

## ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ СИРЕНИ IN VIVO И В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

ЛЮБАКОВСКАЯ Л.А., ЯКОВЛЕВА О.А.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»*

**Резюме.** Качественный состав веществ фенольной природы в листьях и цветках дикорастущей сирени, сирени культивируемых сортов: «Радж Капур», «Лунный Свет», «М.Шолохов», «Красавица Москвы», «Партизанка» представлен кумаринами, дубильными веществами, флавоноидами, фенолкарбоновыми кислотами. По данным ВЭЖХ спектр фенольных соединений экстракта листьев нативного растения и каллусной культуры листового происхождения сорта «М.Шолохов» представлен: рутином и бензойной кислотой (листья), актеозидом, кофейной кислотой и сирингином (каллус листового происхождения). Спектры экстрактов каллуса сирени листового, стеблевого, цветкового происхождения сорта «М.Шолохов» схожи.

**Ключевые слова:** сирень, фенольные соединения, каллус.

**Abstract.** Qualificative composition of the substances of phenolic culture in the leaves and flowers of wild growing lilac, lilac of the cultivated sorts: «Radj Capur», «Lunnyy Svet», «M.Sholokhov», «Krasavitsa Moskvi» and «Partisanka» are represented by coumarins, tannins, flavonoids, phenolcarbonated acids. According to the HPLC data the spectrum of phenolic compounds of the leaves extract in the natural-growing plant and callus culture of leaf origin sort «M. Sholokhov» is represented by: rutin and benzoic acid (leaves), acteosid, coffeic acid and syringine (callus of leaf origin). Spectra of the extracts in the callus of the lilac of leaf, stem-like and flower origin sort «M. Sholokhov» are identical.

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, д. 22, кв.72. – Яковлева О.А.

Биологически активные вещества определяют фармакологические свойства лекарственных растений, что позволяет использовать их в качестве сырьевого источника для фармакологической промышленности. Однако большая часть растений не введено в статус лекарственных. Расширение спектра растений используемых как источник лекарственного растительного сырья является актуальной задачей. Особое место среди биологически активных соединений занимают фенольные соединения. Они представляют собой группу разнообразных химических соединений (флавоноиды, фенольные кислоты, антоцианы, катехины, дубильные вещества и др.), обеспечивающих широкий спектр фармакологического действия. Сирень, является популярным декоративным растением, кроме того, кора, листья, цветки издавна используются в народной медицине в качестве противовоспалительного,

антисептического, жаропонижающего, обезболивающего средства. Кора используется в официальной медицине в Российской Федерации для получения государственного стандартного образца сирингина (элеутерозида В), используемого при оценке качества лекарственных препаратов из элеутерококка колючего, настойка и сироп сирени предложены в качестве тонизирующих и иммуномодулирующих средств [1]. Однако использование данного вида сырья приводит к повреждению растения и снижению эксплуатационных запасов сырья. Поэтому актуальным является использование других частей растения (цветков и листьев). Существует определённая сложность в создании культурных плантаций для заготовки сырья, поэтому перспективным направлением является использование альтернативного источника растительного сырья - культуры клеток растений.

Цель исследования – изучить спектр веществ фенольной природы в листьях и цветках интактного растения и каллусной культуре различного происхождения сирени (*Syringa vulgaris* (L.)) для рекомендации альтернативного источника фенольных соединений сирени.

### Методы

Объектами исследования явились цветки и листья интактного растения дикорастущей сирени (*Syringa vulgaris* L.), культивируемых сортов: «Радж Капур», «Партизанка», «Красавица Москвы», «Лунный Свет», «М.Шолохов» и каллусная культура сирени листового, цветкового и стеблевого происхождения, сорта «М.Шолохов».

Цветки и листья растений сирени собирали в сухую погоду, в мае месяце во время цветения, сушили в хорошо проветриваемом помещении, при постоянном доступе воздуха. Культуру каллусной ткани выращивали на полутвёрдой агаризованной среде Мурасиге и Скуга (MS), pH среды 5,6-5,8 в культуральных помещениях при искусственном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (освещенность 3000 лк) при 12 – часовой смене светового и темного периодов, при  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , влажности 70% [2]. Сырую биомассу каллусной культуры подвергали лиофильной сушке на установке «Иней 3-2 №11192» при температуре  $-40^\circ\text{C}$  и давлении 0,2 атмосфер до постоянного веса каллуса.

Обнаружение веществ фенольной природы проводили с использованием качественных реакций [3]. Фенольные соединения извлекали горячим 96% этиловым спиртом. Содержание суммы фенольных соединений определяли спектрофотометрически после реакции с реактивом Folin-Ciocalteu (поглощение при 720 нм) [4]. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

Спектр фенольных соединений в листьях и цветках интактного растения и каллусной культуры листового происхождения сирени изучали методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе фирмы «Agilent HP 1100», в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G 1311 А, диодно-матричным детектором G1315В, термостатом колонок 1316 А, устройством для автоматического ввода образцов G 1313А при длине волны 280-320 нм [5]. Хроматографирование проводили обращеннофазовым методом, в качестве

неподвижной фазы использовали колонку «Zorbax Eclipse XDS C-18», 150×4,6 мм, зернение 5 мкм. Подвижная фаза - уксусная кислота: метанол (градиентное элюирование): фаза А – вода : уксусная кислота 97 : 3 (об/об), фаза В – метанол. Условия хроматографирования представлены в таблице 1.

Таблица 1

## Условия хроматографирования

Время (мин.)	Подвижная фаза	Подвижная фаза	Скорость подвижной фазы мл/мин.
	А (%, об/об)	В (%, об/об)	
0 – 10	100 - 90	0 - 10	0,9 - 1,0
10 - 40	90 - 30	10 - 70	1,0
40 - 44	30 - 100	70 - 0	1,0 - 0,9
44 - 47	100	0	0,9

Скорость подачи элюэнта 0,9-1,0 мл/мин. Время уравнивания системы 20 мин. перед каждым вводом. Разделение проводили при температуре 20°С. Обработка хроматограмм выполнена с использованием программы «Agilent ChemStation for LC 3D».

Подготовку экстракта для исследования готовили следующим образом: листья, цветки нативного растения и каллус листового происхождения сирени экстрагировали в соотношении 1:60 горячим 96% этиловым спиртом, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Параллельно готовили 0,01% растворы сравнения рутина, актеозида, бензойной и кофейной кислот. Идентификацию фенольных соединений проводили путем сравнения времен удерживания и спектров поглощения веществ в извлечениях со стандартами.

Идентификацию синингина в каллусе сирени сорта «М.Шолохов» листового происхождения проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSTON», модель 305, ФРАНЦИЯ; инжектор ручной, модель RHEODYNE 7125 USA с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы Мультихром для «Windows» [6]. Условия хроматографирования: колонка Alphabond C – 18 125, 300 x 3,9 мкм; подвижная фаза – ацетонитрил – вода – кислота уксусная в соотношении (85:15:0,5); скорость подачи элюэнта 1 см<sup>3</sup>/мин; длина волны детектирования – 266 нм. Испытуемый раствор: 5,0 г сухого каллуса сирени листового происхождения сорта «М.Шолохов» помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл спирта этилового 70%, перемешивали до растворения, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и снова перемешивали. Раствор фильтровали через бумажный фильтр, этиловый спирт отгоняли на роторном испарителе под вакуумом. К сухому остатку в колбе прибавляли 10 мл воды и 10 мл четырёххлористого углерода. Содержимое колбы тщательно перемешивали, слой четырёххлористого углерода отделяли, водный слой 3 раза промывали по 10 мл четырёххлористым углеродом. Водную фазу объединяли. В колбу для отгона к водной фазе прибавляли 20 мл смеси хлороформ – 95% этанол в соотношении 5:1, оставляли

на 10 минут, а затем встряхивали на механическом роторе в течение 5 минут. Нижний слой отделяли и фильтровали через фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Извлечение повторяли 4 раза по 15,15,10,10 мл смесью хлороформ: 95% этиловый спирт 5:1, собирая извлечения в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводили до метки той же смесью. В хроматограф вводили 20 мкл испытуемого раствора и хроматографировали в выше приведенных условиях, получая не менее 3 хроматограмм.

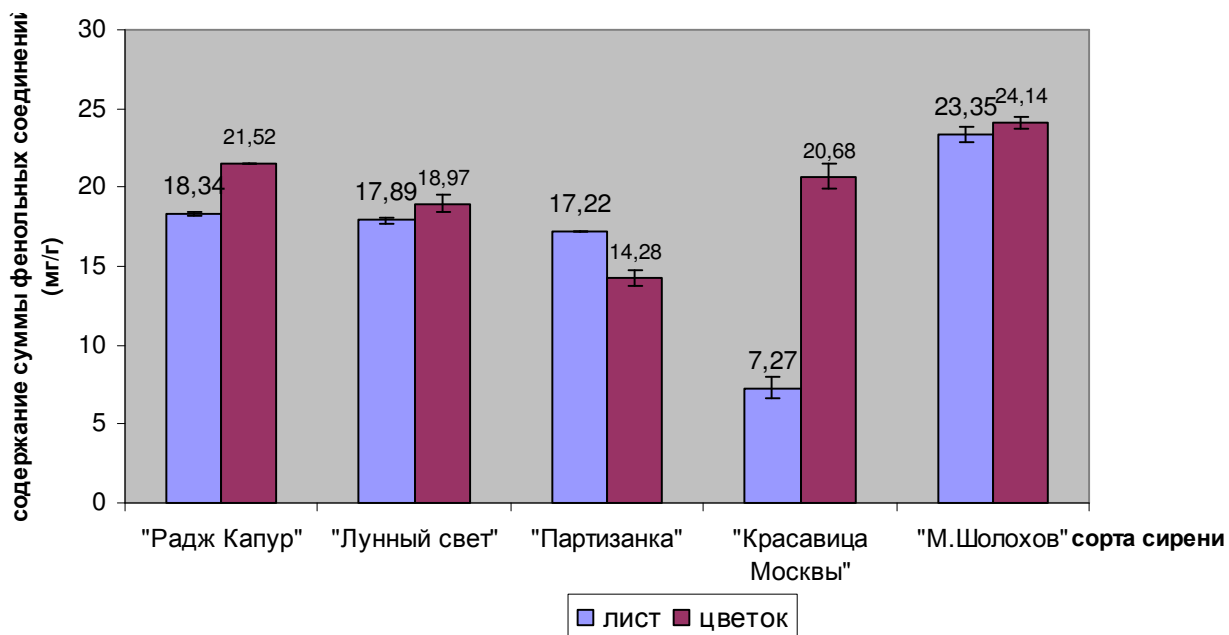
Параллельно проводили опыт с раствором государственного стандартного образца (ГСО) сирингина: точную навеску 0,010 г сирингина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 70%, перемешивали до растворения и доводили тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мл и доводили спиртом этиловым 70% до метки. ГСО сирингин (20 мкл) хроматографировали как описано выше, определяли время выхода и идентифицировали его пик на хроматограмме испытуемого раствора.

Экстракты для изучения УФ-спектров каллуса сирени листового, стеблевого и цветкового происхождения готовили следующим образом: образцы экстрагировали метиловым спиртом в соотношении 1:60 в течение 30 минут и анализировали на СФ-26.

#### **Результаты и обсуждение**

При анализе качественного состава фенольных соединений листьев и цветков дикорастущей сирени, сирени культивируемых сортов: «Радж Капур», «Лунный Свет», «М. Шолохов», «Красавица Москвы», «Партизанка» было установлено, что основную группу составляют фенольные соединения: кумарины, дубильные вещества, флавоноиды. Наличие кумаринов подтверждено реакцией с диазореактивом (диазотированным п-нитроанилином) в результате которой наблюдали вишнево-красное окрашивание. При проведении качественной реакции на дубильные вещества - наблюдали помутнение раствора, исчезающее при добавлении избытка желатина, что указывает на наличие дубильных веществ. Наличие флавоноидов подтверждено цианидиновой пробой - розово-красное окрашивание, реакцией с раствором едкой щелочи – желтое окрашивание, реакцией комплексообразования с хлоридом алюминия – желтое окрашивание, флюоресцирующее в ультрафиолетовом свете, реакцией осаждения раствором основного ацетата свинца – желто-оранжевый осадок.

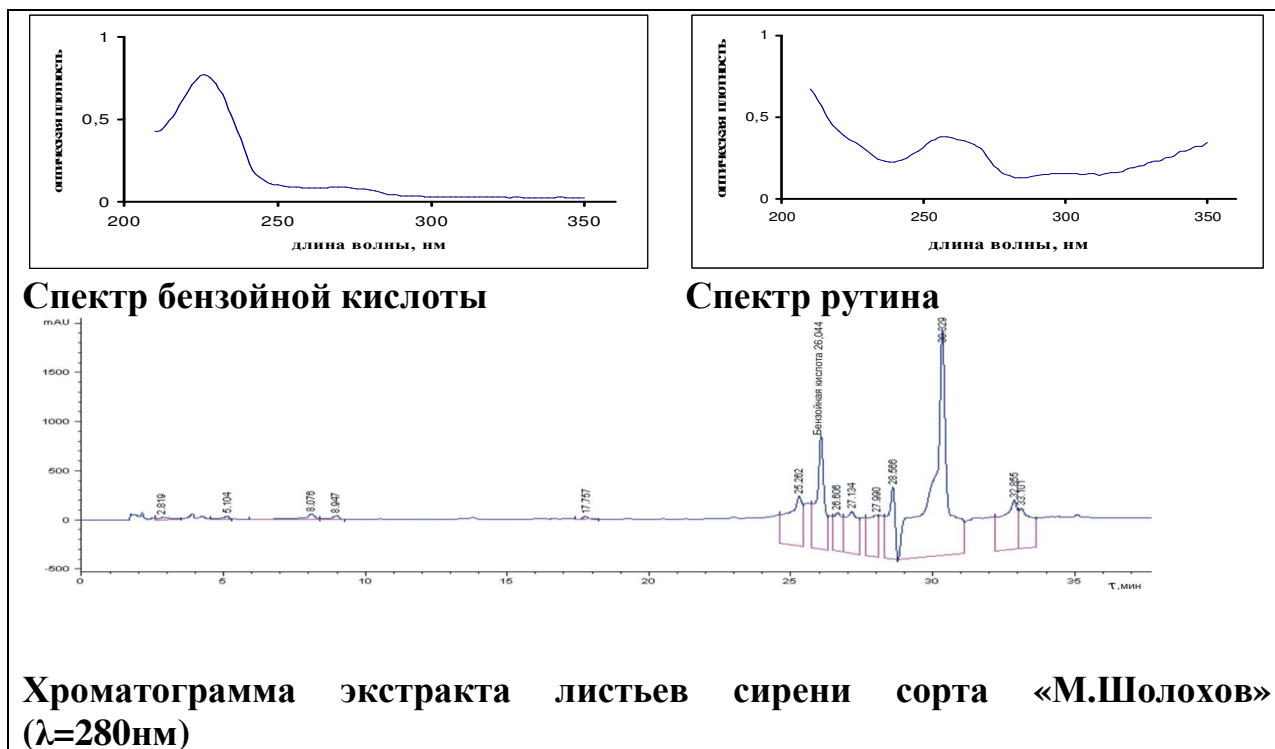
При анализе суммы фенольных соединений листьев и цветков интактного растения изучаемых сортов было установлено, что в сорте «М.Шолохов» содержание суммы фенольных соединений было наибольшим (рисунок 1).

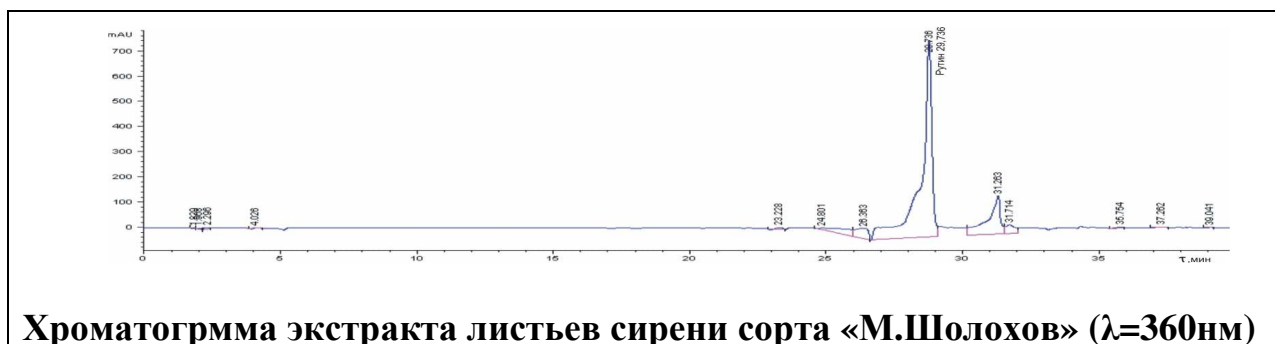


**Рис. 1. Содержание суммы фенольных соединений в цветках и листьях сирени.**

Таким образом, было установлено, что по качественному составу и по содержанию суммы фенольных соединений сорт «М.Шолохов» наиболее перспективный для дальнейшего изучения.

Методом ВЭЖХ в экстракте листьев сирени сорта «М.Шолохов» были обнаружены рутин и бензойная кислота. Время удерживания и максимумы поглощения в УФ спектре совпадали с таковыми стандартных образцов (рисунок 2, таблица 2).





**Хроматограмма экстракта листьев сирени сорта «М.Шолохов» (λ=360нм)**  
**Рис.2. Хроматограмма экстракта листьев сирени сорта «М.Шолохов».**

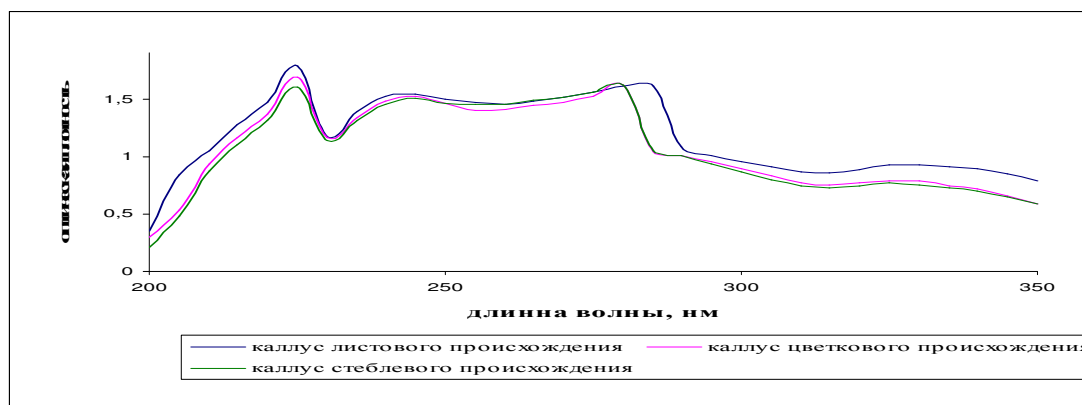
Таблица 2

**ВЭЖХ экстракта листьев сирени сорта «М.Шолохов»**

Наименование	Время удерживания, мин.	Максимумы поглощения в УФ спектре, нм
Рутин	29,7	226, 256, 356
Бензойная кислота	26,0	224, 236, 278

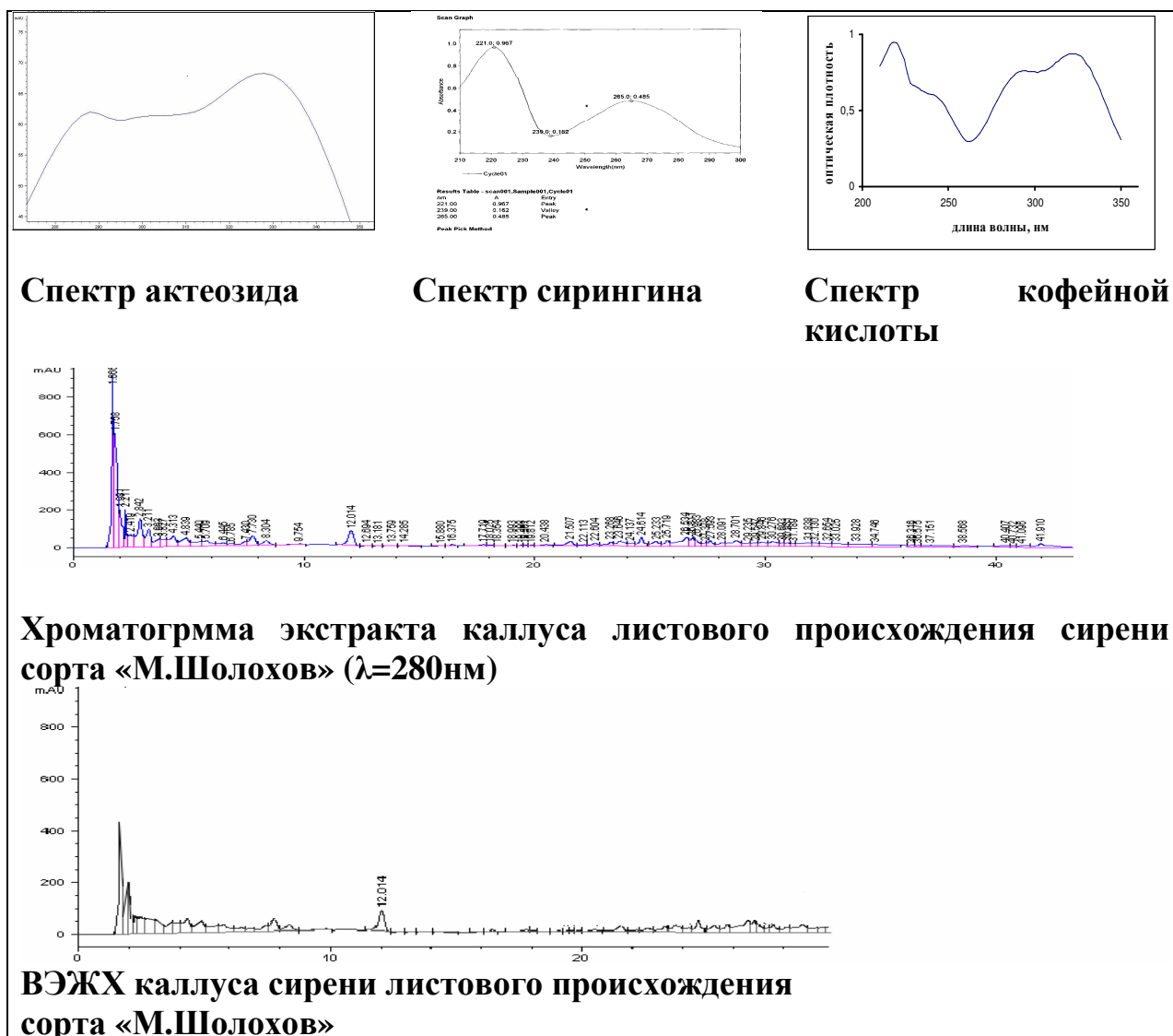
С целью определения альтернативного источника содержания суммы фенольных соединений в дальнейшем нами изучалась каллусная культура сирени сорта «М.Шолохов» листового, стеблевого, цветкового происхождения.

Спектры поглощения в УФ-свете экстрактов каллуса сирени листового, стеблевого, цветкового происхождения сорта «М.Шолохов» схожи (рисунок 3).



**Рис.3. Спектры экстрактов каллуса сирени листового, стеблевого, цветкового происхождения сорта «М.Шолохов».**

Исходя из того, что листья сирени сорта «М.Шолохов» характеризовались наибольшим содержанием суммы фенольных соединений и на основе анализа УФ-спектра каллусной культуры различного происхождения нами в дальнейшем была исследована каллусная культура сирени листового происхождения. Методом ВЭЖХ в экстракте каллуса листового происхождения сирени сорта «М.Шолохов» обнаружены актеозид, кофейная кислота и сирингин (рисунок 4, таблица 3).



**Рис.4. Хроматограмма экстракта каллуса листового происхождения сирени сорта «М.Шолохов».**

Таблица 3

**ВЭЖХ экстракта каллуса листового происхождения сирени сорта «М. Шолохов»**

Наименование	Время удерживания, мин.	Максимумы поглощения в УФ-спектре, нм
Актеозид	29,0	288, 328
Кофейная кислота	16,7	242, 296, 324
Синрингин	12,04	221, 265

### **Заключение**

Качественный состав фенольных соединений в листьях и цветках дикорастущей сирени, сирени культивируемых сортов: «Радж Капур», «Лунный Свет», «М.Шолохов», «Красавица Москвы», «Партизанка» представлен кумаринами, дубильными веществами, флавоноидами, фенолкарбоновыми кислотами. Методом ВЭЖХ определены фенольные соединения в листьях нативного растения сирени сорта «М. Шолохов» (рутин и бензойная кислота) и в каллусной культуре листового происхождения (актеозид, кофейная кислота, сирингин) УФ-спектры экстрактов каллуса сирени листового, стеблевого, цветкового происхождения сорта «М.Шолохов» схожи.

### **Литература**

1. Исследования по созданию иммуномодулирующего средства на основе коры сирени обыкновенной / В. А. Куркин [и др.] // Актуальные проблемы современной химии: тезисы междунар. конф., 2000. – С. 35-36.
2. Особенности роста и накопления ФС в каллусе сирени при различном уровне минерального питания и освещения / Л. А. Любаковская [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 156-161.
3. Коноплева, М. М. Фармакогнозия: природные биологически активные вещества / М. М. Коноплева. – Витебск: ВГМУ, 2002. – С. 119-147.
4. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent / R. E. Wrolstad [et al.] // Methods in Enzymology. – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178.
5. Chen, H. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography / H. Chen, Y. Zuo, Y. Deng // Journal of Chromatography A. – 2001. – Vol. 913. – P. 387-394.
6. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище: Р4.1.1672-03. – Москва: Минздрав России, 2004.