



УДК 615.072, 615.074, 615.322

ИЗУЧЕНИЕ ЧЕРЕМУХИ ВИРГИНСКОЙ - *PADUS VIRGINIANA* КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ

**Д. И. Писарев, О. О. Новиков
М. Д. Безменова
В. Н. Сорокопудов
Д. В. Бурлуцкая
Н. Н. Нетребенко
М. А. Халикова, Н. В. Автина**

Белгородский
государственный
университет,
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы, 85

e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

В статье изложены данные о химическом изучении плодов черемухи виргинской, как перспективного источника биологически активных полифенолов – антоцианов. Антоцианы – природные красители, обладающие высокой антирадикальной активностью. При химическом изучении методами масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии и использования кислотного гидролиза в плодах черемухи поздней обнаружены гликозиды цианидина. Количественное содержание гликозидов цианидина в плодах черемухи поздней составило 7,57 %, что превосходит многие известные растительные источники антоцианов.

Ключевые слова: черемуха виргинская, антоцианы, цианидин, масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

Лекарственные препараты из растительного сырья, как и синтетические препараты, находят широкое применение в медицине для лечения различных заболеваний. Это обусловлено их малой токсичностью и высокой биологической доступностью. Пополнение арсенала лекарственных средств растительного происхождения является актуальной проблемой, так как спрос на них постоянно увеличивается. Учитывая возрастающую необходимость рационального использования сырьевых ресурсов, особого внимания заслуживают малоизученные лекарственные растения. К таким растениям относится черемуха виргинская (*Padus virginiana*) семейства розоцветных (*Rosaceae*).

По своим признакам более других похожа на черемуху обыкновенную. Ее отличие заключается в том, что почки длиной 5-7 мм отстоят от побега, тогда как у черемухи обыкновенной почки достигают 13 мм и они прижаты к побегу. Дерево до 15 м высотой, с широкой, развесистой кроной; темно-бурой, мелкотрещиноватой корой. Листья продолговато-яйцевидные, при распускании буро-зеленые, летом темно-зеленые, плотные, блестящие, остропильчатые, до 12 см длиной. Цветки белые, до 1,3 см, в многоцветковых, облиственных кистях до 15 см длиной. Плоды шаровидные, вначале красные, при полном созревании темно-красные, с сочной, съедобной мякотью. Цветет и плодоносит ежегодно с 7 лет [2, 3].

Официальным видом, разрешенным к применению в медицинской практике, является черемуха обыкновенная *Padus avium* Mill. издавна известная как ценное пищевое и лекарственное растение. Лекарственным сырьем являются плоды (*Fructus Padi*) [4].

Плоды черемухи практически не изучали с конца 50-х годов, хотя ее химический состав изучен относительно хорошо, в гораздо меньшей степени – химический состав других видов черемухи.

По литературным данным в плодах черемухи обыкновенной содержатся моносахара, пектиновые вещества, органические кислоты (лимонная, яблочная и др.), аскорбиновая кислота, флавоноиды, кумарины, фурукумарины, оксикоричные кислоты, дубильные вещества, гликозиды (амигдалин, амигдонитрилгликозид, пруназин), аминокислоты, жирные и эфирные масла, макро- и микроэлементы [1, 4, 5].

Фитонциды плодов черемухи обладают антимикробными свойствами и губительно влияет на плесневые грибы, мух, комаров, слепней. Фитонцидные свойства растения успешно использовались при лечении экспериментальных трихомонадных кольпитов и грибковых поражений кожи.

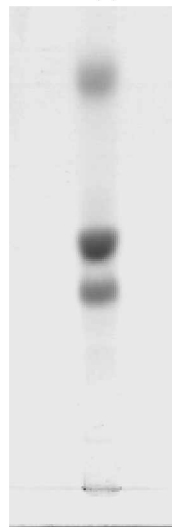
Препараты черемухи применяют внутрь в качестве вяжущего средства при энтеритах, диспепсиях различной этиологии; при инфекционных колитах, дизентерии назначают как вспомогательное средство [4].

Исходя из вышеизложенного **целью** настоящего исследования явилось научное обоснование возможности обеспечения сырьевой базы лекарственных растений, за счет мало изученного вида – черемухи виргинской как перспективного источника биологически активных полифенолов, в первую очередь антоцианов.

Для реализации цели, **задачей** данного исследования явилось химическое изучение антоцианов плодов черемухи виргинской и определение их количества в сырье.

Для выделения суммы антоцианов 50,0 г воздушно-сухого, измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм сырья заливали 1%-ным раствором кислоты хлористоводородной в 96% этиловом спирте и экстрагировали в течение суток. Извлечение сливали, и сырье заливали новой порцией экстрагента. Всего было сделано пять сливов. После фильтрования и объединения сливов полученное извлечение сгущали под вакуумом на ротационном испарителе ИР-1 до минимального объема (фракция I). Для получения чистой суммы антоцианов извлеченную фракцию I подвергли избирательному сорбированию на тальке. Для этого фракцию I смешивали с достаточным количеством талька до образования кашицы. Полученную массу переносили в воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Воронку присоединяли к колбе Бунзена с водоструйным насосом и под вакуумом промывали полученную массу водой очищенной до того момента, пока промывные воды не стали прозрачными. Промывные воды удаляли из колбы Бунзена, а из оставшейся на фильтре массы проводили десорбцию антоцианов 1%-ным раствором кислоты хлористоводородной в 96% этилового. Вымывали до появления бесцветных промывных вод. Полученный раствор упаривали под вакуумом на ротационном испарителе ИР-1. Таким образом, мы получили обогащенный антоциановый комплекс, свободный от прочих веществ. Полученную фракцию далее подвергали качественному анализу на наличие антоцианов.

Наличие антоцианов в полученной фракции подтверждали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах «Silufol» в системе этилацетат – кислота уксусная ледяная – кислота муравьиная – вода (100:10:10:26). Полученная хроматограмма представлена на рис. 1.



На хроматограмме наблюдалось три пятна, имеющие красную окраску, причем самое верхнее пятно, по-видимому, соответствовало агликону антоцианов.

Идентификацию данных компонентов осуществляли с помощью масс-спектрометрии. Существенное отличие и преимущество масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия непосредственно детектирует сами частицы вещества.

Детекцию масс-спектра проводили на приборе масс – спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics - вакуумного прибора, который использует физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях с помощью ионизации лазером.

Рис. 1. Хроматограмма суммы антоцианов *P. virginiana*

Пробу полученной суммы антоцианов наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel T F», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали α-цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы «Flex Control», обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis». В Результате получен спектр, на котором наблюдается наиболее интенсивный пик иона с зарядом $m/z = 287.316$ соответствующий пику агликона – по молекулярной массе соответствующий цианидину и два менее интенсивных пика: иона

$m/z = 449.214$, отвечающий его моногликозиду и иона $m/z = 595.15$ соответствующий его дигликозиду, рис. 2.

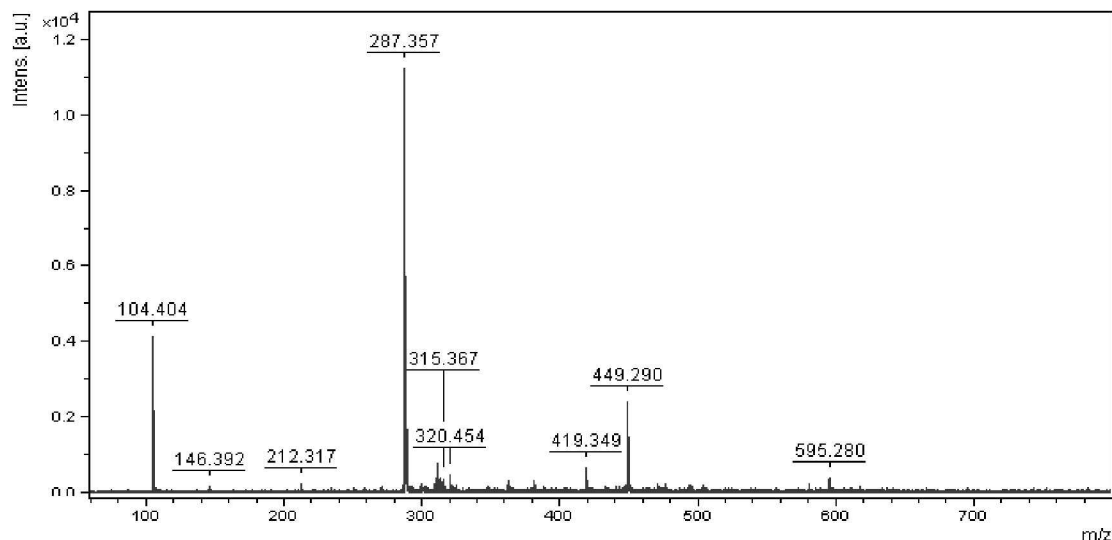


Рис. 2. Масс-спектр суммы антоцианов плодов *P. virginiana*

Кроме того, используя метод УФ-спектрофотометрии с использованием шифт-реактива – 5%-ного этанольного раствора алюминия хлорида удалось выяснить расположение сахаров в структуре гликозидов антоцианов. Известно, что при взаимодействии флавоноидов с алюминия хлоридом образуются комплексные соединения, в результате чего УФ-спектрах поглощения наблюдается сильный батохромный сдвиг полос поглощения. У антоцианов при наличии свободной орто-диоксигруппировки в кольце В при взаимодействии с алюминия хлоридом наблюдается сдвиг на 40–50 нм.

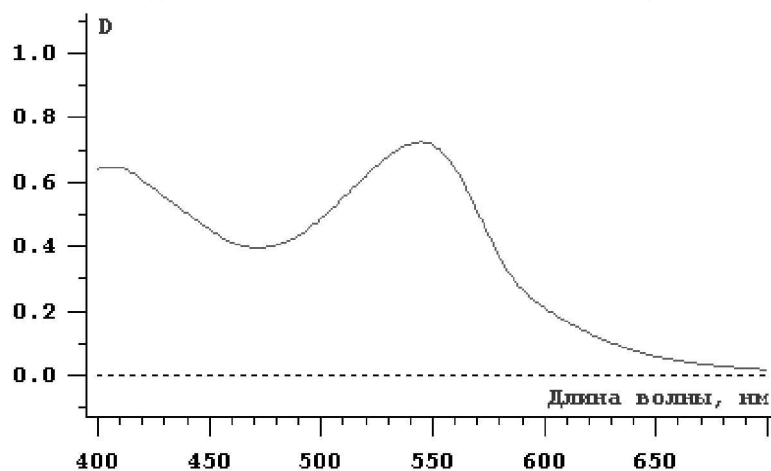


Рис. 3. УФ-спектр антоцианов *P. virginiana*

Для выявления свободной орто-диоксигруппировки в кольце В сначала регистрировали УФ-спектр чистой суммы антоцианов. При этом наблюдался один максимум поглощения при длине волны $\lambda = 545$ нм (рис. 3).

При добавлении 5% раствором алюминия хлорида в 96% этиловом спирте наблюдалось смещение максимума поглощения на 40 нм (рис. 4), что свидетельствует о свободной орто-диоксигруппировке в

кольце В, а сахарная часть у цианидина предположительно находится в 3 положении.

Количественное определение антоцианов в исследуемом сырье проводили по собственному характерному поглощению антоцианов, находящемуся в диапазоне длин волн $\lambda = 490 - 550$ нм.

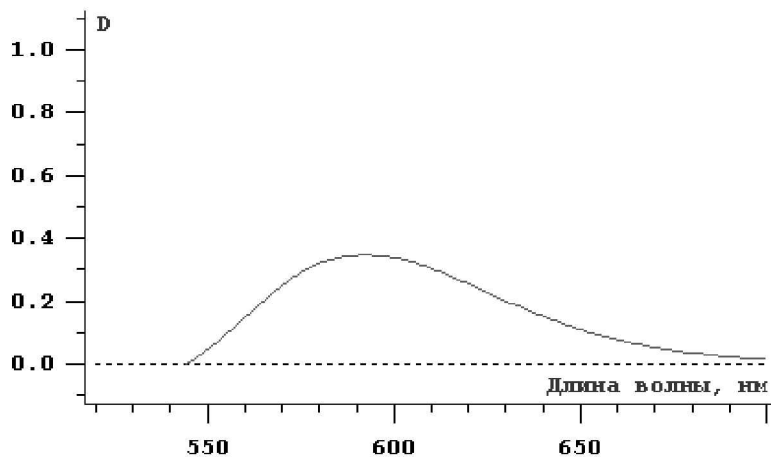


Рис. 4. УФ-спектр антоцианов *P. virginiana* с алюминия хлоридом

Для этого навеску сырья массой 1,0 г предварительно измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм сырья помещали в плоскодонную колбу и заливали 20 мл растворителя - 1%-ным раствором кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96%-ном, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течении 30 минут с момента закипания воды в бане. Полученное извлечение охлаждали и фильтровали в мер-

ную колбу на 100 мл. Экстракцию остатка проводили еще четыре раза порциями по 20 мл, собирая фильтрат в ту же мерную колбу на 100 мл. После охлаждения объем извлечения доводили экстрагентом до метки и перемешивали (раствор А). Из раствора А пипеткой отбирали 2 мл аликвоты переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки экстрагентом (раствор Б). Раствор Б фотометрировали на спектрофотометре СФ-56 в диапазоне длин волн $\lambda = 450 - 600$ нм, в качестве раствора сравнения использовали 1% раствор кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96%-ном. Полученный УФ-спектр представлен на рис. 3.

Расчет содержания суммы антоцианов (X%) в сырье в пересчете на цианидин-3-гликозид проводили по формуле:

$$X\% = \frac{A \times W_1 \times W_2 \times M \times 100}{\epsilon \times l \times a \times V \times (100 - B) \times 10} \times 100, \text{ где:}$$

X% – содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-гликозид, %;

W_1 – общий объем извлечения из сырья, мл;

W_2 – объем извлечения после разбавления, мл;

a – масса сырья, г;

V – аликвота, взятая для разбавления, мл;

M – молярная масса цианидина-3-гликозида, равная 449,17;

l – толщина кюветы, см;

ϵ – молярный коэффициент поглощения (26900).

B – влажность сырья (8%)

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-гликозид в сырье составило 7.57 %, что превосходит многие растительные официальные источники антоцианов.

Выводы

Показана возможность использования плодов черемухи виргинской в качестве нового сырьевого источника ценных биологически активных полифенолов.

Проведен анализ химического состав сырья плодов черемухи виргинской по наличию антоцианов. Установлено наличие в сырье антоцианов (цианидин и его гликозиды). Установлено количественное содержание, составившее 7.57 % в пересчете на цианидин-3-гликозид.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования плодов черемухи виргинской в медицинской практике как источника ценных биологически активных веществ.



Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 г.г., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.

Список литературы

1. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.
2. Еремин Г.В. Отдаленная гибридизация косточковых плодовых растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – 280 с.
3. Классификатор рода *Padus* Mill. / Сост. Н.А. Царенко, В.Л. Витковский. – С.-Пб., 1993. – 28 с.
4. Растительные лекарственные средства / Под ред. Н.П. Максютинной. – Киев: Здоров'я, 1985. – 102 с.
5. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: учеб. пособие / Под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2002. – 407 с.

STUDY OF COMMON CHOKE-CHERRY – *PADUS VIRGINIANA* AS A PROMISING SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPHENOLS

D. I. Pisarev O. O. Novikov
V. N. Sorokopudov
D. A. Burlutskaya
N. N. Netebenko M. A. Khalikova
N. V. Avtina

*Belgorod State University,
Pobedy St., 85, Belgorod,
308015, Russia*

E-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

The article presents the data on the chemical study of wild black cherry fruitage as the promising source of biologically active polyphenols-anthocyanins. Anthocyanins – natural dyes – have high antiradical activity. Cyanidin glycosides is found in wild black cherry fruitage by means of the chemical study alongside with such methods as mass spectrometry, thin layer chromatography and ultraviolet spectrophotometry as well as the using of acid hydrolysis. The quantitative content of cyanidin glycosides in wild black cherry fruitage is 7,57% that is much more than in many other well-known plant sources of anthocyanins.

Key words: wild black cherry, anthocyanins, cyanidin, mass spectrometry, ultraviolet spectrophotometry, thin layer chromatography.