

УДК 615.072

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТОВ  
ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ****<sup>1</sup>Костина А.А., <sup>2</sup>Макиева М.С.**<sup>1</sup>*ГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный медицинский университет»,  
Хабаровск, e-mail: anna-kostina-88@mail.ru;*<sup>2</sup>*ФГБОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова»,  
Владикавказ*

Проведен анализ жидкого экстракта левзеи сафлоровидной, полученного методом полифракционной экстракции с последующей двухфазной экстракцией, выполненной в двух вариантах. Анализ проведен различными физико-химическими методами с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также биологическим методом с использованием культуры клеток *Paramecium caudatum*. В результате работы изучен качественный и количественный состав целевого продукта, в том числе и масляных извлечений, была определена острая токсичность экстрактов, выбраны оптимальные их концентрации для дальнейших испытаний, проверена хроническая токсичность каждой фракции в полученного экстракта, исследовано адаптогенное действие каждой фракции в отношении культуры клеток *Paramecium caudatum*, их влияние на действие клеточных ядов 14% раствора спирта этилового и 3% раствора перекиси водорода.

**Ключевые слова:** левзея, ТСХ, ВЭЖХ, адаптогены**DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND STANDARDIZATION  
OF EXTRACT LEVELI CARTHAMOIDES****<sup>1</sup>Kostina A.A., <sup>2</sup>Makieva M.S.**<sup>1</sup>*Far East State Medical University, Khabarovsk, e-mail: anna-kostina-88@mail.ru;*<sup>2</sup>*North Ossetian State University name after K.L. Khetagurova, Vladicavcaz*

The analysis Rhaponticum carthamoides liquid extract obtained by extraction multifractional followed by a two-phase extraction, performed in two versions. Analysis was performed by various physicochemical methods by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) and a biological method using cell culture *Paramecium caudatum*. As a result of studied qualitative and quantitative composition of the target product, including oil extracts was determined Acute extracts selected optimum concentration for further tests verified chronic toxicity of each fraction in the obtained extract was investigated adaptogenic effect of each fraction in relation to the cell culture *Paramecium caudatum*, their impact on the operation of cellular poisons 14% solution of ethyl alcohol and 3% hydrogen peroxide solution.

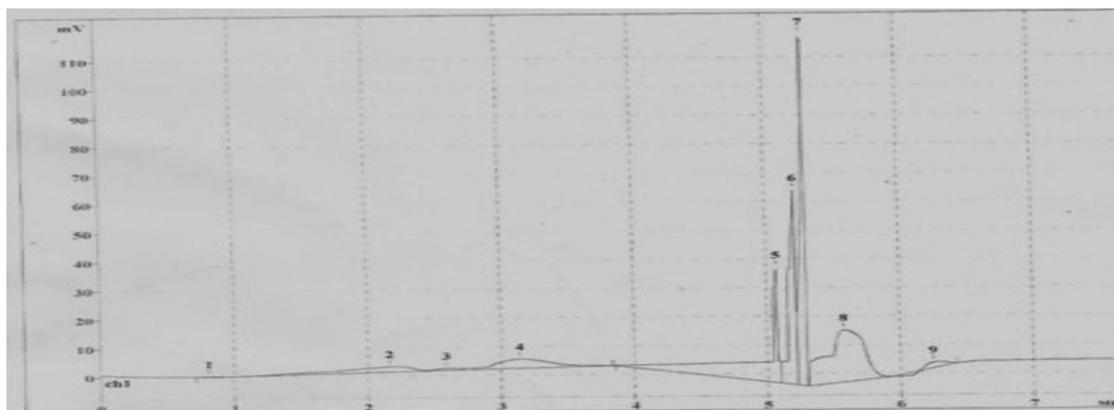
**Keywords:** levzeia, TLC, HPLS, adaptogens

Левзея сафлоровидная – известное, востребованное в медицине растение обладает адаптогенными свойствами, такими же как и у растений группы женьшеня. Это и определяет ее потенциал для медицины, косметологии и других областей использования. Однако, ограниченный ареал произрастания (является эндемиком Западной Сибири), труднодоступность и сложная возобновляемость сырья (сырье – корневище с корнями) затрудняют использование этого растения. Но в настоящее время левзея культивируется, что позволяет расширить спектр ее применения [3, 5]. В косметической промышленности выпускается несколько продуктов, ориентированных на борьбу с признаками старения кожи. Однако, все они являются многокомпонентными составами, в то время как предлагаемое нами средство содержит только извлечение из сырья левзеи сафлоровидной [4]. Что экономически и технологически более выгодно. Поэтому мы предложили технологию получения моноэкстракта левзеи методом

полифракционной экстракции этиловым спиртом различной концентрации в сочетании с двухфазной экстракцией спирт/масло, что позволит наиболее полно извлечь весь спектр действующих веществ данного растения, а также максимально истощить сырье и минимизировать потери действующих и сопутствующих веществ.

Цель работы – провести анализ полученных ранее экстрактов левзеи сафлоровидной различными методами и доказать и наличие у них адаптогенных свойств.

Полученные извлечения были проанализированы методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе хлороформ-спирт этиловый-ацетон в соотношении 6:2:1 с детектированием в УФ-свете [2] и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в системе ацетонитрил-вода-кислота уксусная ледяная в соотношении 50:49:1 с детектированием при длине волны 242 нм. В качестве объекта сравнения в обоих случаях использовали жидкий экстракт левзеи заводского изготовления.



*Хроматограмма спиртового извлечения левзеи на 70% спирте*

На хроматограмме (рисунок) спиртового извлечения левзеи на 70% спирте, полученном предложенным методом, и экстракта полученного в заводских условиях наблюдается совпадение времен выхода пиков. Из рисунка следует, что экстракт, полученный предложенным методом и заводской, идентичны по качественному и количественному составу. ТСХ анализ показал качественную идентичность по составу нашего извлечения на 70% спирте заводскому, а также присутствие экидестероидов и в экстракте, полученном с помощью 40% спирта [2].

Был также проведен эксперимент на живых культурах *Paramecium caudatum* по изучению токсичности полученных экстрактов, а также их способности увеличивать толерантность к клеточным ядам и основной обмен клеток. Инфузории были взяты из естественной среды обитания и выращены в среде Лозина-Лозинского. Для определения всегда брали каплю 0,02 мл, содержащую не менее 5 особей *Paramecium caudatum* и прибавляли к ней эквивалентное количество исследуемого образца. Исследование проводили по методике, предложенной И.Н. Андреевой [1].

При проверке токсичности экстракта, полученного с помощью 40% спирта выяснилось, что прибавление к культуре клеток неразбавленного экстракта вызывает остановку и лизис клеток в течении 1–2 минут, однако, уже в концентрации  $10^{-1}$ , наблюдалось только ускорение или хаотичность движения клеток, затем его замедление, но полной остановки не происходило, таким образом, данная концентрация является пороговой.

Проверка острой токсичности экстракта левзеи сафлоровидной, полученного с помощью 70% спирта показала, что при

прибавлении неразбавленного экстракта к культуре клеток наблюдается остановка и лизис последних в течении одной минуты. При прибавлении этого экстракта, разведенного в десять раз, характер движения инфузорий меняется с первой минуты, наблюдается хаотичность, ускорение или замедление движения с последующей остановкой в течении 8–14 минут, но без лизиса, таким образом, это концентрацию можно считать остановочной. Было сделано повторное десятиное разведение этого экстракта. При прибавлении его к капле среды, содержащей клетки инфузорий наблюдалась хаотичность движений в ходе тридцатиминутного наблюдения остановки не происходило, что свидетельствует о том, что данная концентрация является пороговой.

Для определения токсичности масляных экстрактов получили 10% эмульсию хорошо смешивающуюся с водой. В качестве эмульгатора использовали желатозу в количестве 5% раствора для приготовления 30 г эмульсии. Масляные экстракты, как полученный с помощью Твина 80, так и без него, оказались нетоксичными для культур клеток *Paramecium caudatum*, характер их движения менялся незначительно, в последующем восстанавливался, что можно объяснить, в частности, изменением вязкости среды, не наблюдалось остановки и лизиса инфузорий.

Что касается жидкого экстракта левзеи заводского изготовления, его действие на культуру клеток было аналогично действию извлечения полученного нами с помощью 70% спирта.

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод, что экстракт, полученный с помощью 70% спирта, а также жидкий экстракт левзеи заводского изготовления обладают способностью стимулировать по-

ловое и бесполое размножение инфузорий, так как по сравнению с интактной культурой наблюдается большее количество клеток округлой формы (бесполое размножение), а также мелких клеток овальной формы (половое размножение), кроме того, клетки имели больший размер, чем в интактной культуре, что позволяет сделать вывод о влиянии на метаболизм клеток в целом.

Экстракт, полученный с помощью 40% спирта, также оказывает положительное влияние на половое и бесполое размножение инфузорий, но не влияет на размеры клеток.

Извлечение, изготовленное с помощью 20% спирта в очень малой степени оказывает влияние на размножение клеток инфузорий, преимущественно на половое, и не оказывает влияния на размер клеток. Полученные результаты могут быть объяснены тем, что извлечение получалось последовательно сначала 70% спиртом, затем 40% и 20% спиртом соответственно, таким образом, каждый последующий экстрагент контактировал с частично истощенным сырьем, так как, согласно литературным данным [6], экистероиды способны экстрагироваться спиртом любой из вышеперечисленных концентраций, то, можно предположить, что содержание этих соединений в каждом последующем извлечении снижалось, а соответственно понижается степень присущей им активности, т.е. способности влиять на скорость и характер размножения инфузорий в культуре клеток, а также их конечный размер.

Что касается культур, содержащих спирт в соответствующем разведении и служащих в качестве объекта сравнения, в них не выявлено отличий в размере и скорости размножения клеток по сравнению с интактной культурой.

При изучении действия масляного экстракта, полученного с помощью Твина 80, и масляно-спиртового извлечения, полученного при перемешивании без добавления поверхностноактивных веществ в качестве стандарта, кроме интактной культуры, было решено использовать культуру, содержащую масло, которое служило экстрагентом для получения извлечений, в соответствующем разведении. Для приготовления эмульсий использовали 5% раствор желатозы. Культура, содержащая масло, по своим параметрам на протяжении всего времени эксперимента не отличалась от интактной культуры, что дает основания полагать, что само по себе подсолнечное масло не оказывает влияния на метаболические процессы в клетках инфузорий и на скорость их размножения.

В отношении масляного экстракта, полученного с использованием поверхностно-активного вещества, наблюдения показали следующие результаты: по сравнению с интактной культурой увеличилось количество клеток, причем в равной степени как округлой, так и мелких овальной формы, таким образом, извлечение в равной степени стимулирует оба вида размножения инфузорий, однако не влияет на их размер.

В свою очередь, проба, содержащая совместно масляный экстракт и извлечение, полученное с помощью 20% спирта, в большей степени, чем первое влияло на скорость и характер размножения инфузорий, но также не влияло на их размер. Это отличие можно объяснить тем, что вторая культура содержала кроме масляного, также и спиртовое извлечение, поэтому эффекты их суммировались.

Завершающим этапом эксперимента была проверка способности полученных экстрактов увеличивать толерантность культуры *Paramecium caudatum* к действию клеточных ядов. В качестве ядов выбрали 3% раствор перекиси водорода и 14% раствор спирта этилового. Сначала определяли чувствительность к ним интактных клеток. Для этого к капле 0,02 мл культуры, содержащей не менее 5 клеток добавляли 3% раствор перекиси водорода и 14% раствор спирта в эквивалентном количестве и проводили десятикратное разведение этих растворов до получения пороговой концентрации. При прибавлении к среде неразведенного 3% раствора перекиси водорода, наблюдался лизис клеток в течении 1–2 минут, при разведении этого раствора до концентрации  $10^{-1}$  в течении 1–3 минут – замедление движения клеток, остановка и лизис в течении 5–7 минут, т.е. эта концентрация для интактной культуры является лизирующей. В дальнейшем получали дважды десятичное разведение 3% перекиси водорода и концентрация ее в растворе соответственно  $10^{-2}$  – в течении 3 минут движение стало быстрее, затем в течении 5–6 минут – замедление движения и полная остановка в течении 7–10 минут, но лизиса не наблюдается – остановочная концентрация. При концентрации исследуемого раствора  $10^{-3}$  – хаотичное движение клеток инфузорий, либо убыстрение этого движения, но не наблюдалось остановки – пороговая концентрация. Аналогично был проведен опыт по установлению пороговой концентрации 14% раствора этилового спирта, установлено: неразбавленный раствор вызывает лизис инфузорий в течении 5 минут, а его десятичное разведение является пороговой концентрацией. В дальнейшем опыт

проводился по методике, предложенной И.Н. Андреевой [1], делали серию исследуемых образцов путем прибавления к интактной культуре спиртовых и эмульсий масляных экстрактов, полученных ранее, а также жидкого экстракта левзеи заводского изготовления, спиртов соответствующих концентраций и эмульсий масла в концентрации равном 0,5 пороговой концентрации. Наблюдение вели в течении 10 дней, начиная с 24 часов.

Для культур, содержащих извлечение, полученное с помощью 70% спирта нами, а также заводское извлечение уже на третий день наблюдались явные изменения, при прибавлении 3% раствора перекиси водорода в его пороговой концентрации движение клеток либо не изменяется совсем, либо убыстряется, однако, в течении в среднем 3 минут нормализуется. При прибавлении этого раствора в концентрации  $10^{-2}$  остановка наблюдается по истечении 20–30 минут, до этого движение клеток хаотичное. 3% раствор перекиси водорода в концентрации  $10^{-1}$  – наблюдается хаотичное движение клеток, замедляющееся через 1–6 минут, до полной остановки, но не наблюдается лизиса клеток. На 5 день при прибавлении пороговой концентрации перекиси водорода движение инфузорий не меняется в течении 30 минут. Это свидетельствует о повышении резистентности культуры клеток инфузорий к действию 3% раствора перекиси водорода под действием извлечения из корневищ с корнями левзеи сафлоровидной. Толерантность к 14% раствору этилового спирта также повысилась, так на 9 день эксперимента при прибавлении пороговой концентрации этого раствора к культуре клеток не наблюдалось изменение их движения, а при прибавлении неразбавленного раствора наблюдалось изменение характера движения клеток, однако в течении 30 минут не последовало их остановки и лизиса.

Что касается культуры клеток, содержащей экстракт, полученный с помощью 40% спирта, то ее устойчивость к перекиси водорода аналогична предыдущему опыту, однако устойчивость к 14% раствору этилового спирта аналогична интактной культуре на протяжении всего времени эксперимента.

Культура клеток, содержащая извлечение, полученное с помощью 20% спирта имела следующие результаты: на 3 день эксперимента – устойчивость к 3% раствору перекиси водорода аналогична опыту № 1, на 6 день при прибавлении пороговой концентрации перекиси движение клеток замедляется в течении 3–10 минут, в осталь-

ном остальном аналогична третьему дню эксперимента. При прибавлении 14% раствора спирта в пороговой концентрации движение инфузорий не изменяется в течении 30 минут, при добавлении неразбавленного 14% раствора спирта этилового хаотичное движение сменяется постепенной остановкой в течении 30 минут. Повышение устойчивости к раствору спирта этилового по сравнению с предыдущим опытом, возможно, обусловлено сопутствующими веществами нестероидной природы.

Культура клеток, содержащая масляный экстракт, полученный с помощью Твина 80 как и культура клеток, содержащая масляно-спиртовой экстракт проявляет резистентность к клеточным ядам, аналогичную культуре клеток, содержащей экстракт, полученный с помощью 20% спирта. Таким образом в данном опыте свойства масляного извлечения не суммируются со свойствами спиртового.

### Заключение

Таким образом, впервые был получен экстракт левзеи с использованием полифракционного метода экстракции, что позволяет предположить технолого-экономическую эффективность продукта. Установлен качественный и количественный состав экстракта и показано, что он в основном, соответствует традиционному жидкому экстракту заводского изготовления.

Проведено биологическое тестирование экстракта с помощью культуры клеток *Paramecium caudatum* оказалось, что все промежуточные фракции экстракта обладают адаптогенными свойствами.

### Список литературы

1. Андреева И.Н. Теоретическое и экспериментальное обоснование создания скорректированных и трансдермальных лекарственных и парафармацевтических систем для коррекции процессов адаптации в организме: дисс.... доктора фарм. наук: – Пенза, 2000. – С. 64–77.
2. Костина А.А., Степанова Э.Ф., Курегян А.Г. Разработка технологии и анализ полифракционного экстракта левзеи сафлоровидной // Успехи современного естествознания – 2013 – № 11. – С. 133–135.
3. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: учебник. – 4 – е изд. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
4. Официальный сайт Роспатента [Электронный документ]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru/cdfi/Fips2009.dll/Query> (дата обращения 04.05.2014).
5. Тимофеев Н.П. Биологические основы промышленного возделывания левзеи сафлоровидной и серпухи венценостной в агроценозе // Эколого-популяционный анализ популярных растений: интродукция, воспроизводство, использование. – Коми НЦ Уро РАН. – Сыктывкар, 2008. – С. 194–196.
6. Тимофеев Н.П., Лапин А.А., Зеленков В.Н. Оценка качества лекарственного сырья левзеи сафлоровидной методом бромной антиокислительной емкости // Бултеровские сообщения. – 2006. – Том 8. – С. 35–40.