

О ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АЛКАЛОИДА ЛАППАКОНИТИНА В ЗАГОТОВЛЕННЫХ НА СТАДИИ КОНЦА ВЕГЕТАЦИИ КОРНЕВИЩАХ *ACONITUM SEPTENTRIONALE* KOELLE

©2012 Н.И. Федоров¹, Я.О. Гуркова¹, О.И. Михайленко², Г.С. Абдурахимова³

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

²Уфимский государственный нефтяной технический университет, г. Уфа

³Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 07.06.2013

Выявлена возможность использования активации ростовых процессов в заготовленных на стадии конца вегетации корневищах *Aconitum septentrionale* Koelle для повышения на 30% содержания в них алкалоида лаппаконитина — действующего вещества антиаритмического препарата «Аллапинин».

Ключевые слова: лекарственные растения, растительное сырье, Южный Урал.

Корневища вида *Aconitum septentrionale* Koelle — перспективный источник сырья для производства антиаритмического препарата «Аллапинин» [1]. Содержание в них алкалоида лаппаконитина — действующего вещества этого препарата — бывает наиболее высоким во время интенсивного роста растений в начале вегетации, в течение всего 15-20 дней [1,2]. На ряде алкалоидоносных видов С.М. Соколовой с соавт. [3] была показана принципиальная возможность влиять различными режимами послепосевной обработки на содержание алкалоидов в надземной части растений. В связи с этим возникла идея использовать активацию ростовых процессов в корневищах растений *A. septentrionale*, собранных на стадии конца вегетации, для повышения содержания в них лаппаконитина. Цель сообщения — анализ возможности повышения содержания алкалоида лаппаконитина в собранных в конце вегетации корневищах *A. septentrionale* путем послепосевной обработки стимуляторами роста и ее влияния на содержание в корневищах суммы свободных аминокислот, отражающих интенсивность процессов метаболизма в растениях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материала для опытов использовали корневища генеративных растений *A. septentrionale*, собранные в середине сентября 2010 г., на стадии завершения вегетации растений этого вида в разреженном липняке снытевом в Уфимском районе Республики Башкортостан. Опыты проводили в четырех вариантах: контроль (измельченные и высушенные свежесобранные корневища), замачивание корневищ на 24 ч в воде и в растворах двух стимуляторов роста растений — индолил-3-уксусной кислоты (препарат «Гетероауксин») и 4-(индол-3-ил)масляной кислоты ("Корень Супер").

Федоров Николай Иванович, д.б.н., зав. лабораторией, e-mail: fedorov@anrb.ru; Гуркова Яна Олеговна, младший научный сотрудник, e-mail: grkv2@yandex.ru; Михайленко Оксана Ивановна, к.х.н., доцент, e-mail: trioksan@mail.ru; Абдурахимова Гульназ Салаватовна, младший научный сотрудник, e-mail: gulnas_22@mail.ru

В каждом из вариантов опыта было три повторности, в которых использовано по 20 корневищ примерно одинакового размера. После обработки корневища раскладывали на поддонах, накрывали полиэтиленом во избежание высыхания и оставляли при температуре 20°C до появления признаков усиления ростовых процессов. Через четверо суток на некоторых корневищах было отмечено набухание почек надземных побегов, и опыт был завершен. Корни были разрезаны на кусочки размером 1-1,5 см, высушены до воздушно-сухого состояния и измельчены до размера частиц 1 мм. Далее в усредненных по повторностям опыта образцах корневищ определяли содержание лаппаконитина и суммы свободных аминокислот.

Сумму алкалоидов из растений извлекали методом исчерпывающей экстракции [4]. Для анализа на содержание суммы алкалоидов брали воздушно-сухие измельченные образцы весом 50,00 г. В качестве экстрагента использовали 70%-ный водный ацетон. Экстракцию повторяли до полного извлечения алкалоидов. Полнота экстракции проверялась качественной реакцией на алкалоиды с кремневольфрамовой кислотой. Водный экстракт подкисляли до pH=3-5%-ным раствором серной кислоты. Объединенный экстракт отфильтровывали на воронке Бюхнера, на роторном испарителе отгоняли растворитель. Водные извлечения подкисляли 3%-ным раствором серной кислоты до pH=3, экстрагировали из них дихлорэтаном органические соединения неалкалоидного характера, а водный раствор, содержащий алкалоиды, подщелачивали до pH=9-12 карбонатом натрия или аммиаком. Далее алкалоиды исчерпывающе экстрагировали дихлорэтаном и высушивали с помощью безводного сульфата натрия. Органический растворитель отгоняли на роторном испарителе. Остаток растворителя из образцов откачивали на высоковакуумном насосе. Доведенный до постоянного веса образец взвешивали на аналитических весах.

Содержание лаппаконитина определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Waters Breeze с двухволновым спектрофотометрическим детектором. Для

анализа применяли колонку Exsil Amino (250×4,6 мм, размер частиц 5 мк). В качестве подвижной фазы использовали изопропиловый спирт, скорость потока 1мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 254 нм.

Свободные аминокислоты извлекали из воздушно-сухого сырья 70%-ным этиловым спиртом. Состав и количественное содержание аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе Т-339М в системе литиевых буферов. Упаренный экстракт разводили в цитрат-литиевом буфере (рН=2,2) и наносили на ионообменную колонку. Идентификацию и количественное содержание свободных аминокислот в исследуемых образцах проводили по результатам разделения стандартной смеси аминокислот. Во всех случаях рассчитывали средние значения из трех биологических и трех аналитических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведено содержание свободных аминокислот и лаппаконитина в различных вариантах опыта. Из таблицы видно, что сумма свободных аминокислот в корневищах в вариантах опыта после замачивания в воде и в растворах стимуляторов роста была выше, чем в контроле. Это свидетельствует об усилении ростовых процессов в корневищах и, прежде всего, в расположенных на них почках, из которых будут формироваться побеги следующего года. В сумме свободных аминокислот преобладал аргинин, который во всех вариантах обработки был несколько ниже, чем в контроле. В сумме аминокислот аргинин обычно преобладает в зимний период относительного покоя, и его содержание снижается в 5-6 раз при начале роста надземных побегов [5]. У зимующих растений аргинин играет роль в защите клеточных мембран от повреждения морозом [6]. Есть предположение, что аргинин может приостанавливать гидролиз белков [7], и тем самым способствовать их стабилизации, повышая морозостойкость растения [8].

Во время подготовки к активному росту надземных побегов в корневищах *A. septentrionale* в сумме аминокислот преобладают аспарагин и глутамин, которые являются основными запасными и транспортными формами азота в тканях растений. В вариантах опыта их содержание увеличилось по

сравнению с контролем, но было ниже, чем бывает в период начала сезонного развития надземных побегов [5]. Содержание глутамина было большим, чем аспарагина, что характерно для хорошего обеспечения растений углеводами [9]. В обработанных корневищах также увеличилось содержание γ -аминомасляной кислоты, участвующей в регуляции роста и развития растений и являющейся временным депо азота [10], и глутаминовой кислоты, которая создает основу углеродного скелета для ряда белковых и небелковых аминокислот, в том числе глутамина, аргинина и пролина [11].

Таким образом, анализ содержания суммы свободных аминокислот в корневищах позволяет сделать вывод о некоторой активации ростовых процессов в обработанных корневищах, которые, однако, были намного слабее, чем весной перед началом формирования надземных побегов.

Лаппаконитин – алкалоид, содержание которого тесно коррелирует с интенсивностью ростовых процессов [2]. Его содержание в корневищах было выше в вариантах с замачиванием водой и обработкой 4-(индол-3-ил)масляной кислотой. В варианте с обработкой гетероауксином существенного увеличения содержания лаппаконитина по сравнению с контролем не наблюдалось. Последнее, возможно, связано с неверно подобранной концентрацией, так как при обработке гетероауксином передозировка препарата может приводить даже к замедлению роста растений. Таким образом, замачивание на 24 ч как в воде так и в растворе 4-(индол-3-ил)масляной кислоты спровоцировало активацию ростовых процессов и увеличение содержания лаппаконитина в собранных на стадии конца вегетации корневищах *A. septentrionale*. Для использования выявленных закономерностей при создании метода послеуборочного повышения содержания лаппаконитина в корневищах этого вида необходима оптимизация времени их замачивания и выдерживания после замачивания в тепле перед измельчением.

В зависимости от погодных условий конец вегетации *A. septentrionale* наступает в период от двадцатых чисел августа до середины сентября и, таким образом, используя послеуборочную обработку, можно заготавливать корневища этого вида с высоким содержанием лаппаконитина еще в течение как минимум месяца.

Таблица. Влияние послеуборочной обработки корневищ *Aconitum septentrionale* на содержание в них свободных аминокислот и алкалоида лаппаконитина

Аминокислоты и лаппаконитин	Содержание свободных аминокислот и лаппаконитина, мг/г от сухой массы			
	Контроль	Вода	4-(индол-3-ил) масляная кислота	индоллил-3-уксусная кислота
Аспарагиновая кислота	0,11	0,12	0,17	0,19
Треонин	0,03	0,08	0,06	0,07
Серин	0,02	0,17	0,20	0,13
Аспарагин	0,40	0,84	0,77	0,65
Глутаминовая кислота	0,83	1,87	1,60	1,46

Глутамин	2,84	5,78	5,48	5,58
Пролин	0,24	0,51	0,65	0,46
Глицин	0,01	0,01	0,02	0,01
Аланин	0,44	0,58	0,52	0,52
Валин	0,09	0,13	0,14	0,11
Цистин	следы	следы	следы	следы
Метионин	0,00	0,01	0,01	0,01
Изолейцин	0,04	0,07	0,04	0,06
Лейцин	0,04	0,07	0,05	0,04
Тирозин	0,06	0,11	0,09	0,11
Фенилаланин	0,06	0,09	0,08	0,07
γ-аминомасляная кислота	1,17	1,74	1,89	1,89
Лизин	0,14	0,20	0,18	0,21
Гистидин	0,19	0,37	0,38	0,36
Аргинин	23,34	21,36	21,00	21,53
Сумма аминокислот	30,04	34,10	33,32	33,44
Лаппаконитин	6,60	9,37	8,64	6,97

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федоров Н.И., Мартынов Н.А., Никитина В.С., Иибурдина Л.М. Содержание алкалоида лаппаконитина в подземной и надземной частях *Aconitum septentrionale* Koelle в растительных сообществах Башкирии // Раст. ресурсы. 1996. Т. 32. Вып. 3. С. 96-101.
2. Федоров Н.И. *Aconitum* L. и *Delphinium* L. на Южном Урале: внутривидовая структура, закономерности содержания алкалоидов, оптимизация ресурсного использования: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Уфа, 2006. 45 с.
3. Соколова С.М., Ловкова М.Я., Бузук Г.Н. Повышение ресурсного потенциала лекарственных растений // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами: Сб. научн. статей. М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. С. 395-400.
4. Степаненко Б.Н. Органическая химия. М.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1957. 411 с.
5. Лугманова М.Р., Шендель Г.В., Федоров Н.И., Михайленко О.И. Сезонная динамика содержания свободных аминокислот и суммы алкалоидов в *Aconitum septentrionale* (Ranunculaceae) и *Euonymus verrucosa* (Celastraceae) // Раст. ресурсы. 2010. Вып. 4. С. 96-103.
6. Sagisaka S., Araki T. Amino acid pools in perennial plants at the wintering stage and at the beginning of growth // Plant, Cell Physiol. 1983. V. 24. P. 479-494.
7. Shibacka H., Thimann D.V. Antagonism between kinetin and amino acids: Experiments on the mode of cytokinins // Plant Physiol. 1970. V. 46. N 1. P. 79-94.
8. Durzan D.J. Nitrogen metabolism of *Picea glauca*. III. Diurnal changes of amino acids, amides, protein, and chlorophyll in leaves of expanding buds // Can. J. Bot. 1968. V. 46. P. 929-937.
9. Благовещенский А.В. Биохимия обмена азотистых веществ у растений. М., Изд-во АН СССР, 1958. 346 с.
10. Kathiresan A., Tung P., Chinnappa C.C., Reid D.M. Gamma-aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower // Plant Physiology. 1997. V. 115. N 1. P. 129-135.
11. Брей С.М. Азотный обмен в растениях. М.: Агропромиздат, 1986. 200 с.

ON THE POSSIBILITY OF INCREASING THE CONTENT OF ALKALOID LAPPACONITINE IN RHIZOMES *ACONITUM SEPTENTRIONALE* KOELLE HARVESTED AT THE STAGE OF THE END OF GROWING SEASON

©2012 N.I. Fedorov¹, J.O. Gurkova¹, O.I. Mihaylenko², G.S. Abdurachimova³

¹Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

²Ufa State Petroleum Technological University, Ufa

³Institute of Organic Chemistry, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

The possibility of using the activation of growth processes in the rhizomes of *Aconitum septentrionale* Koelle harvested at the stage of the end of growing season. The activation of the growth of the rhizomes can improve the content of alkaloid lappaconitine (the active ingredient of anti-arrhythmic drug "Allapinin") up to 30 percent.

Key words: medicinal plants, plant raw material, Southern Urals.

Nikolay Fedorov, Doctor of Biology, head of laboratory, e-mail: fedorov@anrb.ru; Jana Gurkova, junior researcher, e-mail: grkv2@yandex.ru; Oksana Mihaylenko, Candidate of Chemistry, associate professor, e-mail: trioksan@mail.ru; Gulnas Abdurachimova, junior researcher, e-mail: gulnas_22@mail.ru