

## ИЗУЧЕНИЕ ЧЕРЁМУХИ ПОЗДНЕЙ – PADUS SEROTINA (EHRH.) AGARDH. КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ

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

*Белгородский государственный университет*

*e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru*

В статье изложены данные о химическом изучении плодов черёмухи поздней 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 черёмухи поздней обнаружены гликозиды цианидина. Количественное содержание гликозидов цианидина в плодах черёмухи поздней составило 15,3%, что значительно превосходит многие растительные официальные источники антоцианов.

Ключевые слова: черёмуха поздняя, антоцианы, цианидин, масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

**Введение.** Лечение растениями (фитотерапия) и фитопрепаратами в настоящее время получило широкое признание в медицине во всем мире. Существенным преимуществом растительных препаратов перед синтетическими лекарственными средствами является наличие в них естественного комплекса биологически активных веществ, накапливаемых растениями, который отличается наиболее благоприятным для организма человека соотношением основных компонентов. Поэтому выявление новых перспективных видов растений и получение препаратов на их основе является одной из самых актуальных задач современной фармации. В число таких перспективных видов входят растения рода черёмуха.

Род Черёмуха (*Padus Mill.*) относится к семейству Розоцветные (*Rosaceae Juss.*), подсемейству Сливовые (*Prunoideae Focke*) [3]. По мнению большинства авторов, род Черёмуха включает в себя около 20 видов. Различные авторы в составе рода *Padus Mill.* выделяют от 4 до 60 видов. В Index Kewensis род *Padus Mill.* представлен 70 видовыми эпитетами. Центром происхождения рода является Восточная Азия, откуда он распространился в европейско-сибирский и североамериканский генцентры [2].

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

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

По литературным данным, в плодах черёмухи 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 черёмухи обладают антимикробными свойствами и губительно влияют на плесневые грибы, мух, комаров, слепней. Фитонцидные свойства растения успешно использовались при лечении экспериментальных трихомонадных кольпитов и грибковых поражений кожи.

Препараты черёмухи 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 счёт



малоизученного вида – черёмухи поздней как перспективного источника биологически активных полифенолов, в первую очередь антоцианов.

*P. serotina* var. *Pendula* – черёмуха поздняя полиморфный вид, имеет ряд форм: *Padus serotina* var. *pendula* – плакучая форма; *Padus serotina* var. *pyramidalis* – пирамидальная форма; *Padus serotina* var. *plena* – форма с махровыми цветками; *Padus serotina* var. *asplenifolia* – форма с неравнолопастными листьями; *Padus serotina* var. *neomontana* – форма с широкоэллиптическими листьями; *Padus serotina* var. *salicifolia* – иволистная форма; *Padus serotina* var. *cartilaginea* – пергаментолистная форма и др.

*P. serotina* var. *Pendula* – дерево до 30 м высотой. Кора черно-бурая, ароматная, с многочисленными чечевичками. Листья блестящие, кожистые, темно-зеленые, осенью до заморозков сохраняют свою окраску, у некоторых растений становятся желтыми или оранжево-желтыми, продолговато-яйцевидные или ланцетные, 5–12 см длиной и 2,5–5 см шириной. Зацветает в мае. Цветки белые, с легким приятным ароматом, собраны в длинные узкие кисти (до 14 см длиной). Плоды по мере созревания становятся красными, а затем черными, около 1 см в диаметре, съедобные – с характерным горьковатым ромовым привкусом (отсюда одно из американских названий вида – gum cherry, ромовая вишня).

В природе растёт в восточной части Северной Америки. Пионерный вид, расселяется на лишённой растительности территории. Предпочитает глубокие, сырые, плодородные почвы. Толерантна к солёным почвам и может выдержать засуху. Светолюбива, но может частично оставаться в тени.

Выращивают в Эстонии, Латвии. Хорошо растёт на южном берегу Крыма, культивируется на территории России [5].

Объект исследования – собранные в период полного созревания и высушенные плоды культивируемых кустарников или деревьев черёмухи поздней – *Padus serotina* (Ehrh.) Agardh.

При предварительном фитохимическом анализе плодов черёмухи виргинской нами было установлено значительное содержание антоцианов, что позволило рассмотреть этот вид как перспективный источник данной группы флавоноидов.

Антоцианы – природные красители растительного происхождения, ответственные за наиболее яркие цвета, в которые окрашены растения, – интенсивно красные, пурпурные и синие цветки и плоды. Благодаря своей яркой окраске они контрастно выделяются на фоне зелёной листвы и тем самым привлекают внимание человека, животных и насекомых.

Интересным является факт аномально высокой антирадикальной активности антоцианов, которая во много раз превышает таковую других классов флавоноидов.

Наличие антоцианов присуще многим растениям, так как они обеспечивают цвет цветков, плодов, но арсенал лекарственных растений, содержащих антоцианы, которые могут служить их рациональными источниками, насчитывает ограниченное количество наименований.

**Экспериментальная часть.** Для выделения суммы антоцианов 50,0 г воздушно-сухого, измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм сырья заливали 1% раствором кислоты хлористоводородной в 96% этиловом спирте и экстрагировали в течение суток. Извлечение сливали, и сырьё заливали новой порцией экстрагента. Всего было сделано пять сливов. После фильтрования и объединения сливов полученное извлечение стужали под вакуумом на ротационном испарителе ИР-1 до минимального объёма (фракция I). Для получения чистой суммы антоцианов извлечённую 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% раствором кислоты хлористоводородной в 96% спирте этиловом. Вымывали до появления бесцветных промывных

вод. Полученный раствор упаривали под вакуумом на ротационном испарителе ИР-1. Таким образом, мы получили обогащённый 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.



Рис. 1. Хроматограмма суммы антоцианов *P. serotina* (Ehrh.) Agardh.

На хроматограмме наблюдалось три пятна, имеющих красную окраску, причём 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.

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  $\alpha$ -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  $m/z = 449,214$ , отвечающего его моногликозиду, и иона  $m/z = 595,15$ , соответствующего его дигликозиду рис. 2.

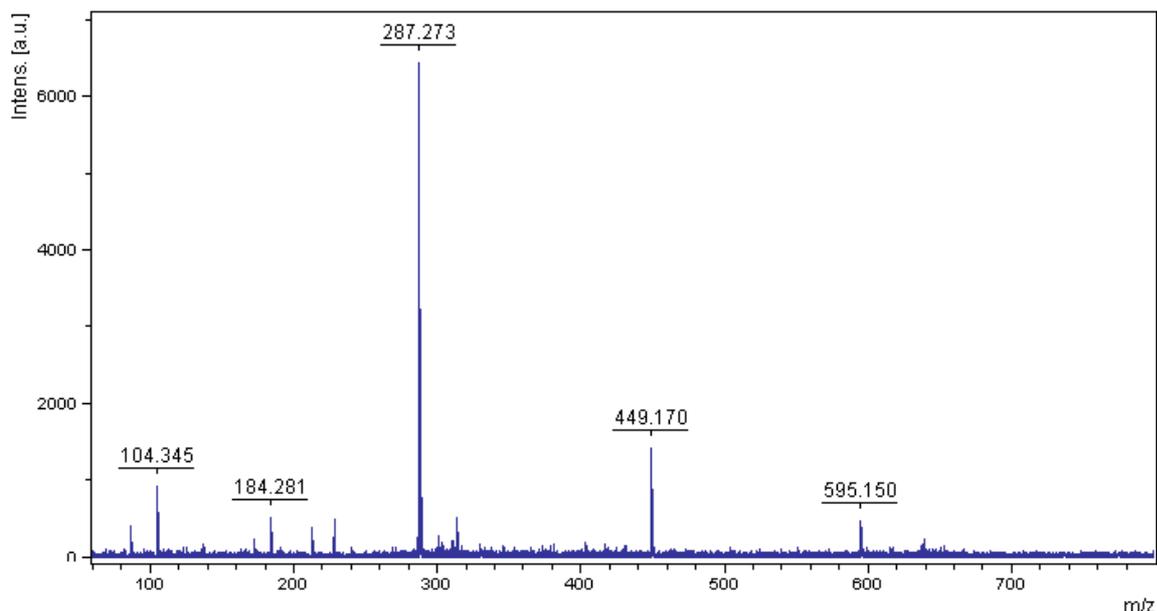


Рис. 2. Масс-спектр антоцианов *P. serotina* (Ehrh.) Agardh.

Для доказательства того, что в сумме антоцианов находятся два гликозида цианидина, выявленные на масс-спектрометре, необходимо было провести кислотный гидролиз. Для этого 0,1 г полученной суммы антоцианов заливали смесью  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (соотношение 1:1) и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100 С в течение 30 минут. После охлаждения выпавший осадок отделяли фильтрованием, промывали водой, растворяли в спирте этиловом 96% и подвергали хроматографированию. Результаты представлены на рис. 3.



Рис. 3. Хроматограмма антоцианов черёмухи поздней.

На рис. 3 видно, что после гидролиза на хроматограмме наблюдалось одно пятно агликона, что подтвердилось масс-спектрометрически (рис. 4).

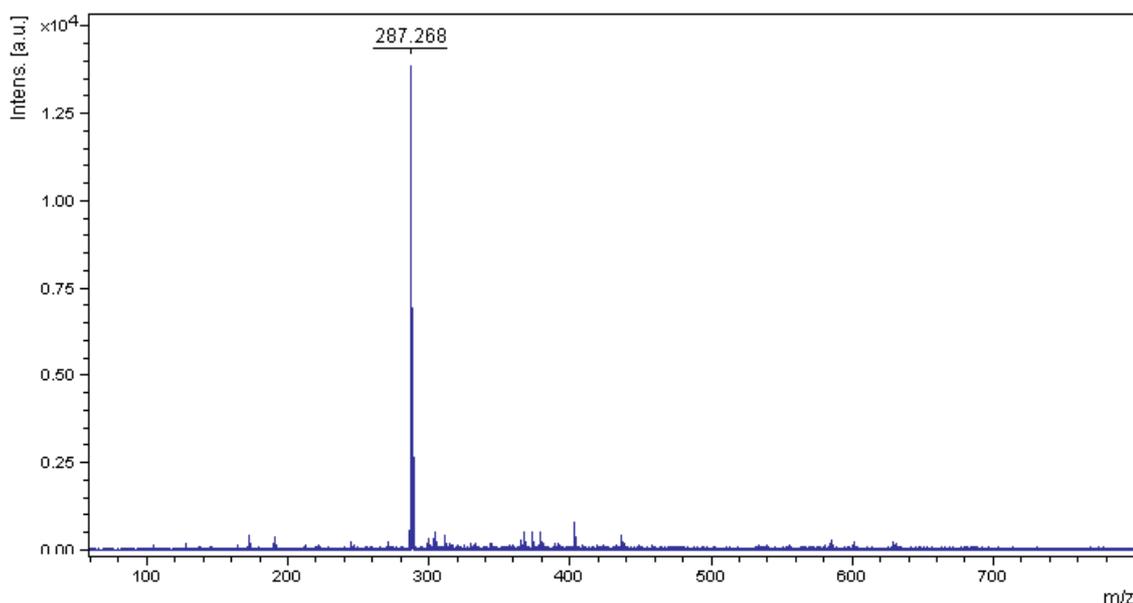
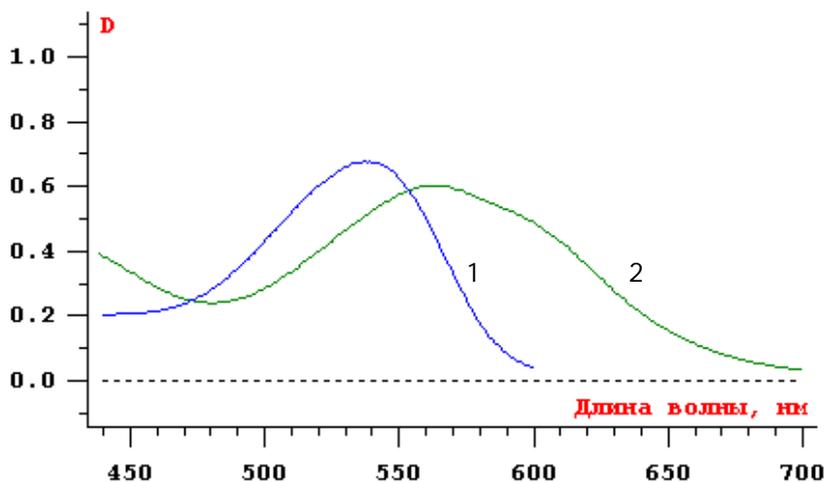


Рис. 4. Масс-спектр цианидина после гидролиза

Кроме того, используя метод УФ-спектрофотометрии с использованием шифт-реактива – 5% 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.

Для выявления свободной орто-диоксигруппировки в кольце В сначала регистрировали УФ-спектр чистой суммы антоцианов. При этом наблюдался один максимум поглощения при длине волны  $\lambda = 530$  нм. При добавлении 5% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте наблюдалось смещение максимума поглощения на 40 нм (рис. 5), что свидетельствует о свободной орто-диоксигруппировке в кольце В, а сахарная часть у цианидина предположительно находится в 3 положении.



- 1 – чистая сумма антоцианов
- 2 – чистая сумма антоцианов после реакции с алюминия хлоридом

Рис. 5. УФ-спектры суммы антоцианов плодов *P. serotina* (Ehrh.) Agardh.

Количественное определение антоцианов в исследуемом сырье проводили по собственному характерному поглощению антоцианов, находящемуся в диапазоне длин волн  $\lambda = 490\text{--}550$  нм. Для этого навеску сырья массой 1,0 г, предварительно измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в плоскодонную колбу и заливали 20 мл растворителя – 1% раствором кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания воды в бане. Полученное извлечение охлаждали и фильтровали в мерную колбу на 100 мл. Экстракцию остатка проводили ещё четыре раза порциями по 20 мл, собирая фильтрат в ту же мерную колбу на 100 мл. После охлаждения объём 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  $\lambda = 450\text{--}600$  нм, в качестве раствора сравнения использовали 1% раствор кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96%. Полученный УФ-спектр представлен на рис. 6.

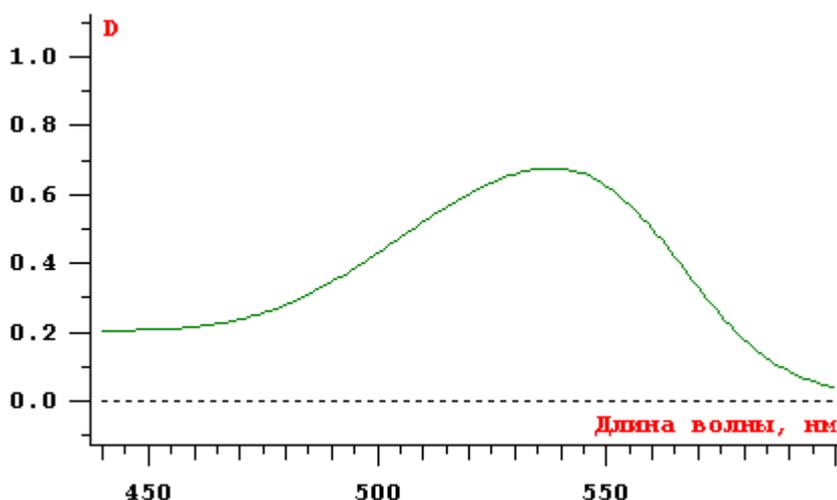


Рис. 6. УФ-спектр поглощения суммы антоцианов *P. serotina* (Ehrh.) Agardh.

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

$$X\% = \frac{A \times W_1 \times W_2 \times M \times 100}{\varepsilon \times l \times a \times V \times (100 - B) \times 10} \times 100$$

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

$W_1$  – общий объём извлечения из сырья, мл;

$W_2$  – объём извлечения после разбавления, мл;

a – масса сырья, г;

$V_1$  – аликвота, взятая для разбавления, мл;

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

l – толщина кюветы, см;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения;

B – влажность сырья (8%).

Содержание суммы антоцианов в пересчёте на цианидин-3-гликозид в сырье составило 15,3%, что значительно превосходит многие растительные официальные источники антоцианов.

**Выводы.** Показана возможность использования плодов черемухи поздней в качестве нового сырьевого источника ценных биологически активных полифенолов.

Проведен качественный анализ химического состава сырья плодов черемухи поздней по основным классам биологически активных веществ. Установлено наличие в сырье антоцианов (цианидин и его гликозиды).



Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования плодов *P. serotina (Ehrh.) Agardh* 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 гг., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.*

### Литература

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 / Г.В. Еремин – М.: Агропромиздат, 1985. – 280 с.
3. Классификатор рода *Padus* Mill. / Сост. Н.А. Царенко, В.Л. Витковский. – СПб., 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.

## THE STUDY OF THE LATE PRUNUS – PADUS SEROTINA (EHRH.) AGARDH. HOW TO PROSPECTIVE SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPHENOLS

D.I. Pisarev  
O.O. Novikov  
M.D. Bezmenova  
V.N. Sorokopudov,  
N.N. Netrobenko  
M.A. Khalikova  
N.V. Avtina

**Belgorod State University**

**e-mail: zhannaesovaya@yandex.ru**

The article presents data on the chemical study of the cherry fruit later, as a promising source of biologically active polyphenols – anthocyanins. Anthocyanins – natural dyes have a high antiradical activity. In chemical studies by mass spectrometry, thin layer chromatography and ultraviolet spectrophotometry and the use of acid hydrolysis in the fruits of cherry glycosides of cyanidin were found later. The quantitative content of cyanidin glycosides in the fruits of cherry later was 15.3%, significantly superior to many vegetable officinal sources of anthocyanins.

Keywords: cherry later, anthocyanins, cyanidin, mass spectrometry, ultraviolet spectrophotometry, thin layer chromatography.