

СОСТАВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ *ARTEMISIA ANNUA* L.

¹РЕШЕТНИКОВ Владимир Николаевич, академик, д.б.н.

¹ШУТОВА Анна Геннадьевна, к.б.н., доцент

¹ШИШ Светлана Николаевна

²МАТВЕЕВА Надежда Анатольевна, д.б.н.

²ДРОБОТ Катерина Александровна, аспирант

³ШАБУНЯ Полина Станиславовна, к.б.н.

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Результаты фармакологических исследований полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) характеризуют это растение как перспективный источник для создания новых лекарственных средств с антималярийной, антимикробной, цитотоксической активностью [1]. Начиная с момента открытия уникальных свойств артемизинина различными исследовательскими группами проводится систематическое изучение как отдельных органов растения, так и веществ, синтезируемых эндофитами полыни однолетней. Из полыни однолетней выделено и идентифицировано более 300 природных соединений, среди которых терпеноиды, фенольные, полиацетиленовые соединения, алкалоиды.

Культуру трансгенных («бородатых») корней получают путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации. Такие корни способны к изолированному росту на безгормональной среде и являются перспективным источником ценных биологически активных соединений [2]. В связи с этим, целью данного исследования была оценка состава фенольных соединений «бородатых» корней полыни однолетней в сравнении с растениями, культивируемыми в полевых условиях.

Материалы и методы исследования. Культура трансгенных корней была получена ранее [3] специалистами Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины путем *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации векторами pCB124, и pCB161, которые несли ген интерферона- $\alpha 2b$ человека (*ifn- $\alpha 2b$*) и ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*), а также диким

штаммом *A. rhizogenes* A4. Корни культивировали *in vitro* на протяжении 30 суток при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$ на питательной среде Мурасиге и Скуга с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов. Затем растительный материал подвергался лиофильной сушке и использовался для экстракции 96% этанолом.

Для анализа содержания **флавоноидов и гидроксикоричных кислот** был выбран метод количественного экстракционно–спектрофотометрического определения суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах растений [4]. Для определения общего содержания **фенольных соединений** применяли метод Фолина-Чокальтеу. Для калибровки использовали галловую кислоту в диапазоне концентраций 0,05–0,75 г/л.

Анализ содержания **фенольных кислот** в экстрактах полыни методом ВЭЖХ проводили для спиртовых экстрактов, полученных двукратной экстракцией 96% этанолом. Экстракты полыни переносили в хроматографическую вials и использовали в работе. Для анализа был использован хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным детектором. Разделение компонентов проб проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1×150 мм; 1,8 мкм) при температуре $+40^\circ\text{C}$. 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 минут.

Производные кофейной кислоты были идентифицированы по масс-спектрам, которые содержали характерные ионы $[M+H]^+$ с m/z 517 дикофеоилхинных кислот и с m/z 679 для трикофеоилхинной 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 литературными данными [5].

Результаты исследования. Установлено достаточно высокое содержание фенольных соединений в растениях полыни однолетней, выращенных на опытном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси (табл.1). Для исследованных линий «бородатых» корней содержание фенольных соединений значительно варьировало, максимальное накопление отмечено в линии 6, где синтез фенольных соединений был практически также эффективен, как и у растений в полевых условиях. В результате анализа состава фенольных соединений показано преобладание гидроксикоричных кислот, в то время, как количество флавоноидов как в растениях, так и в культуре трансформированных корней было значительно ниже.

Таблица 1 – Фенольные соединения *A. annua*, мг/г сухого растительного сырья

Образцы экстрактов	Гидроксикоричные кислоты	Флавоноиды	Фенольные соединения
Растения, выращенные в полевых условиях	20,28±1,1	4,5±0,1	28,4±2,7
«Бородатые» корни, линии			
1	11,34±1,8	2,2±0,1	14,8±1,6
2	9,21±0,5	следы	не опр.
3	13,67±2,1	1,1±0,2	13,4±2,0
4	10,49±0,8	следы	9,51±1,3
5	14,94±1,1	0,05±0,1	18,3±2,0
6	23,7±1,6	следы	24,4±4,9

Результаты хроматографического анализа также подтвердили преимущественно наличие гидроксикоричных кислот в спиртовых экстрактах растительного сырья полыни однолетней (табл. 2).

Таблица 2 – Фенольные кислоты растений *Artemisia annua* L.

Образцы экстрактов	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
«Бородатые 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

Публикация содержит результаты исследований, которые были проведены при грантовой поддержке Державного фонду фундаментальних досліджень (ДФФД) Украины и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) в рамках проектов №Ф73/2-2017 (ДФФД) и № Б16К-073 (БРФФИ).

Список использованных источников

1. Коновалов, Д.А. Биологически активные соединения полыни однолетней. Эфирное масло / Д.А. Коновалов, А.А. Хамилонов // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4. – № 4. – С. 4-33.
2. «Косматые» корни растений - важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей / Кулуев Б.Р. [и др.] // Биомика. – 2015. – Т. 7. – № 2 – С. 70-120.
3. Дробот, К.О. Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes*. / Дробот К.О. [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С.117-120.
4. Косман, В.М. Количественное экстракционно–спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Растительные ресурсы. – 2001. – Т. 37, вып. 4. – С. 123-129.
5. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties // S.Bourgou, [et al.] // Food Research International. – 2017. – in press/ doi: 10.1016/j.foodres.2017.06.009