

УДК 50.009

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОФИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ОРЕХА МАНЬЧЖУРСКОГО, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО НА ЮГЕ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

© 2013 О.Г. Зорикова^{1,2}, С.К. Горохова¹, А.Ю. Маняхин^{1,2}, С.П. Зорикова^{1,2}

¹ Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН

² Владивостокский государственный университет экономики и сервиса

Поступила в редакцию 27.05.2013

Исследован качественный состав гидрофильных фракций листьев и плодов ореха маньчжурского *J. mandshurica*, произрастающего на юге Приморского края. Выявленные группы веществ: кумарины, танины, флавоноиды и нафтохиноны устойчиво идентифицируются числовым «хроматографическим профилем» в течение всего вегетационного периода. Динамика накопления вторичных метаболитов разнонаправлена и не совпадает для различных групп сырья.

Ключевые слова: орех маньчжурский, вторичные метаболиты, динамика накопления, хроматографический профиль

Из всего богатства растительного мира, включающего около 300 тыс. видов высших растений, человек использует только одну сотую часть. Эти растения могут быть применены в виде лекарственных средств, пищевых добавок, окультурены и коммерциализированы. Дальний Восток России является регионом, наиболее перспективным для целенаправленного поиска сырья и создания новых лечебных препаратов. Продукционная флора Дальнего Востока представлена 1710 ботаническими видами растений, из них 1500 видов высших растений, что составляет 48% от числа видов дальневосточной флоры (3100). Из суммарной продукционной флоры выделяется флора лекарственных продуцентов, включающая 1100 видов. Применение лекарственной флоры Дальнего Востока в официальной медицине не превышает 1% от всего видового состава, плановой заготовке подлежат всего 35 наименований сырья [1]. Исследование уникальной и своеобразной флоры Дальнего Востока России и использование ее представителей в медицине, животноводстве, пищевой промышленности является в настоящее время актуальным.

Одним из активно используемых в медицине является род орех (*Juglans*). Представители этого рода применяются как в западной, так и восточной традиционных лечебных практиках. Данные литературных источников свидетельствуют о широком распространении представителей рода *Juglans*. Род *Juglans* растет в основном в тепло-умеренных, субтропических и тропических районах северного

полушария, в южном полушарии орехи встречаются в Андах Южной Америки и Бразилии [2]. За пределами бывшего СССР – Балканский п-ов, Малая Азия, Иран, Афганистан, Юго-восточный Китай, Япония [3].

Juglans mandshurica L – орех маньчжурский распространен в Приморье и в Приамурье. По морскому побережью он достигает района Советской Гавани, в бассейне Амура крайним западным пунктом его произрастания является устье Буреи, северным – устье её притока Нимана, а северо-восточным – село Киселёвка. Маньчжурский орех чистых насаждений не образует, растет в составе смешанных кедрово-широко-лиственных лесов по долинам рек и на нижних поясах горных склонов до 500-550 м над уровнем моря. Чаще всего он встречается в долинных ильмово-ясеневых насаждениях, где на гектаре растет до 20-40 деревьев [4]. Растения рода *Juglans* L. содержат разнообразные группы биологически активных веществ: моно-, сескви- и тритерпеноиды, и другие азотсодержащие соединения, а также стероиды, в том числе фитостерины, флавоноиды, нафтохиноны и другие производные нафталина, бензохиноны, диарилгептаноиды, фенольные кислоты, их эфиры, высшие жирные кислоты и алифатические альдегиды установленной структуры. Выделены жирные масла, дубильные вещества, а также эфирное масло и витамины В1, В2, С, РР, (3-каротин [5]. В эксперименте спиртовой экстракт листьев ореха маньчжурского обладает стресс-протективными свойствами, повышает адаптационно-компенсаторные возможности эндокринной системы, тормозит развитие асцитной опухоли Эрлиха, повышает число лейкоцитов в периферической крови. Сесквитерпеноиды и диарилгептаноиды проявляют цитотоксическую активность на клетках линии 1С и карциномы, таксифолин, афзелин, кверцитрин, мирицитрин, 1,2,6-тригаллоилглюкопираноза и 1,2,3,6-тетрагаллоилглюкопираноза – антикомплемментарную

Зорикова Ольга Геннадиевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель. E-mail: dvogtslmp@mail.ru

Горохова Светлана Константиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Маняхин Артем Юрьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. E-mail: mau84@mail.ru

Зорикова Светлана Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник/ E-mail: si19@mail.ru

и цитотоксическую, 1-О-[α -L-арабино-фуранозил-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-глюкопиранозид] и 1-О- β -D-[6'-О-(3",5"-дигидрокси-4"-метокси бензоил)]глюкопиранозид 1,4,8-тригидроксинафта-лина, 5- О- β -D-[6-О-(3",4",5"-тригидроксiben-зоил)]глюкопиранозид 4 α ,5,8-тригидрокси- α -тет-ралона активны в отношении ВИЧ-1 [5]. Для анализа содержания вторичных метаболитов в сырье ореха используются методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии [6]. Идентификация биологически активных веществ в растительном сырье относится к необходимым этапам его исследования и стандартизации.

Цель работы: определение основных групп биологически активных веществ гидрофильной фракции листьев и плодов ореха маньчжурского и выявление сезонной динамики накопления вторичных метаболитов в сырье.

Первоначальным этапом изучения извлечений, как любой сложной многокомпонентной системы, является качественная характеристика состава, которая может включать не только идентификацию конкретных индивидуальных соединений, но и получение «отпечатков пальцев» или хроматографических профилей. При этом не предполагается обязательное «привязывание» конкретных химических структур, представленным на хроматографических профилях, сигналам. В настоящей работе для получения профилей использовали ОФ ВЭЖХ. Если рассматривать любую инструментальную хроматограмму как многомерный аналитический сигнал, то она может быть записана в числовом виде совокупности пар значений $T_i - P_i$, где T – величины, характеризующие удерживание (относительные времена удерживания tR или индексы удерживания $IY Ri$), P – интенсивности хроматографических сигналов (высоты H_i или площади S_i). Подобную форму представления аналитической информации (числовую или графическую) неоднократно предлагали для решения задач различного уровня сложности, как предполагающих, так и не предполагающих идентификацию зарегистрированных компонентов [7]. Для растительных препаратов на моносырьевой основе положение наиболее характерных (обычно наиболее интенсивных) сигналов на хроматограммах

может быть рекомендовано как способ их идентификации [8].

Материалы и методы. Объектом исследования служили листья и плоды ореха маньчжурского *Juglans mandshurica*, выращиваемого в дендрарии Горнотажной станции ДВО РАН. Образцы сырья были заготовлены в мае-сентябре 2012 г. Исследование заключалось в качественном и полуколичественном определении основных биологически активных соединений. Качественное и количественное определение проводили в извлечениях, полученных экстракцией 40% этанолом, методом обращеннофазовой ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC 10 VP с УФ-детектором, программным обеспечением LC Solution, колонкой Phenomenex Luna C18 (250x4,60mm 5 micron), предколонкой Phenomenex C18. Использован градиентный режим элюирования смесью ацетонитрил – 0,1% H_3PO_4 . Детектирование проводили при длине волны 270 нм. Определение содержания флавоноидов проводили методом внешнего стандарта с использованием раствора кверцетина концентрации 0,1 мг/мл. Подтверждали идентификацию веществ методом УФ-спектроскопии на спектрометре Shimadzu UV-2501PC в диапазоне длин волн 225–400 нм. Интенсивности хроматографических пиков выражали в виде относительных площадей с последующим сравнением хроматографических профилей экстрактивных веществ различных видов сырья с целью выявления их различий для последующего подтверждения их присутствия в фитопрепаратах.

Результаты и обсуждение. В табл. 1, 2 приведены выборочные данные (опущены неинформативные слабые сигналы) для образцов этанольных извлечений сырья листьев и плодов в течение вегетационного периода (май-сентябрь). Рассматриваемый полуколичественный вариант интерпретации хроматографических профилей в числовой форме применим даже без указания на конкретные соотношения компонентов в сырье. С учетом воспроизводимости относительных времен удерживания (в среднем около $\pm 0,01$), главные сигналы на хроматограмме суммарного извлечения позволяют уверенно судить о наличии индивидуальных составляющих.

Таблица 1. Хроматографические профили гидрофильных извлечений листьев ореха маньчжурского

1 май		2 июнь		3 июль		4 август		5 сентябрь	
$tR_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$
0,064	0,02	0,064	0,03	0,064	0,05	0,064	0,03	0,064	0,04
0,099	0,01	0,099	0,01	0,099	0,08	0,099	0,13	0,099	0,01
-	-	-	-	0,439	0,03	0,441	0,01	0,450	0,05
0,523	0,02	0,523	0,01	0,525	0,01	0,524	0,02	0,525	0,06
1,059	0,03	1,059	0,01	1,059	0,03	1,060	0,03	1,060	0,01
1,349	0,07	1,349	0,02	1,349	0,03	1,349	0,07	1,349	0,07

Как показано в табл. 1 в сырье листьев ореха маньчжурского можно выделить четыре группы веществ с относительными временами удерживания

0,06-0,09; 0,44-0,52; 1,06 и 1,35. Анализ хроматограмм и литературные источники [9, 10] позволяют предполагать, что первая группа веществ

представлена кумаринами, во второй и третьей группах представлены танины и вещества флавоноидной природы и четвертой группе соответствуют нафтохиноны. Одно из веществ флавоноидной природы с относительным временем удерживания 0,44 фиксируется только с июля.

Динамику накопления веществ (рис. 1) в течение вегетационного периода, прослеживали по относительным площадям пиков. Показано, что минимальное количество танинов, флавоноидов и нафтохинонов приходится на июнь, период завязи плодов, далее по сезону их количество несколько возрастает, достигая максимума к концу вегетационного периода, исключая группу флавоноидов, количество которых после максимума в июле-августе к концу сезона снижается. В количественном отношении преобладают кумарины, содержание которых в листьях возрастает, достигая максимума в августе, и снижается в конце вегетационного периода.

Показано, что минимальное количество танинов, флавоноидов и нафтохинонов приходится на июнь, период завязи плодов, далее по сезону их количество несколько возрастает, достигая максимума к концу вегетационного периода, исключая группу флавоноидов, количество которых после максимума в июле-августе к концу сезона снижается. В

количественном отношении преобладают кумарины, содержание которых в листьях возрастает, достигая максимума в августе, и снижается в конце вегетационного периода.

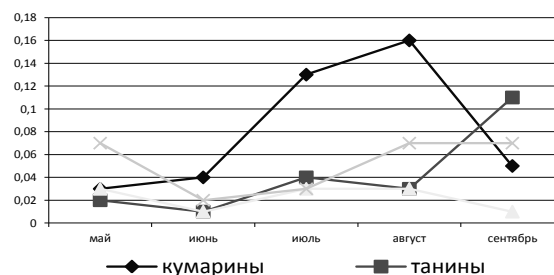


Рис. 1. Динамика накопления веществ в сырье листьев *J. mandshurica* за вегетационный период

В сырье плодов зарегистрированы пики веществ, характеризующиеся теми же относительными временами удерживания, что и в сырье листьев (табл. 2), что позволяет предполагать аналогичный набор вторичных метаболитов, а именно: кумарины, танины, флавоноиды и нафтохиноны.

Таблица 2. Хроматографические профили гидрофильных извлечений плодов ореха маньчжурского

2		3		4		5	
$t_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$	$tR_{отн}$	$S_{отн}$
0,064	0,02	0,064	0,02	0,064	0,01	0,064	0,01
0,099	0,12	0,099	0,07	0,099	0,04	0,099	0,09
0,453	0,09	0,453	0,03	0,452	0,05	0,452	0,04
0,526	0,07	0,526	0,06	0,026	0,01	0,527	0,04
1,060	0,02	1,060	0,01	1,065	0,02	1,065	0,04
1,349	0,07	1,349	0,08	1,349	0,06	1,349	0,06

Полуколичественный анализ накопления веществ в сырье плодов (рис.2) показал, что кумарины и танины демонстрируют сходную динамику, причем максимальное количество веществ отмечается в стадии формирования плода (завязи), постепенно снижается почти в 3 раза к августу и возрастает (на 100% - кумарины; 33% - танины) к стадии полной зрелости в сентябре.

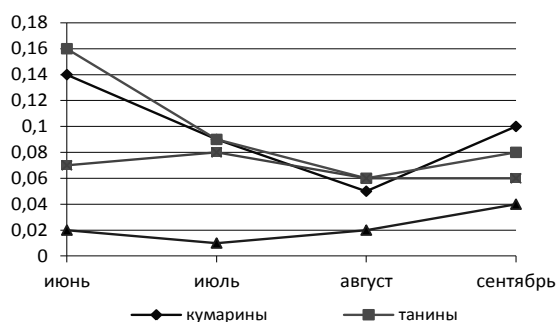


Рис. 2. Динамика накопления веществ в сырье плодов *J. mandshurica* за вегетационный период

Содержание флавоноидов и нафтохинонов в сырье плодов слабо изменяется в течение вегетационного сезона, причем динамика этих групп веществ разнонаправлена. В пробах за июль отмечается минимальное содержание флавоноидов и максимальное – нафтохинонов, обратное соотношение наблюдается в сентябре. Данные, полученные при анализе УФ-спектра (рис. 3) подтверждают вышеприведенные результаты. Выявленный максимум спектра при $\lambda=265-280$ нм характеризует наличие кумаринов, второй слабовыраженный максимум 325-340 нм подтверждает присутствие нафтохинонов.

Выводы: проведенные исследования показали, что основными биологически активными веществами гидрофильных фракций листьев и плодов ореха маньчжурского *J. mandshurica*, произрастающего на юге Приморского края, являются кумарины, танины, флавоноиды и нафтохиноны. Выявленные группы веществ устойчиво идентифицируются числовым «хроматографическим профилем» в течение всего вегетационного периода. Динамика накопления вторичных метаболитов разно-

направлена и не совпадает для различных групп сырья. Для сырья листьев максимальное накопление вторичных метаболитов приходится на вторую половину вегетационного сезона (август-сентябрь), плоды ореха маньчжурского наиболее богаты биологически активными веществами в начале развития. Полученные результаты могут использоваться для разработки рекомендаций по заготовке сырья листьев и плодов ореха маньчжурского.

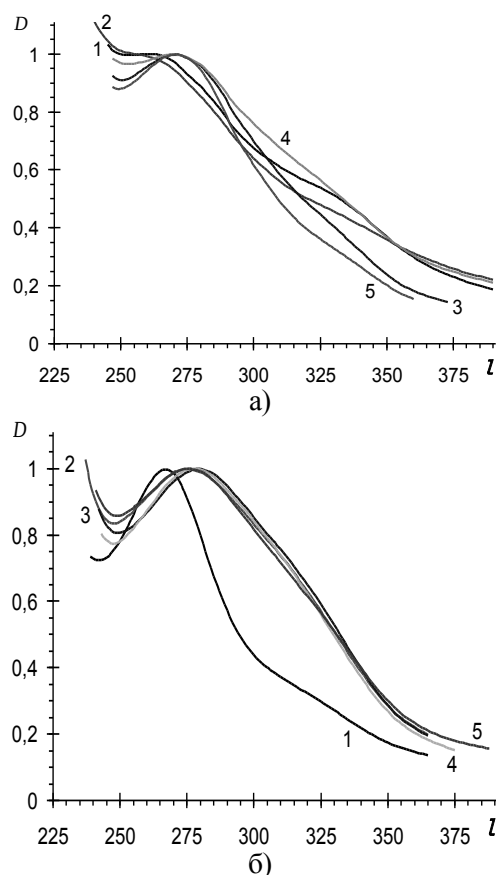


Рис. 3. УФ характеристика сырья листьев (а) и плодов (б) *J. Mandshurica* (1-5 номера проб сырья по времени отбора)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Измоленов, А.Г. Силедия. Начало учения. Лесные соки и ягоды. – Хабаровск. Хабаровское кн.изд-во., 2001. 368 с.
2. Деревья и кустарники СССР. – М.: Академия наук СССР, Т.2, 1951. 221 с.
3. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Гл. ред. П.С. Чиков. – М.: ГУГК, 1980. С. 247.
4. Усенко, Н.В. Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока: справочная книга. – Хабаровск: Приамурские ведомости, 2010. 272 с..
5. Растительные ресурсы России: Дикорастущие растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.1. – СПб.-М., 2008. 421 с.
6. Растения для нас. Справочное издание /под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. – СПб.: Учебная книга, 1996. 654 с.
7. Косман, В.М. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений растительного происхождения в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы, флаваноны и их гликозиды / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. 1997. Т. 33, вып. 2. С. 14-26.
8. Пименов, А.И. Экстракционно-хроматографическое определение действующих компонентов в масляных растительных экстрактах / А.И. Пименов, И.Г. Зенкевич, В.Г. Макаров // Химический анализ веществ и материалов: Тезисы Всеросс. конф. – М., 2000. С. 86-87.
9. Еникеева, Р.А. Исследование по фармакогностическому изучению и стандартизации сырья и препаратов ореха грецкого (*Juglans regia* L.): автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – М., 2008. 21 с.
10. Babula, P. Simultaneous determination of 1,4-naphthoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with UV detection / P. Babula, R. Mikelovab, D. Potesilb et al. // Biomed. Papers. 2005. V. 149. P. 25-28.

STUDYING OF HYDROPHILIC FRACTION OF LEAVES AND FRUITS OF NUT MANCHURIAN, GROWING IN THE SOUTH OF PRIMORSKIY KRAI

© 2013 O.G. Zorikova^{1,2}, S.K. Gorokhova¹, A.Yu. Manyakhin^{1,2}, S.P. Zorikova^{1,2}

¹ Mountain-taiga Station named after V.L. Komarov FEB RAS

² Vladivostok State University of Economy and Service

The qualitative structure of hydrophilic fractions of leaves and fruits of nut of the manchurian *J. mandshurica* growing in the south of Primorskiy Krai is investigated. The revealed groups of substances: benzopyrones, tannins, flavonoids and naphthoquinones are steadily identified by numerical "chromatographic profile" during the whole vegetative period. Dynamics of accumulation the secondary metabolites is multidirectional and doesn't coincide for various groups of raw materials.

Key words: nut manchurian, secondary metabolites, dynamics of accumulation, chromatographic profile

Olga Zorikova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow, Chief. E-mail: dvogtslmp@mail.ru; Svetlana Gorokhova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow; Artem Manyakhin, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: mau84@mail.ru; Svatlana Zorikova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: si19@mail.ru