УДК 577.121+615.324

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СЫРЬЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ ФЛОРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

© 2016 Т.В. Момот[1,2], Н.Ф. Кушнерова[1]

[1] Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток
[2] Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Статья поступила в редакцию 26.04.2016

Проведен скрининг водно-этанольных (40%) экстрактов, выделенных из отходов от переработки ягодного сырья Уссурийской тайги, по физико-химическим показателям. Показано, что в состав экстрактов из осей соцветий винограда амурского, аралии маньчжурской, лимонника китайского, отжима после отделения сока ягод калины саржента, жимолости съедобной, рябины амурской, корней элеутерококка колючего входит широкий комплекс биологически активных веществ: анионы и катионы, полифенолы, проантоцианидины, нейтральные липиды и фосфолипиды.

Ключевые слова: *виноград амурский, аралия маньчжурская, лимонник китайский, калина саржента, жимолость съедобная, рябина обыкновенная, оси соцветий, отжим, полифенолы, липиды*

В условиях производств по переработке ягодного сырья Уссурийской тайги остается большой объем отходов в виде осей соцветий (кисть, зонтик и др.) и отжима после отделения сока ягод. Это большой возобновляемый сырьевой резерв, который в настоящее время не утилизируется и не используется должным образом. Однако в составе этих отходов присутствует значительное количество биологически активных веществ (БАВ), в частности, полифенолов, являющихся важными компонентами многих лекарственных препаратов. На сегодняшний день лекарственные средства биофлавоноидной природы являются препаратами-лидерами в терапии заболеваний печени. Наиболее изучены препараты, содержащие в качестве основного действующего вещества группу полифенольных флавоноидных соединений – Silimarin, выделенных из экстрактов плодов расторопши пятнистой *(Silybum marianum G.*). На основе этих соединений разработан ряд лекарственных препаратов: «ЛИВ-52» (Индия), «Карсил» (Болгария), «Легалон» (Германия), «Силегон» (Венгрия), «Сиромин» (Словения) и др. Действие силимарина обусловлено стабилизацией клеточных мембран за счет антиоксидантных свойств [8]. Однако препараты, содержащие силимарин, в основном, зарубежного производства, поэтому очевидна актуальность и необходимость поиска и изучения новых источников сырья, в частности отходов от переработки растительных, дикорастущих видов Дальневосточной тайги для импортозамещения в области фармацевтики. В то же время это поможет создать безотходную технологию по переработке дикоросов и сохранить экологическую обстановку на территориях перерабатывающих предприятий. Важно отметить, что из всего многообразия растительного сырья (растения, фрукты, овощи, злаки, семена, кора и др.) только 10% исследуемых растительных источников достаточно обогащены полифенолами и могут быть использованы в качестве эффективных натуральных антиоксидантов[12]. До сих пор не проводилось системного исследования состава БАВ в экстрактах из осей соцветий винограда амурского, аралии маньчжурской, лимонника китайского, отжима после отделения сока ягод калины саржента, жимо-лости съедобной, рябины обыкновенной.

Цель работы: изучение химического состава водно-спиртовых экстрактов (40%) из осей соцветий и отжима ягод растений, произрастающих в Уссурийской тайге.

Материалы и методы исследования. В ходе скрининговых исследований были изучены водно-этанольные экстракты из следующих видов сырья: оси соцветий после отделения ягод винограда амурского (*Vitis amurensis* Rupr.), лимонника китайского (*Schizandra chinensis* Turcz. Baill), аралии маньчжурской (*Aralia mandshurica* Rupr), отжим (оси соцветий, кожица и семена) после отделения сока калины Саржента (*Viburnum sargentii* Koehne), жимолости съедобной (*Lonicera edulis* Turcz. Ex Freyn Hult.), рябины амурской (*Sorbus amurensis* Koehne). Суховоздушное сырье экстрагировали 40% этиловым спиртом методом перколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сырья. Для сравнения исследовали экстракт элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.). По внешнему виду экстракты представляют собой темные жидкости бурого (ягоды) и рубинового (оси соцветий) цвета с характерным вкусом и запахом исходного сырья. Содержание катионов и анионов в экстрактах определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-105» с длиной капилляра $L_{эфф.}/L_{общ.}$ = 50/60 см. Толщина капилляра 75 мкм. Определение суммарного содержания растительных полифенолов в экстрактах проводили по методу P. Sanoner et al. [15]. Определение олигомерных проантоцианидинов по методу B.S. Sun et al. [16]. Оценка антиоксидантной активности экстрактов по методу А.П. Арзамасцева и др. [1] с использованием хемилюминометра «Флюорат-02-3М». Массовую долю экстрактивных веществ, содержание титруемых кислот и массовую долю золы определяли общепринятыми методами. Выделение общих липидов из растительных экстрактов проводили по методу J. Folch et al. [11]. Микротонкослойную хроматографию липидов осуществляли по методу V. Svetachev, V. Vaskovsky [17]. В качестве сорбента использовали отечественный силикагель марки «КСК».

Момот Татьяна Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры современных методов диагностики и медицинских технологий, научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: kushnerova83@mail.ru
Кушнерова Наталья Федоровна, доктор биологических наук, профессор кафедры химии и инженерии биологических систем. E-mail: natasha50@mail.ru

Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное определение проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей гексан: серный эфир: уксусная кислота в соотношении 90:10:1 об./об. [10]. После хроматографирования стандарты и пробы обнаруживали парами иода. Для разделения фосфолипидных фракций использовали метод двумерной микротонкослойной хроматографии. Использовали системы растворителей, предложенные G. Rouser et al. [14]: в первом направлении – хлороформ: метанол: аммиак (28%) (65:25:5 или 65:35:5, по объему), во втором – хлороформ: ацетон: метанол: ледяная уксусная кислота: вода (30:40:10:10:5 или 50:20:10:10:5, по объему). Количественное содержание фракций проводили по методу V. Vaskovsky et al. [18]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в % от суммы нейтральных липидов и фосфолипидов. Обработку результатов проводили с использованием статистического пакета Instat 3.0 (GraphPad Software Inc. USA, 2005) с функцией проверки соответствия выборки закону нормального распределения.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, массовая доля экстрактивных веществ, основу которых составляют фенольные соединения, находится в интервале от 40 до 69 мг/см^3. Содержание титруемых кислот в экстрактах неодинаково: наибольшее их количество в экстрактах из осей соцветий лимонника, отжима жимолости и рябины. pH среды водных растворов сухого остатка экстрактов составляет от 3 до 5, то есть по органолептическим свойствам экстракты соответствуют приятному вкусу.

Таблица 1. Физико-химические показатели водно-спиртовых экстрактов

Растительный экстракт	Массовая доля экстрактивных веществ (мг/см^3)	Содержание титруемых кислот (% в пересчете на лимонную кислоту)	Массовая доля общей золы (%)
оси соцветий винограда	69±4	0,8±0,1	0,49±0,01
оси соцветий аралии	40±4	2,0±0,04	0,76±0,02
оси соцветий лимонника	45±4	3,6±0,2	0,73±0,02
отжим калины	48±4	1,2±0,1	0,74±0,02
отжим жимолости	42±5	3,1±0,3	0,80±0,03
отжим рябины	43±4	3,0±0,2	0,77±0,02
экстракт элеутерококка	45±4	2,0±0,05	0,76±0,02

В водных растворах сухого остатка экстрактов из анионов в большей степени присутствуют фосфат-ионы (440-2703 мг/л) (табл. 2). Среди катионов в наибольших количествах содержатся ионы калия (2356-3800 мг/л). Анализируя табл. 2 следует отметить, что в экстрактах присутствуют химические элементы в интервалах физиологических норм и не относятся к токсичным или условно-токсичным [9].

Как видно из табл. 3, наибольшее количество общих полифенолов обнаружено в экстракте из осей соцветий винограда (35,40 г/л), отжима из ягод рябины (35,2 г/л), отжима из ягод калины (32,8 г/л), элеутерококка (30,31г/л) и отжима из ягод жимолости (33,0 г/л). Определено содержание комплекса олигомерных проантоцианидинов в выделенных экстрактах. Наибольшее содержание отмечалось в экстракте из отжима ягод жимолости – 18,8 г/л, отжима рябины – 18,6 г/л, отжима калины - 18 г/л и осей соцветий винограда - 16,58 г/л.

Таблица 2. Количество анионов и катионов в водных растворах сухого остатка экстрактов (мг/л в пересчете на экстракт)

	Оси соцветий винограда	Оси соцветий аралии	Оси соцветий лимонника	Отжим калины	Отжим жимолости	Отжим рябины
Cl^-	142,0	92,0	337,0	108,0	170,0	300,0
SO_4^{2-}	164,0	120,0	-	485,0	150,0	170,0
PO_4^{3-}	2280,0	2000,0	440,0	2703,0	1300,0	2000,0
K^+	2356,0	2500,0	3500,0	2830,0	3800,0	3100,0
Na^+	13,1	150,0	853,0	51,16	490,0	620,0
Mg^{2+}	160,0	240,0	279,2	398,8	310,0	360,0
Li^+	3,5	1,62	5,79	33,0	2,00	2,50
Ca^{2+}	11,1	96,0	102,8	71,2	17,0	22,0

Таблица 3. Содержание общих полифенолов, общих липидов, проантоцианидинов и антирадикальная активность растительных экстрактов

Растительные экстракты	Общие полифенолы (г/л)	Олигомерные Проантоцианидины (г/л)	Антирадикальная активность (ммоль-экв тролокса/л)	Вес общих липидов (г/л)
оси соцветий винограда	35,40±2,8	16,58±1,2	30,24±0,77	6,25±0,17
оси соцветий аралии	15,00±2,4	6,30±0,52	2,89±0,42	11,69±0,76
оси соцветий лимонника	14,40±1,7	4,63±0,47	2,62±0,44	8,14±0,56
отжим ягод калины	32,80±2,4	18,00±1,42	8,22±0,58	15,94±0,33
отжим жимолости	33,04±1,32	18,80±1,24	114,85±5,68	13,40±0,84
отжим рябины	35,20±1,12	18,60±0,11	29,73±1,46	1,45±0,13
экстракт элеутерококка	30,31±2,69	4,35±0,46	11,36±0,57	7,58±0,24

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, обладающих биологической активностью, отличительная особенность которых состоит в наличии свободного или связанного фенольного гидроксила. Они обусловливают антиоксидантные и антирадикальные свойства. Наибольшая антирадикальная активность была у экстракта из отжима жимолости (114,85 Ммоль-экв тролокса/л), отжима рябины (29,73 Ммоль-экв тролокса/л) и осей соцветий винограда (10,42 Ммоль-экв тролокса/л).

Из растительных экстрактов была выделена липидная фракция. Как видно из табл. 3, наибольшее количество общих липидов обнаружено в экстракте из отжима калины и рябины, что обусловлено присутствием крупных семян в отжиме [3, 5]. В общих липидах, выделенных из растительных экстрактов, было проведено исследование фракционного состава нейтральных липидов и фосфолипидов (табл. 4 и 5).

Таблица 4. Содержание фракций нейтральных липидов в липидной составляющей растительных экстрактов (в % от суммы, M±m)

Липидные экстракты	ДАГ	ТАГ	СЖК	ЭЖК	ХС	ЭХС
оси соцветий винограда	4,1±0,12	24,4±1,65	6,5±0,37	22,8±1,50	9,7±0,44	32,5±1,76
оси соцветий аралии	7,8±0,22	26,0±1,73	15,6±1,14	15,9±0,68	9,1±0,84	26,0±1,52
оси соцветий лимонника	6,4±0,19	30,8±2,14	12,8±1,21	15,4±0,93	7,7±0,31	26,9±1,61
отжим калины	4,9±0,31	36,6±2,16	14,6±1,20	19,5±1,31	7,3±0,62	17,1±1,10
отжим рябины	5,5±0,28	23,1±2,20	13,2±0,98	19,8±1,44	7,7±0,66	30,8±2,27
отжим жимолости	7,9±0,46	27,6±2,25	15,8±0,96	13,2±1,11	9,2±0,89	26,3±2,10
экстракт элеутерококка	5,3±0,22	29,8±2,48	7,4±0,56	19,2±1,52	6,4±0,47	31,9±2,30

Примечание: ДГ – диацилглицерины, ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина

Как видно из табл. 4, состав нейтральных липидов во всех исследованных экстрактах представлен диацилглицеринами, триацилглицеринами, свободными жирными кислотами, эфирами жирных кислот, холестерином и эфирами холестерина. То есть, в составе нейтральных липидов липидной составляющей растительных экстрактов присутствуют как фракции, необходимые для синтеза мембранных структур (холестерин, свободные жирные кислоты), а также как метаболиты для биохимических реакций липидного обмена (диацилглицерины, триацилглицерины, эфиры жирных кислот, эфиры холестерина) в организме человека и животных.

Состав фосфолипидных фракций липидной составляющей всех исследованных экстрактов представлен тремя фракциями: фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсерином. Как видно из табл. 5, наибольшее количество фосфатидилхолина содержится в экстракте их отжима калины (45,33±8,63%). В остальных экстрактах его содержание находится в пределах 35-37%. Наибольшее количество фосфатидилэтаноламина содержится в экстрактах из осей соцветий винограда, аралии и лимонника (в среднем 34%). Эти фракции в организме человека и животных являются основными структурными компонентами биомембран. Наибольшее количество фосфатидилсерина присутствует в липидной составляющей экстрактов рябины и жимолости (в среднем 33%). Данный фосфолипид необходим для функционирования АТФаз (Na^+-K^+-АТФаза). Также известно, что в организме млекопитающих эти фракции (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин) тесно связаны между собой метаболически, где возможны превращения одного фосфолипида в другой [4]. Такие пути новообразования структурно и метаболически необходимых фосфолипидов протекают без значительной затраты энергии, что очень важно при патологии. Данные механизмы включаются как дополнительные, компенсаторные, при неблагоприятных воздействиях в условиях блокирования основных путей биосинтеза. Таким образом, фракции нейтральных липидов и фосфолипидов, входящие в состав липидной составляющей исследованных растительных экстрактов имеют важное значение для жизнедеятельности организма человека.

Таблица 5. Содержание фракций фосфолипидов в липидных экстрактах, выделенных из растительных экстрактов (в % от суммы, M±m)

Экстракты	Фосфатидил-холин	Фосфатидил-этаноламин	Фосфатидил-серин
экстракт винограда	35,75±0,45	34,77±0,77	29,49±0,48
экстракт аралии	35,96±1,58	34,32±2,60	29,72±1,20
экстракт лимонника	35,55±1,36	34,57±1,48	29,90±1,10
экстракт калины	45,33±8,63	30,19±3,50	24,48±5,21
экстракт рябины	35,50±1,78	30,61±2,07	33,89±0,91
экстракт жимолости	36,71±0,91	30,16±0,42	33,12±0,54
экстракт элеутерококка	37,65±1,42	31,58±1,67	30,77±1,36

Изученный химический состав растительных экстрактов представлен широким спектром БАВ, т.е. оси соцветий и отжим после переработки дикоросов Уссурийской тайги представляют перспективный вид сырья для выделения фармацевтических субстанций. Особый интерес представляют фенольные соединения, которые, являясь вторичными метаболитами растений, эволюционно адаптированы к употреблению человеком в пищу. Применение растительных полифенольных антиоксидантов, способных инактивировать свободные

радикалы, имеет целый ряд положительных эффектов на здоровье человека. Это свойство полифенолов в значительной степени снижает нагрузку на систему антиоксидантной защиты и, таким образом, препятствует ее истощению. Благодаря особенности химического строения полифенолы способны играть роль универсальной буферной емкости, выступая как в качестве донора, так и акцептора электронов и протонов, и снимать состояния гиперпротонемии и тканевой гипоксии [19]. Кроме этого, растительные полифенолы сдерживают процессы перекисного окисления липидов и снимают состояние оксидативного стресса [13]. Мембраностабилизирующий эффект объясняется взаимодействием полифенолов с поверхностью мембран, что увеличивает прочность поверхностного слоя клеток, защищая их от действия свободных радикалов [2]. Липидная составляющая экстрактов обеспечивает репарацию мембранных структур и метаболиты для биохимических реакций. Анионы и катионы необходимы как коферменты в метаболических реакциях, так и элементы минерального обмена. В ранее проведенных работах [6, 7] было показано, что экстракт из осей соцветий аралии маньчжурской и лимонника китайского обладают гепато- и стресс-протекторным действием.

Выводы: изученные в настоящем исследовании экстракты могут применяться как при профилактике заболеваний, связанных с низкой антиоксидантной защитой организма и нарушением структурной организации мембран клеток крови, гепатоцитов и других клеток, так и как компоненты вспомогательной терапии при их лечении.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, проект № 1326.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Арзамасцев, А.П.* Оценка показателей антиоксидантной активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья / *А.П. Арзамасцев, Е.И. Шкарина, Т.В. Максимова* // Химико-фармацевтический журнал. 1999. № 11. С. 17-20.
2. *Афанасьева, Ю.Г.* О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран / *Ю.Г. Афанасьева, Е.Р. Фахретдинова, Л.В. Спирихин, Р.С. Насибуллин* // Хим.-фарм. журн. 2007. Т. 41, № 7. С. 12-14.
3. *Гаврилин, М.В.* Оптимизация методик определения действующих веществ в масле из плодов калины / *М.В. Гаврилин, О.М. Маркова, Т.Т. Лихота, Е.А. Измайлова* // Химико-фармацевтический журнал. 2007. Т. 41, № 3. С. 42-44.
4. *Грибанов, Г.А.* О метаболических взаимоотношениях липидов // Успехи современной биологии. 1979. Т. 87, вып. 1. С. 16-33.
5. *Макарова, Н.В.* Влияние сушки на химический состав и антиоксидантные свойства фруктов / *Н.В. Макарова, А.Н. Дмитриева* // Хранение и переработка сельхозсырья. 2014. № 1. С. 37-41.
6. *Момот, Т.В.* Использование осей соцветий аралии манчжурской для восстановления липидного обмена при алкогольной интоксикации / *Т.В. Момот, Н.Ф. Кушнерова* // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, № 3(2). С. 754-757.
7. *Момот, Т.В.* Оси соцветий лимонника китайского в профилактике стрессовых нарушений антиоксидантной защиты и липидного обмена у крыс / *Т.В. Момот, Н.Ф. Кушнерова* // Известия Самарского научного центра РАН. 2015. Т. 17, № 5. С. 164-168.
8. *Новиков, В.Е.* Фармакология гепатопротекторов / *В.Е. Новиков, Е.И. Климкина* // Обзор клин. фармакол. лек. тер. 2005. Т. 4, № 1. С. 2-20.
9. *Хасина, М.А.* Витамины и минеральные вещества в жизни человека. Изд. 2-ое доп. / *М.А. Хасина, О.А. Артюкова, А.Ф. Беляев, М.Ю. Хасина*. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2001. 120 с.
10. *Amenta, J.S.* A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. 1964. Vol. 5. N 2. P. 270-272.
11. *Folch, J.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue / *J. Folch, M. Less, G.H. Sloane-Stanley* // Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497-509.
12. Olszewska, M.A. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species in relation to their polyphenolic composition / *M.A. Olszewska, P. Michel* // Natural Product Research. 2009. Vol. 23, N 16. P. 1507-1521.
13. *Pignatelli, P.* Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine / *P. Pignatelli, A. Ghiselli, B. Buchetti* et al. // Atherosclerosis. 2006. Vol. 188, № 1. P. 77-83.
14. *Rouser, G.* Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glicolipids / *G. Rouser, G. Kritchevsky, A. Yamamoto* // Lipid chromatogr. Anal. N.Y.: Dekker, 1967. Vol. 1. P. 99-162.
15. *Sanoner, P.* Polyphenol profiles of French apple varietes (Malus domestica sp.) / *P. Sanoner, S. Guyot, N. Marnet* et al. // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47. P. 4847-4853.
16. *Sun, B.S.* Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins / *B.S. Sun, J.M. Ricardo-da-Silva, I. Spranger* // J. Agric. Food Chem. 1998. Vol. 46. N 10. P. 4267-4274.
17. *Svetachev, V.I.* A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids / *V.I. Svetachev, V.E. Vaskovsky* // Chromatogr. 1972. Vol. 67, N. 2. P. 376-378.
18. *Vaskovsky, V.E.* An universal reagent for phospholipid analysis / *V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasendin* // Chromatogr. 1975. Vol. 114, N. 1. P. 129-141.
19. *Valko, M.* Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease / *M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol* // J. of Biochem. and Cell Biol. 2007. Vol. 39. P. 44-84.

JUSTIFICATION OF THE CHOICE OF RAW SOURCES FROM FAR EAST FLORA FOR RECEIVING THE PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

© 2016 T.V. Momot[1,2], N.F. Kushnerova[1]
[1] Biomedicine School of Far East Federal University, Vladivostok
[2]Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAS

Screening of the extracts emitted from waste from processing of berry raw materials of the Ussuriisk taiga on physical and chemical indicators is carried out. It is shown that in composition of extracts from axes of inflorescences of grapes Amur, araliya Manchurian, magnolia vine Chinese, an extraction after office of juice of berries of a guelder-rose of a sarzhent, a honeysuckle edible, mountain ashes Amur, the roots of eleuterokokk prickly enters a wide complex of biologically active agents: anions and cations, polyphenols, proantotsianidina, neutral lipids and phospholipids.

Key words: *grapes Amur, araliya Manchurian, magnolia vine Chinese, guelderrose of a sarzhent, honeysuckle edible, mountain ash ordinary, axes of inflorescences, extraction, polyphenols, lipids*

Tatiana Momot, Candidate of Medicine, Associate Professor at the Department of Modern Methods of Diagnostics and Medical Technologies, Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: kushnerova83@mail.ru; Natalia Kushnerova, Doctor of Biology, Professor at the Department of Chemistry and Engineering of Biological Systems. E-mail: natasha50@mail.ru