмент с m/z 163, появляющийся при отщеплении кофейной кислоты. Наличие этих соединений в экстракте полыни согласуется с научными литературными данными [7].

Полученные результаты обработаны с помощью статистического пакета программ M.Excel и Stadia 8.0. Повторность опыта четырехкратная.

Результаты и обсуждение

Эфирное масло полыни представляло собой желтую жидкость с приятным отчасти пряным запахом. Выход эфирного масла из высушенной надземной массы полыни однолетней составлял от 0,13 до 0,35 мл из 100 г.

В составе эфирного масла согласно данным, полученным методом ГХ (табл. 1), преобладали изоартемизиякетон и β -селинен, причем содержание изоартемизиякетона несколько уве-

личивалось к фазе цветения, а содержание β -селинена, напротив, снижалось. Однако эти изменения составляли не более 10 %.

Отнесение пика 3 на рис. 1 к изоартемизиякетону было сделано после анализа пробы эфирного масла методом ЯМР.

В большинстве работ по анализу компонентов эфирного масла полыни однолетней методами ГХ пик 3 приписывается артемизиякетону [8, 9]. Однако спектры ЯМР артемизиякетона имели бы характерный набор линий, который не совпадает с экспериментально получен-

ным. Спектрально (^1H и ^{13}C ЯМР) главный мажорный компонент соответствует структуре изоартемизиякетона, химические сдвиги которого, а также других идентифицированных методом ЯМР компонентов эфирного масла представлены в таблицах 2 и 3. Формулы и нумерация углеродных атомов этих соединений приведены на рис. 2.

Данные о химических сдвигах, идентифицированных методом ЯМР, компонентов эфирного масла представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 1. Состав эфирного масла полыни однолетней

№ на рис. 1	Соединение	Время выхода, мин	Содержание, в % от общего количества	
			фаза бутонизации	фаза цветения
1	β -мирцен	7,68	4,12	4,22
2	1,8-цинеол	8,42	1,56	1,64
3	изоартемизиякетон	8,95	51,1	54,63
6	(-)- камфора	10,33	6,84	6,73
7	(+/-)-лавандулол	10,50	0,97	0,87
9	(+)- α -лонгипинен	13,28	0,80	0,84
10	бензил-2-метилбутарат	13,63	0,67	0,64
11	(E)- β -кариофиллен	14,19	1,70	1,68
12	(E)- β -фарнезен	14,46	0,44	0,40
14	(-)-гермакрен D	14,98	0,94	0,84
15	β -селинен	15,11	17,8	16,31
17	бергамотол	16,55	1,13	1,65
20	(-)-изоаромадендрен	16,68	0,61	0,59
21	(-)- α -копаен	16,79	1,07	1,03

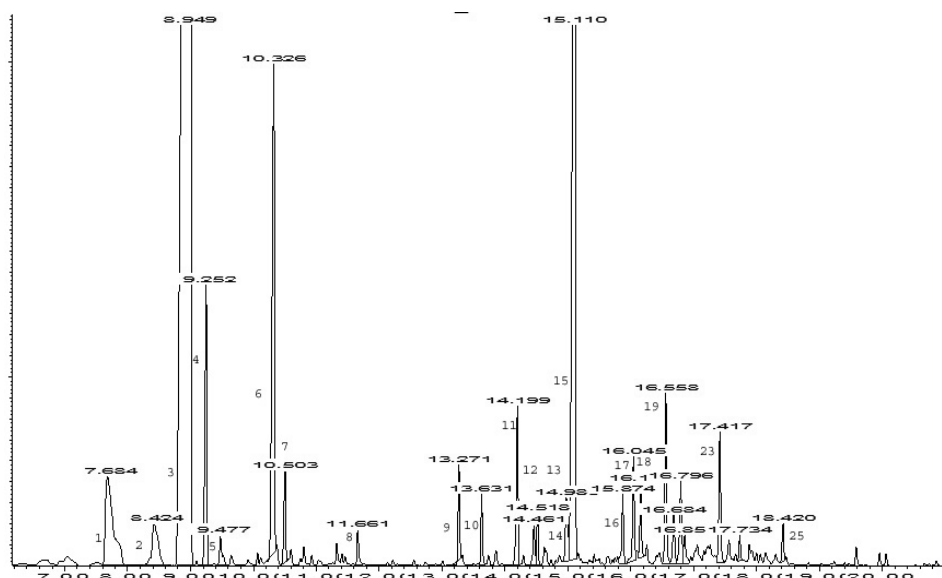


Рис. 1. Хроматограмма эфирного масла полыни однолетней.

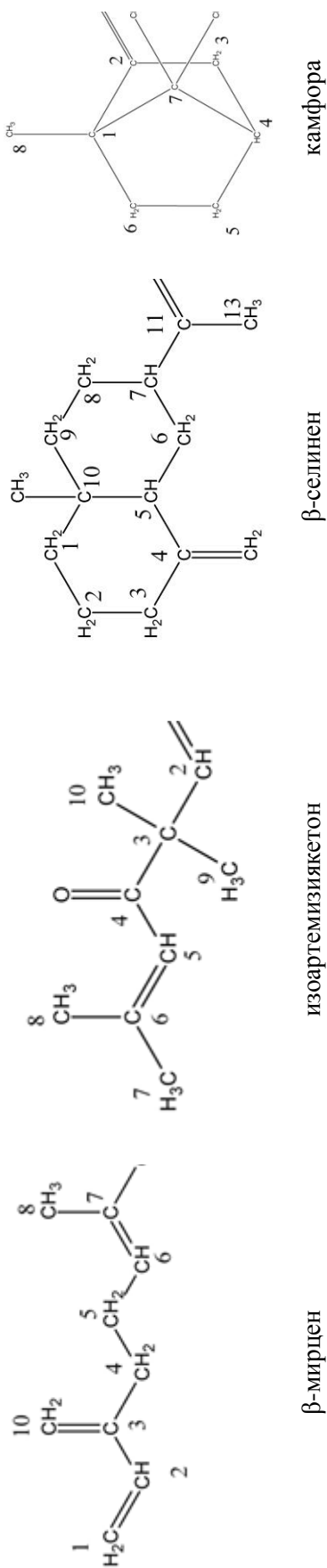


Рис. 2. Структурные формулы основных компонентов эфирного масла *A. annua*.

Таблица 2. Химические сдвиги ¹H (д, м.д.) компонентов эфирного масла полыни однолетней

Соединение	Номер атома углерода														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-мирцен	5,08	6,41		2,25	2,22	5,18		1,64	1,73	5,03					
	5,27									5,04					
изоартемизиякетон	5,10				6,22		2,11	1,87	1,20	1,20					
	5,13														
β-селинен	1,26	1,60	2,01		1,81	1,29	1,96	1,55	1,27			4,71	1,75	4,42	0,71
	1,43		2,31		1,55	1,34		0,85	1,49					4,69	
Камфора			1,78	2,03	1,29	1,34			0,90	0,77					
			2,29		1,89	1,62									

Таблица 3. Химические сдвиги ¹³C (д, м.д.) компонентов эфирного масла полыни однолетней

Соединение	Номер атома углерода														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-мирцен	113,7	139,7	146,8	32,1	27,4	124,8	132,4	26,4	18,4	116,3					
	114,3	143,8	50,9	50,9	121,2	156,5	28,5	21,5	24,3	24,3					
Изоартемизиякетон	42,6	24,0	37,5	37,5	50,5	30,1	46,5	27,4	41,8	36,4	151,6	108,8	21,7	106,0	17,0
	58,2	220,2	43,8	43,8	27,6	30,4	47,2	9,8	20,3	19,7					

Для растений полыни однолетней, выращенных на опытном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, было установлено высокое содержание фенольных соединений (табл. 4). При этом методом количественного экстракционно-спектрофотометрического определения суммарного содержания гидрокси-коричных кислот в присутствии флавоноидов в

экстрактивных веществах растений было показано преимущественное накопление гидрокси-коричных кислот в надземной части полыни однолетней.

Результаты хроматографического анализа также подтвердили преобладающее содержание гидрокси-коричных кислот в спиртовых экстрактах растительного сырья полыни однолетней (табл. 5).

Таблица 4. Фенольные соединения *A. annua*, мг/г сухого растительного сырья

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

Таблица 5. Фенольные кислоты растений *Artemisia annua*, мг/г сухого растительного сырья

Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	Дикофеоилхинная кислота			3-кофеоилхинная кислота	Общее количество фенольных кислот
		Изомер 1	Изомер 2	Изомер 3		
5,93	-	7,14	6,13	0,78	0,15	20,13

Выводы

Оценен генетический потенциал полыни однолетней в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси. Показано, что в надземной массе полыни однолетней накапливается эфирное масло в количестве до 0,35 мл/100 г сухого растительного сырья. В качестве основного компонента эфирного масла установлен

изоартемизиякетон, содержание которого составляет более 50 %. Также показано присутствие в эфирном масле значительных количеств β-селинена, β-мирцена и камфоры. В составе фенольных соединений преобладают фенольные кислоты, а именно хлорогеновая, и изомеры дикофеоилхинной кислоты.

References

1. WHO monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua* L. World Health Organization, 2006. 48 p.
2. Woerdenbag H.J., Bos R., Salomons M.C., Hendriks H., Pras N., Malingre T.M. Volatile constituents of *Artemisia annua* L. (Asteraceae). *Flavour and Fragrance Journal*. 1993. Vol. 8. P. 131–137.
3. Yang S.-L., Roberts M.J., O'Neill F., Bucar J.D. Phillipson Flavonoids and Chromenes from *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*. 1995. Vol. 38, № 1. P. 255–257.
4. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus. In 2 volumes. Minsk, 2012. Vol. 1. С. 201. [in Russian] / Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 2 томах. Минск, 2012. Т. 1. С. 201.
5. Kosman V.M., Zenkevich I.G. Kolichestvennoe ekstrakcionno–spektrifotometricheskoe opredelenie summarnogo soderzhaniia gidroksikorichnykh kislot v prisutstvii flavonoidov v ekstraktivnykh veshchestvakh nekotorykh lekarstvennykh rastenii. *Rastitel'nye resursy*. 2001. Т. 37, No. 4. P. 123–129. [in Russian] / Косман В.М., Зенкевич И.Г. Количественное экстракционно–спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидрокси-коричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений. *Растительные ресурсы*. 2001. Т. 37, № 4. С. 123–129.
6. Ikawa M., Schaper T.D., Dollard C.A., Sasner J.J. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51. P. 1811–1813.
7. Bourgou S. et al. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties. *Food Research International*. 2017. Vol. 99, No. 1. P. 702–712.
8. Čavar S., Maksimović M., Vidic D., Parić A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products*. 2012. Vol. 37, No. 1. P. 479–485.
9. Charles D.J., Cebert E., Simon J.E. Characterization of the Essential Oil of *Artemisia annua* L. *Journal of Essential Oil Research*. 1991. Vol. 3, No. 1. P. 33–39. <https://doi.org/10.1080/10412905.1991.9697903>.

ШУТОВА Г. Г.¹, ШИШ С. М.¹, ШАБУНЯ П. С.², ФАТИХОВА С. А.², СКАКОВСЬКИЙ Е. Д.³, ТИЧИНСЬКА Л. Ю.³

¹ Центральний ботанічний сад НАН Білорусі,

Білорусь, 220012, м. Мінськ, вул. Сурганова, 2в, e-mail: anna_shutova@mail.ru

² Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі,

Білорусь, 220141, м. Мінськ, вул. Академіка Купревіча, 5/2, e-mail: iboh_lfhi@rambler.ru

³ Інститут фізико-органічної хімії НАН Білорусі,

Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Сурганова, 13, e-mail: SED@ifoch.bas-net.by

ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТІ *ARTEMISIA ANNUA* L. В ЯКОСТІ ДЖЕРЕЛА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У БІЛОРУСІ

Мета. Метою роботи було оцінити склад біологічно активних сполук у рослинах *Artemisia annua* L. **Методи.** Рослини вирощували на експериментальній ділянці Центрального ботанічного саду Національної академії наук Білорусі. Ефірну олію з надземної маси виділяли методом дистиляції водяною парою. Для аналізу вмісту флавоноїдів та гідроксикоричних кислот використовували метод кількісного екстракційно-спектрофотометричного визначення сумарного вмісту гідроксикоричних кислот у присутності флавоноїдів у екстрагованих речовинах рослин, а для визначення вмісту фенольних сполук використовували метод Фолина-Чокальтеу. Аналіз ефірної олії проводили методами ГХ і ЯМР. Аналіз вмісту фенольних кислот у екстрактах проводили за допомогою ВЕРХ. **Результати.** Генетичний потенціал *A. annua* оцінювали в умовах центральної агрокліматичної зони Білорусі. Досліджено врожайність і склад ефірних олій, вміст фенольних сполук і флавоноїдів, склад фенольних кислот. **Висновки.** *A. annua* в умовах центральної агрокліматичної зони Білорусі містить ефірну олію, в якій переважають ізоартемезіакетон, β-селінен, β-мірцен і камфора. У надземній масі полину у складі фенольних сполук переважають фенольні кислоти, у тому числі хлорогенова, та ізомери дикофеоліквіної кислоти, переважали у складі фенольних сполук.

Ключові слова: полин однорічний, ефірна олія, фенольні сполуки, фенольні кислоти.

SHUTAVA H. G.¹, SHYSH S. N.¹, SHABUNYA P. S.², FATYKHAVA S. A.², SKAKOVSKI E. D.³, TYCHINSKAYA L. Yu.³

¹ Central Botanical Gardens, NAS of Belarus,

Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2v, e-mail: anna_shutova@mail.ru

² Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,

Belarus, 220141, Minsk, Kuprevich str., 5/2, e-mail: iboh_lfhi@rambler.ru

³ Institute of Physical and Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,

Belarus, 220072, Minsk, Surganova str., 13, e-mail: SED@ifoch.bas-net.by

ASSESSMENT OF THE POTENTIAL OF *ARTEMISIA ANNUA* L. AS A SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN BELARUS

Aim. The aim of the work was to assess the composition of biologically active compounds in plants of *Artemisia annua* L. **Methods.** The plants were grown on the experimental plot of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Essential oil from the above-ground mass was isolated by the method of water-steam distillation. To analyze the content of flavonoids and hydroxycinnamic acids, we used the method of quantitative extraction and spectrophotometric determination of the total content of hydroxycinnamic acids in the presence of flavonoids in plant extractive substances, and the method of Folin-Chocalteu was used to determine the content of phenolic compounds. Analysis of the essential oils was performed by GC and NMR. The analysis of the content of phenolic acids in extracts was performed by HPLC. **Results.** The genetic potential of *A. annua* was evaluated under conditions of the central agroclimatic zone of Belarus. The yield and composition of essential oils, the content of phenolic compounds and flavonoids, the composition of phenolic acids were studied. **Conclusions.** *A. annua* in the conditions of the central agroclimatic zone of Belarus contains essential oil, which is dominated by isoartemisia ketone, β-selinene, β-myrcene and camphor. In the above-ground mass phenolic acids including chlorogenic acid and isomers of caffeoylquinic acid were predominant in the composition of phenolic compounds.

Keywords: annual wormwood, essential oil, phenolic compounds, phenolic acids.