

МХИ РОДА *SPHAGNUM* (*S. ANGUSTIFOLIUM*, *S. MAGELLANICUM*): ВЭЖХ-АНАЛИЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИХ КОМПОНЕНТОВ

В. В. Карпук¹, Е. А. Андрейченко², Е. Г. Попов³, В. В. Титок⁴

¹Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь, VKarpuk@tut.by

²Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь, lizaa32@yandex.by

³Центральный ботанический сад НАН Беларуси
Минск, Беларусь, e.popoff@cbg.org.by

⁴Центральный ботанический сад НАН Беларуси
Минск, Беларусь, V.Titok@cbg.org.by

Методом ВЭЖХ проведен экспресс-анализ компонентного состава водно-этанольных экстрактов мхов рода *Sphagnum* – *S. angustifolium* (C.E.O. Jensen ex Russow) C.E.O. Jensen и *S. magellanicum* Brid., собранных на территории Республики Беларусь в Березинском биосферном заповеднике. В работе выявлено более пятидесяти субстанций, ~ 80 % из которых идентифицировано и оценено на предмет их биоактивности в отношении теплокровных. Сделан вывод о существенном фармакологическом потенциале сфагновых мхов и возможности использования их как продуцентов веществ (в том числе в культуре *in vitro*), востребованных в медицинской промышленности для разработки рецептур новых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *Sphagnum angustifolium*; *S. magellanicum*; ВЭЖХ; фармактивность

MOSSES OF GENUS *SPHAGNUM* (*S. ANGUSTIFOLIUM*, *S. MAGELLANICUM*): HPLC-ANALYSIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THEIR COMPONENTS

V.V. Karpuk¹, L.A. Andreichanka², E.H. Popoff³, V.V. Titok⁴

^{1,2} Belarusian State University, Minsk, Belarus. Corresponding author: V.V. Karpuk (VKarpuk@tut.by)

^{3,4} Central Botanical Garden, Natl. Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

The HPLC component analysis of *Sphagnum* mosses – *S. angustifolium* (C.E.O. Jensen ex Russow) of C.E.O. Jensen and *S. magellanicum* Brid. was made. Objects were collected in the territory of Berezinsky Biosphere Reserve. As result in them more than fifty substances were revealed, identified and estimated regarding their bioactivity. The conclusion is drawn on essential pharmacological potential the mosses and a possibility of their use as producers of valuable substances (including *in vitro* culture) demanded in the industry for development of new medicines.

Key words: *Sphagnum angustifolium*; *S. magellanicum*; HPLC; pharmacoactivity

Род *Sphagnum* является своеобразным родом семейства Сфагновые (*Sphagnaceae* Dumort., 1829), в виду того, что ему "удалось освоить" все части света, однако наиболее широко он распространён в умеренной зоне Северного полушария и представлен у нас в Беларуси 34 видами. Хотя его и относят к высшим растениям, но корней у него нет. Использование сфагновых мхов в народной медицине общеизвестно и насчитывает не одно тысячелетие, однако подробное изучение компонентного биохимического состава стало возможным лишь сравнительно недавно с внедрением высокоточных методов тонкослойной, газовой и жидкостной хроматографии особенно с масс-спектроскопической регистрацией разделяемых веществ [1-3]. Многие из этих биологически активных веществ (БАВ) весьма

интересны с фармакологической и терапевтической точек зрения [4,5]. Следовательно, весьма актуально изучение местных для нашей республики видов сфагновых мхов на предмет их биохимического состава, что позволит провести оценку пригодности лекарственного растительного сырья (ЛРС) их аборигенных представителей для фармако-индустрии, чтоб в будущем избежать зависимости от импортирования производимых из *Sphagnum* препаратов. В этой связи нами была поставлена **цель исследования** – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) провести качественный анализ состава этанольно-водных экстрактов из биомассы сфагновых мхов и кратко оценить (по имеющимся в литературе данным) их фармакологические активности. В качестве **объектов исследования** выбраны мхи *Sphagnum angustifolium* (С.Е.О. Jensen ex Russow) С.Е.О. Jensen и *S. magellanicum* Brid., выросшие и собранные на территории Республики Беларусь в Березинском биосферном заповеднике.

Приготовление проб для анализа осуществляли согласно общепринятому подходу. Собранную в 2019 г. и высушенную биомассу мха взвешивали в повторностях по 0,5 г, измельчали, перемалывали (6 мин при 25000 об/мин на лабораторной мельнице IKA Tube Mill [IKA Werke, ФРГ]), помещали в стеклянные пробирки со шлифом и из неё делали извлечение 30 мл экстрагента (этанол [70%], H₂O [30%]); экстракцию вели в герметичных условиях при 18°C в течение 48 ч с периодическим встряхиванием. Одноименные пробы хранили в темноте герметично при 0...4°C до ВЭЖХ-анализа.

Анализ компонентного состава экстрактов проводили методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1260 (Agilent, США). Отбор проб осуществлялся автосэмплером. Предварительно экстракты центрифугировали (20000 g, 10 мин, 4°C) и пропускали через 0,2 мкм фильтры PTFE (Agilent, ФРГ), затем вносили в вials и герметично закрывали крышками. Анализ компонентов экстрактов с использованием идентификационных калибровочных внутренних стандартов (ВС) проводили на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, США) в градиентном режиме по стандартной методике обращённо-фазовой хроматографии в оптимизации, кратко: инъекционный объем проб = 10 мкл, температура колонки 25°C, скорость 0,5 мл/мин, элюенты с добавлением муравьиной кислоты (5 мл/л) – вода : ацетонитрил от 90 : 10 в начале цикла (0') → до 5 : 95 к окончанию цикла (30') [6]. Регистрация компонентов велась при λ 272 нм (против λ 560 нм), диодно-матричным детектором DAD G4212B (Agilent, США) в milli Absorbance Units [mAU]. Обработка данных проводилась по программе Agilent OpenLAB CDS ChemStation.

Методом обращённой ВЭЖХ в водно-этанольных экстрактах *S. angustifolium* и *S. magellanicum* выявлены более полусотни компонентов, из них идентифицировано 41 (рис. 1), которые относятся к следующим группам веществ:

→ органические кислоты (аминокислоты [аланин, аргинин, глутаминовая кислота, аспарагин, валин, лейцин, триптофан, фенилаланин, etc.], высшие жирные [пальмитиновая, α -линоленовая, линолевая, etc.], фенольные [сфагновая {основа сфагнола}, 4-гидроксibenзойная, дегидроабietовая, 2-гидроксibenзойная {салициловая}, 3-метокси-4-гидроксibenзойная, кумаровая, феруловая]);

→ лактоны, в том числе кумарины (γ -гидроксibутенолид, эскулетин, умбеллиферон, 7,8-дигидроксibензо-5-метоксикумарин-7 β -софорозид [ДМКС, рис. 1 № 12]);

→ кетоны (p-гидроксiacетoфенон);

→ дитерпены (дегидроабиетовая к-та, фитол {входящий в состав хлорофилла ациклический дитерпеновый спирт, см. рис. 1 № 20});

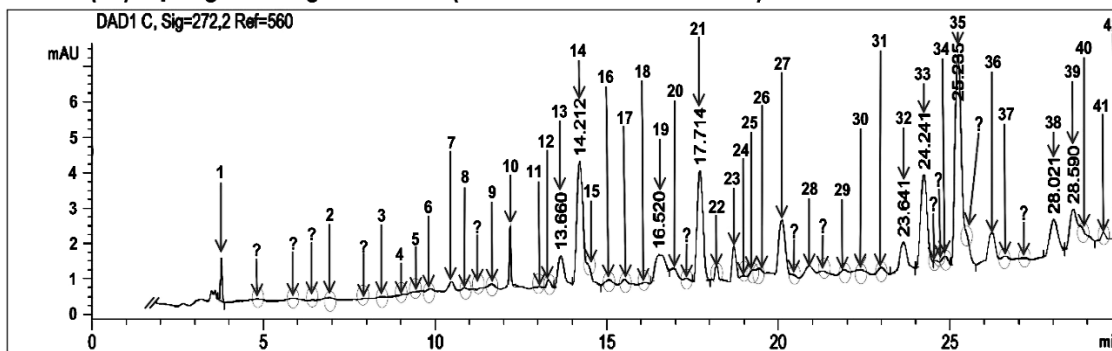
→ тритерпены, в том числе фитостероиды (α -амирин, 2 α -гидрокси-урсоловая кислота, кампестерин, β -ситостерин, сфагнорубин А, уваол, циклоартенол, эргостерин);

→ флавоноиды (кверцетин, апигенин, нарингенин [у *S. magellanicum* идентифицирован впервые], 6-метилапигенин, 6-метилальпинон).

Также детектированы неофитадиев (ациклический непредельный углеводород с одной С=С-связью, № 16) и сквален {каротиноподобный углеводород тритерпенового ряда, рис. 1 № 25}. Многие из веществ экстрагированы в следовых количествах.

Сравнительный анализ хроматограмм *S. angustifolium* (рис.1, а) и *S. magellanicum* (рис.1, б) показал их принципиальное сходство, однако концентрации некоторых компонентов существенно отличались. Например, эскулетин, γ -

(а) *Sphagnum angustifolium* (C.E.O. Jensen ex Russow) C.E.O. Jensen



(б) *Sphagnum magellanicum* Brid.

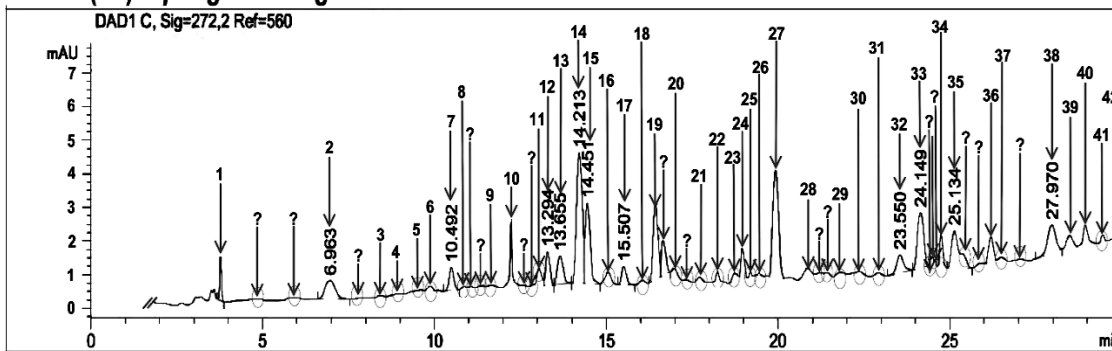


Рисунок 1 – ВЭЖХ извлечений из биомассы сфагновых мхов. Обозначения:

1: этанол; 2: эскулетин; 3: умбеллиферон; 4: *p*-гидроксibenзойная к-та; 5: метил-4-гидроксibenзоат; 6: 3-метокси-4-гидроксibenзойная к-та; 7: *p*-гидроксiacетoфeнон; 8: *tr-p*-кумаровая к-та; 9: феруловая к-та; 10: ванилин (BC1); 11: γ -гидроксibутeнолид; 12: 7,8-дигидроксi-5-метоксикумарин-7 β -софорозид; 13: сфагновая кислота; 14: 2 α -гидроксi-урсоловая к-та; 15: α -линоленовая; 16: неофитадиев; 17: сфагнорубин А; 18: салициловая к-та; 19: пальмитиновая к-та; 20: фитол; 21: линолевая; 22: кверцетин; 23: нарингенин; 24: дегидроабиетовая к-та; 25: сквален; 26: уваол; 27: апигенин (BC2); 28: 6-метилальпинон; 29: α -амирин; 30: циклоартенол; 31: эргостерин; 32: кампестерин; 33: аланин; 34: глутаминовая к-та; 35: валин; 36: лейцин; 37: 6-метилапигенин; 38: β -ситостерин; 39: аспарагин; 40: фенилаланин; 41: аргинин; 42: триптофан; ? : не идентифицировано.

гидроксibутeнолид в заметном количестве зафиксированы только у *S. magellanicum*, то время как нарингенин в большей концентрации наличествовал

у *S. angustifolium*. Видовые различия обнаружились и по содержанию аминокислот, а также высших жирных кислот (рис. 1, а, б). В то же время общие количества компаундов в экстрактах обоих сфагнумов были примерно равны (640.88 mAU*s и 595.03 mAU*s соответственно у *S. magellanicum* и *S. angustifolium*). Доли идентифицированных компонентов в экстракте *S. angustifolium* составили ~76 %, в экстракте *S. magellanicum* ~70 %. Выявленный нами и другими авторами [1,5] химический состав сфагновых мхов сложен, и трудно назвать хоть одну субстанцию, уникально присущую (специфичную) для того или иного их вида, да ещё и такую, на которую не влияло бы воздействие условий окружающей среды. Не оправдали себя для целей хемосистематики *Sphagnum*, например, попытки использовать такие вторичные их метаболиты, как фитостерины. На современном этапе знаний стабильные биомаркеры видовой принадлежности сфагнумов ещё не определены – это дело будущих исследований, и, возможно, их отыщут среди веществ тритерпеновой группы. Из кумаринов (бензо- α -пиранов), кроме умбеллиферона и эскулетина сфагнумы продуцируют также герниарин, дикумарин, скополетин, и их производные [2]). Набор флавоноидов, синтезируемых сфагновыми мхами можно дополнить такими как альпинон-3-ацетат, хризозериол, 6-метилтектохризин и др. Из фенольных кислот для сфагновых мхов, помимо упомянутых выше, в "гамме" характерны ванильная, изохлорогеновая, кофейная, сиреневая, пирокатехиновая, протокатеховая, р-метоксикоричная, хлорогеновая, а также такие как дегидроабиетовая, пимаровая и глюкуроновая кислота (её полимеры входят в состав оболочек клеточных стенок) и другие [6,7,8]. Ориентировочные оценки выхода экстрактивных веществ из сфагнума (% от массы абсолютно-сухого ЛРС) составляет $\sim 6,06 \pm 0,30$; при этом для флавоноидов $\sim 0,04 \pm 0,01$; для кумаринов $\sim 0,02 \pm 0,01$; для фенолкарбоновых к-т $\sim 0,16 \pm 0,01$ [5]. Следует, тем не менее указать, что выход общего количества извлекаемых из сфагнумов экстрактивных веществ зависит от времени (сезона года, когда заготавливается растительный материал) [9].

Отметим потенциальные активности БАВ, синтезируемых сфагновыми мхами, которые с нашей точки зрения имеют **практическое значение для фармацевтики** [5].

Бензойные фенольные кислоты – салициловая (2-оксибензойная) и р-гидроксibenзойная – обладают антисептическими и противовоспалительными свойствами; ванильная (4-гидрокси-3-метоксибензойная) – проявляет антибактериальную, противогрибковую, противоглистную и противовоспалительную активность, а её производное – ванилин – помимо широко известных свойств, обладает активностью, которая может быть использована в медицине для лечения псориаза [5]. Дитерпеноиды – **абиетовая** кислота и её производные (**дегидроабиетовая, пимаровая**) – обладают антимикробным действием, селективно ингибируют пролиферацию раковых клеток [5]. Сфагнол – напоминающая дёготь выделяемая из мха смесь полифенолов и их гликозидов с количественным преобладанием **сфагновой** (р-гидрокси- β -карбоксиметил-коричной) кислоты, а поскольку технологическая и фармакологическая стандартизация сфагнола отсутствует, то и сам он в официальной медицине обычно не используется [10].

Результаты исследования показывают, что мобилизация ресурса *S. angustifolium* и *S. magellanicum* как продуцентов (в том числе в культуре биореакторов *in vitro*) сырьевого материала [11], востребованного отечественной

медицинской промышленностью для производства новых импортзамещающих лекарственных препаратов очень актуальна.

Библиографические ссылки

1. Подтероб А.П., Зубец Е.В. История применения растений рода *Sphagnum* в медицине // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36, № 4. Р. 27–29.
2. Matei A.O., Gatea F., Radu G.L. Analysis of phenolic compounds in some medicinal herbs by LC-MS // J. Chromatograph. Sci. 2015. Vol. 53, № 7. P. 1147–1154.
3. Фармакологический потенциал растения железница иссополистная (*Sideritis hyssopifolia* L.) из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси / Попов Е.Г. [и др.] // Вестник Фонда фундаментальн. исследований. 2019. № 4. С. 76–81.
4. Карпук В.В. Фармакогнозия: Учебник: для студ. ВУЗов биологических специальностей. МО РБ. Минск: БГУ, 2011.
5. Дмитрук В.Н. Сравнительное фармакогностическое исследование растений рода *Sphagnum* и перспективы их использования: автореф. дис. ... канд. фармацевтических наук: 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Самара, 2008: Перм. гос. фармацевт. акад.]. Пермь, 2008. 21 с.
6. Rudolph H., Samland J. Occurrence and metabolism of *Sphagnum* acid in the cell walls of bryophytes // Phytochemistry. 1985. Vol. 24. N 4. P. 745-749.
7. Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry) / Klavina L. [et al.] // Molecules. 2015. Vol. 20. № 9. P. 17221–17243.
8. Biological properties of Chilean native moss *Sphagnum magellanicum* / Montenegro G. [et al.] // Biol. Res. 2009. Vol. 42. № 2. P. 233–237.
9. Seasonal changes of chemical composition in boreonemoral moss species / Klavina L. [et al.] // Environ. Exp. Biol. 2018. № 16. P. 9–19.
10. Drobnik J., Stebel A. Tangled history of the European uses of *Sphagnum* moss and sphagnol // J. Ethnopharmacol. 2017. Vol. 209. № 9. P. 41–49.
11. Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research / Beike A.K. [et al.] // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2015. Vol. 120. № 3. P. 1037–1349.