УДК 634.17:52-36

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ЛИПОФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА БОЯРЫШНИК

[1]Гончаров Н.Н., [2]Михайлов И.В., [1]Гончаров Н.Ф., [1]Терешонок Е.В.

[1]ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, e-mail: hillary.goncharov@yandex.ru;

[2]ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», Орел, e-mail:Rolaw@rambler.ru

Определен выход липофильных фракций в плодах пяти североамериканских видов рода Боярышник: боярышника зеленого *Crataegus viridis Sarg*., боярышника мягкого *C. mollis* (*Torr. et Grey*) *Schelle*, боярышника густоцветкового *C. densiflora Sarg*., боярышника арканзасского *C. arkansana Sarg*., боярышника веероводного *C. flabellata* (*Bosc*) *C. Koch*. Исследован качественный состав хлорофиллов, каротиноидов, жирных кислот и дана количественная оценка содержания жирных кислот и каротиноидов в изучаемых объектах. Полученные данные свидетельствуют о том, что плоды являются перспективными источниками биологически активных веществ кардиотонической направленности. Изучаемые виды лекарственного растительного сырья могут найти дальнейшее применение при использовании в клинической практике лечения кардиологических и неврологических заболеваний, сопровождающихся явлениями гипоксии и метаболическими нарушениями.

Ключевые слова: боярышник, хлорофиллы, каротиноиды, жирные кислоты

STUDY OF THE COMPOSITION OF LIPOPHILIC COMPOUNDS OF SOME REPRESENTATIVES THE GENUS CRATAEGUS

[1]Goncharov N.N., [2]Mikhaylov I.V., [1]Goncharov N.F., [1]Tereshonok E.V.

[1]Kursk State Medical University, e-mail: hillary.goncharov@yandex.ru;

[2]Orel State Medical University, Orel, e-mail: Rolaw@rambler.ru

The output of lipophilic fractions has been determined in fruits of five North American species of the genus Crataegus: Crataegus viridis Sarg., C. mollis (Torr. et Grey) Schelle, C. densiflora Sarg., C. arkansana Sarg., C. flabellata (Bosc) C. Koch. Quality composition of chlorophylls, carotenoids, fatty acids has been investigated, given assess a quantitative contents of carotenoids, fatty acids in investigated objects. The data indicate that the fruits are promising sources of biologically active substances cardiotonic directivity. Studied species of medicinal plants may be found further application for use in clinical practice, the treatment of cardiovascular and neurological diseases associated with hypoxia and metabolic disorders.

Keywords: Crataegus, chlorophylls, carotenoids, fatty acids

Ранее нами в плодах представителей североамериканских видов рода Боярышник были обнаружены гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, гидроксикумарины, изучен их качественный состав и количественное содержание [2, 3, 4, 8].

Изучение других классов биологически активных веществ этих объектов представляет несомненный интерес, в том числе для клинической медицины [5]. Известно, что плоды боярышников содержат липофильные вещества (жирные кислоты, каротиноиды, хлорофилл), но липиды большинства боярышников практически не изучены [1, 6, 9].

Целью нашей работы явилось определение возможности комплексной переработки сырья и более углубленное изучение химического состава липофильных соединений плодов боярышника [6, 7, 9, 11, 12].

Материалы и методы исследования

Объектами исследования стали липофильные фракции 5 видов боярышника североамериканской группы, культивируемых на территории Центрального федерального округа России: боярышника зеленого *Crataegus viridis Sarg*,, боярышника мягкого *C. mollis* (*Torr. et Grey*) *Schelle*, боярышника густоцветкового *C. densiflora Sarg*., боярышника арканзасского *C. arkansana Sarg*., боярышника веероводного *C. flabellata* (*Bosc*) *C. Koch* [10].

Для получения липофильной фракции 10,0 измельченных плодов боярышника помещали в пакет из фильтровальной бумаги и брали навеску на аналитических весах. Экстракцию проводили хлороформом в аппарате Сокслета на водяной бане до обесцвечивания экстракта в заливном патрубке и негативной реакции на жир. Колбу-приемник взвешивали до и после экстракции. Для удаления паров экстрагента колбу помещали в сушильный шкаф на 30 минут при температуре 60°С. Затем определяли процентное содержание липофильной фракции в сырье.

Исследование жирнокислотного состава плодов. Для определения качественного состава и количественного содержания жирных кислот использовали навески массой 100 мг. Экстракцию кислот из проб проводили раствором Фолча (хлороформ – метанол в соотношении 2:1) при нагревании до 40°С в течение 5 минут. Затем пробы центрифугировали при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Метилирование жирных кислот проводили следующим образом: из пробирки для центрифугирования отбирали хлороформный слой и помещали в реакци-

онную пробирку объемом 25 мл, упаривали раствор досуха в струе газообразного азота при температуре 60 °С, прибавляли 5 мл 1 % раствора кислоты серной в спирте метиловом, пробирку помещали на водяную баню на 30 минут при температуре 80 °С; охлаждали, прибавляли 3 мл воды дистиллированной и 5 мл смеси гексан – эфир в соотношении 1:1, перемешивали и после отстаивания верхнюю фракцию переносили в пробирку для центрифугирования, раствор концентрировали; остаток растворяли в 0,5–1 мл гексана, отбирали 1 мкл для внесения в газовый хроматограф.

Разделение и регистрацию жирных кислот проводили на газовом хроматографе «Хром 5» на металлической колонке длиной 2,6 метра и внутренним диаметром 0,32 см, заполненной сорбентом «Хроматон-супер» с 10 % полидитэтиленгликольсукцинатом. Анализ проб свободных жирных кислот проводили в изотермическом режиме при 195 °С и нагревании пламенного ионизационного детектора до 250 °С. Скорость газа-носителя 50 мл/мин, воды 30 мл/мин, воздуха 300 мл/мин. Идентификацию свободных жирных кислот проводили путём сравнения времени их выхода с известными метилированными эфирами жирных кислот.

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки каждой жирной кислоты отдельно, а также по их смесям с построением калибровочных кривых, по которым и определяли концентрацию каждой жирной кислоты в пробе.

Качественное определение хлорофиллов и каротиноидов. Для идентификации хлорофиллов и каротиноидов использовали одно- и двумерную хроматографию в тонком слое сорбента на пластинках «Silufol» в системах растворителей гексан – ацетон (6:4) – 1 направление, гексан – ацетон (6:3) – 2 направление.

Наличие каротиноидов определяли по характерным жёлтым и жёлто-коричневым окраскам пятен и коричневой флюоресценции в УФ-свете. В качестве проявителя использовали 2 % раствор *п*-диметиламинобензальдегида в смеси спирта этилового и кислоты хлористоводородной (реактив А). Пятна, которые соответствовали каротиноидам, имели розово-фиолетовую окраску [7]. Каротиноиды проявляли с помощью 10 % этанольного раствора кислоты фосфорномолибденовой (реактив Б) и дальнейшим нагреванием в сушильном шкафу при 60–80 °С на протяжении 5 минут. На желто-зелёном фоне обнаруживались синие пятна каротиноидов.

Хлорофиллы на хроматограммах в дневном свете имели темно-зелёное окрашивание и ярко-красную флюоресценцию в УФ-свете.

Количественное определение каротиноидов. Для количественного определения содержания каротиноидов в липофильной фракции точную навеску (m = 0,0185 г) помещали в мерную колбу объёмом 25 мл, растворяли в гексане и доводили до метки. К 2 мл полученного раствора (V_1) прибавляли 2 мл гексана, таким образом, получали 4 мл раствора (V_2). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре СФ-2000.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные липофильные фракции представляют собой смолистые жидкости жёлто-коричневого (*C. densiflora*, *C. flabellata*), и желто-зеленого (*C. mollis*, *C. viridis*, *C. arkansana*) цвета, с характерным запахом, нерастворимые в воде и спирте, растворимые в хлороформе, гексане, этилацетате.

Выход липофильной фракции, в пересчёте на абсолютно сухое сырьё, рассчитывали по формуле

$$X = \frac{m_{\text{л.ф}} \cdot 100\ \%}{m_{\text{н}}},$$

где $m_{\text{л.ф}}$ – масса липофильной фракции; $m_{\text{н}}$ – масса навески сырья.

При влажности сырья 14 % выход липофильной фракции равняется

$$X = \frac{m_{\text{л.ф}} \cdot 100 \cdot 100}{m_{\text{н}} \cdot (100 - W)},$$

где $m_{\text{л.ф}}$ – масса липофильной фракции; $m_{\text{н}}$ – масса навески сырья, взятой для анализа; W – влажность сырья.

Результаты определения выхода липофильной фракции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Выход липофильной фракции плодов боярышников

№ п/п	Вид боярышника	Масса навески сырья	Масса липофильной фракции	Выход липофильной фракции (на абсолютно сухое сырьё) (%)	Выход липофильной фракции (с учётом влажности сырья) (%)
1	*C. viridis*	20,7425	0,2400	1,16	1,34
2	*C. mollis*	21,5000	0,2800	1,3	1,55
3	*C. densiflora*	20,5991	0,1500	0,72	0,85
4	*C. arkansana*	20,6046	1,6000	7,76	9,02
5	*C. flabellata*	20,4157	0,1000	0,49	0,57

Наибольший выход липофильной фракции, как видно из таблицы, установлен для плодов *C. arkansana* (9,02 %), наименьший – плодов *C. flabellata* (0,57 %). По результатам флюоресценции, окраске пятен после обработки хромогенными реактивами и значению *Rf* вещества 6–8 отнесены к хлорофиллам, вещества 1–5 и 9 – к каротиноидам (табл. 2).

Таблица 2

Результаты хроматографического анализа хлорофиллов и каротиноидов

Номер пятна	Флюоресценция до проявления	Окраска после проявления (реактив А)	Значение *Rf*	
			I	II
1	Жёлтая	Розово–фиолетовая	0,5	0,7
2	Жёлтая	Розово–фиолетовая	1,9	2,2
3	Жёлтая	Розово–фиолетовая	2,1	2,3
4	Жёлтая	Розово–фиолетовая	2,5	2,7
5	Жёлтая	Розово–фиолетовая	3,6	3,9
6	Красная	Синяя	3,5	3,9
7	Красная	Синяя	4,0	4,2
8	Красная	Синяя	4,7	5,0
9	Жёлтая	Розово-фиолетовая	5,3	5,6

В результате хроматографического анализа в плодах исследуемых видов боярышника определено присутствие хлорофиллов и каротиноидов.

Результаты количественного определения жирных кислот приведены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, жирнокислотный состав плодов исследуемых видов боярышников неоднороден. Так, в плодах *C. viridis* найдено 11 жирных кислот; *C. mollis* и *C. arkansana* – 8; *C. densiflora* – 7; *C. flabellata* – 9. В исследуемых видах идентифицировано 11 жирных кислот, 2 из которых (линолевая и линоленовая) являются незаменимыми (входят в состав комплекса витамина F) [10, 11, 12]. Доминирующими во всех видах являются (мкг/100 мг): пальмитиновая (182,5–1735), олеиновая (625–6667), стеариновая (20–667) и линолевая (960–24000) кислоты. Декановая и лауриновая кислоты обнаружены в *C. viridis*; тридекановая – в *C. viridis* и *C. mollis*; пентадекановая – *C. viridis* и *C. flabellata*; гептодециновая – в *C. viridis* и *C. mollis*.

Таблица 3

Жирнокислотный состав липофильной фракции плодов боярышников

№ п/п	Название кислоты	Общая формула	Содержание жирных кислот в плодах боярышников, мкг/100 мг				
			C. viridis	*C. mollis*	*C. densiflora*	*C. arkansana*	*C. flabellata*
1	Декановая	$C_{10:0}$	2,50	–	–	–	–
2	Лауриновая	$C_{12:0}$	5,00	–	–	–	–
3	Тридекановая	$C_{13:0}$	6,25	9,00	–	–	сл.
4	Миристиновая	$C_{14:0}$	25,00	80,00	120,00	270,00	50,00
5	Пентадекановая	$C_{15:0}$	5,00	–	–	–	40,00
6	Пальмитиновая	$C_{16:0}$	182,50	1160,00	1080,00	1735,00	500,00
7	Гептодециновая	$C_{16:1}$	20,00	100,00	сл.	сл.	сл.
8	Стеариновая	$C_{18:0}$	75,00	240,00	360,00	667,00	20,00
9	Олеиновая	$C_{18:1}$	625,00	2300,00	3780,00	6667,00	2200,00
10	Линолевая	$C_{18:2}$	960,00	6600,00	9300,00	24000,00	5600,00
11	Линоленовая	$C_{18:3}$	45,00	120,00	сл.	сл.	140,00
Сумма ненасыщенных кислот			1650,00	9120,00	13080,00	30667,00	7940,00
Сумма насыщенных кислот			301,25	1489,00	1560,00	2672,00	610,00

Для установления содержания каротиноидов показатели оптической плотности определяли на приборе СФ-2000. Для *C. viridis*. он составляет 0,939; для *C. mollis* – 0,978; для *C. densiflora* – 0,796; для *C. arkansana* – 1,054; для *C. flabellata* –

0,911. Удельное поглощение ($E_{1см}^{1\%}$) для суммы каротиноидов в гексане при длине волны 453 нм принимается равным 2592. Содержание суммы каротиноидов определяли по формуле

$$X = \frac{10 \cdot D \cdot V \cdot V_2}{E_{1см1}^{1\%} \cdot V \cdot a},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора при определённой длине волны (45 нм); $E_{1см}^{1\%}$ – для β-каротина при длине волны 453 нм составляет 2592; 10 – содержание каротина в 1 мл 1%-го раствора, мг; V – общий объём экстракта, мл; V_1 – объём экстракта, взятый для хроматографирования, мл; V_2 – объём элюата, мл; a – навеска, г.

Метрологическая характеристика определения каротиноидов представлена в табл. 4.

Таблица 4

Метрологическая характеристика количественного определения каротиноидов в плодах боярышников

m	n	X_i	$X_{ср}$	S^2	$S_{ср}$	P	$t\,(P, n)$	Доверительный интервал	ε, %
C.viridis									
5	4	9,3125 9,5020 9,7535 9,8540 9,9125	9,6669	0,063904175	0,11305236	0,95	2,78	9,6669 ± 0,3143	3,2512
C.mollis									
5	4	9,7630 9,8125 9,8670 9,9435 9,9580	9,8688	0,006975825	0,03735191	0,95	2,78	9,8688 ± 0,1038	1,0522
C.densiflora									
5	4	7,8950 7,9565 7,9865 8,1525 8,0925	8,0166	0,010883550	0,04665522	0,95	2,78	8,0166 ± 0,1297	1,6179
C.arkansana									
5	4	10,45 10,65 10,76 10,86 11,31	10,8048	0,101014142	0,14213665	0,95	2,78	10,8048 ± 0,3951	3,6571
C.flabellata									
5	4	9,0257 9,1015 9,2370 9,6535 9,4530	9,2941	0,066702823	0,11550136	0,95	2,78	9,2941 ± 0,3211	3,4548

Количественное содержание каротиноидов для *C. viridis* составляет 9,66 мг%, *C. mollis* – 9,86 мг%, *C. densiflora* – 8,01 мг%, *C. arkansana* – 10,8 мг%, *C. flabellata* – 9,29 мг%.

Выводы

Определено содержание липофильных веществ в плодах боярышника зеленого *Crataegus viridis Sarg*,, боярышника мягкого *C. mollis* (*Torr. et Grey*) *Schelle*, боярышника густоцветкового *C. densiflora Sarg*., боярышника арканзасского *C. arkansana Sarg*., боярышника вееровидного *C. flabellata* (*Bosc*) *C. Koch*, относящихся к североамериканской группе боярышников. Исследован качественный состав хлорофиллов, каротинои-

дов, жирных кислот. Выход липофильных фракций из плодов исследуемых боярышников с учётом влажности сырья составляет от 0,57 до 9,02 %. В плодах идентифицировано 11 жирных кислот. Установлено, что доминирующими во всех видах (мкг/100 мг) являются пальмитиновая (182,5–1735), олеиновая (625–6667), стеариновая (20–667) и линолевая (960–24000) кислоты. Содержание каротиноидов в плодах составляет от 8,01 до 10,8 мг %. Полученные данные расширяют сведения о химическом составе растений рода Боярышник и могут быть использованы для создания новых фитопрепаратов.

Список литературы

1. Бубенчикова В.Н., Сухомлинов Ю.А., Гончаров Н.Ф. Аминокислотный состав некоторых представителей семейства Розоцветных // Человек и его здоровье. – 2009. – № 3. – С. 134–137.

2. Евдокимова О.В., Самылина И.А., Нестерова О.В. Изучение липофильной фракции плодов боярышника // Фармация. – 1992. – № 3. – С. 60–61.

3. Гончаров Н.Ф., Ковалёва А.М., Комисаренко А.Н., Сидора Н.В., Авидзба Ю.Н. Изучение фенольных соединений плодов североамериканских видов рода боярышник // Человек и лекарство: тезисы докл. XIII. Рос. нац. конг. (3–7 апр. 2006 г.). – М., 2006. – С. 12.

4. Гончаров Н.Ф. Гидроксикоричные кислоты нефармакопейных видов рода боярышник // Научные Ведомости Белгородского государственного университета. Медицина. Фармация. – 2014. – № 11 (182). – Вып. 26/1. – С. 187–190.

5. Гончаров Н.Ф., Михайлов И.В, Гончаров Н.Н. Гидроксикоричные кислоты цветков и листьев нефармакопейных видов рода боярышник // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9–1. – С. 146–148.

6. Гончаров Н.Ф., Михайлов И.В., Гончаров Н.Н. Опыт применения контролируемого барьера при использовании кардиотонического препарата на основе боярышника // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – С. 254.

7. Кудрицкая С.Е. Каротиноиды плодов и ягод. – Киев: Вища школа, 1990. – 221 с.

8. Рудаков О.Б., Перикова Л.И., Болотов В.М., Сташина Г.А. Хроматографическое определение натуральных и искусственных каротиноидов в пищевых продуктах // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – Вып 1. – С. 78–84.

9. Ковальова А.М., Сидора Н.В. Гончаров Н.Ф., Вількер А.Л. Стандартизація плодів нефармакопейних видів глоду // Фітотерапія. Часопис. – 2007. – № 2. – С. 54–56.

10. Bunnel R.H. In: TheVitamins. – 2-nded. – N.Y., L., 1967. – 200 p.

11. Foster. S., Duke. J.A. A Field Guideto Medicinal Plants. – Eastern and Central N. America, Houghton Mifflin Co. – 1990. – P. 150.

12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes // Methods Enzymol. – 1987. – Vol. 148. – P. 350–382.

13. Handbook of Plant Science. – 2 Vol. Set. Keit Roberts (Editor). – Hardcover, 2007. – 1648 p.

References

1. Bubenchikova V.N., Suhomlinov Ju.A., Goncharov N.F. Aminokislotnyj sostav nekotoryh predstavitelej semejstva Rozocvetnyh // Chelovek i ego zdorov'e. 2009. no. 3. pp. 134–137.

2. Evdokimova O.V., Samylina I.A., Nesterova O.V. Izuchenie lipofil'noj frakcii plodov bojaryshnika // Farmacija. 1992. no. 3. pp. 60–61.

3. Goncharov N.F., Kovaljova A.M., Komisarenko A.N., Sidora N.V., Avidzba Ju.N. Izuchenie fenol'nyh soedinenij plodov severoamerikanskih vidov roda bojaryshnik // Chelovek i lekarstvo: tezisy dokl. XIII. Ros. nac. kong. (3–7 apr. 2006 g.). M., 2006. pp. 12.

4. Goncharov N.F. Gidroksikorichnye kisloty nefarmakopejnyh vidov roda bojaryshnik // Nauchnye Vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Medicina. Farmacija. 2014. no. 11 (182). Vyp. 26/1. pp. 187–190.

5. Goncharov N.F., Mihajlov I.V, Goncharov N.N. Gidroksikorichnye kisloty cvetkov i list'ev nefarmakopejnyh vidov roda bojaryshnik // Fundamental'nye issledovanija. 2011. no. 9–1. pp. 146–148.

6. Goncharov N.F., Mihajlov I.V., Goncharov N.N. Opyt primenenija kontroliruemogo bar'era pri ispol'zovanii kardiotonicheskogo preparata na osnove bojaryshnika // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2012. no. 1. pp. 254.

7. Kudrickaja S.E. Karotinoidy plodov i jagod. Kiev: Vishha shkola, 1990. 221 p.

8. Rudakov O.B., Perikova L.I., Bolotov V.M., Stashina G.A. Hromatograficheskoe opredelenie natural'nyh i iskusstvennyh karotinoidov v pishhevyh produktah // Vestnik VGU. Serija: Himija. Biologija. Farmacija. 2004. Vyp 1. pp. 78–84.

9. Koval'ova A.M., Sidora N.V. Goncharov N.F., Vil'ker A.L. Standartizacija plodiv nefarmakopejnih vidiv glodu // Fitoterapija. Chasopis. 2007. no. 2. pp. 54–56.

10. Bunnel R.H. In: TheVitamins. 2-nded. N.Y., L., 1967. 200 p.

11. Foster. S., Duke. J.A. A Field Guideto Medicinal Plants. Eastern and Central N. America, Houghton Mifflin Co. 1990. pp. 150.

12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes // Methods Enzymol. 1987. Vol. 148. pp. 350–382.

13. Handbook of Plant Science. 2 Vol. Set. Keit Roberts (Editor). Hardcover, 2007. 1648 p.

Рецензенты:

Покровский М.В., д.м.н., заведующий кафедрой фармакологии, руководитель центра доклинических и клинических исследований, ФГАОУ ВПО НИИ «БелГУ» Министерства науки и образования РФ, г. Белгород;

Кочкаров В.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник, ООО «Научный центр «Белфарма», г. Белгород.

Работа поступила в редакцию 06.10.2014.