

УДК 581.192.547
ББК 28.4

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАГЕНТОВ НА СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ КОРНЕЙ И КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ *PAEONIA ANOMALA L.*

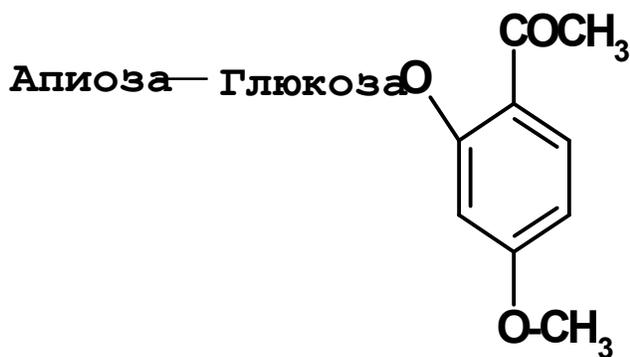
Зарипова А. А., Шаяхметов И. Ф., Баширова Р. М., Байбурина Р. К.*

*Изучено содержание пеонифлорина в растительных экстрактах *P. anomala*. Показано, что каллусная ткань пиона уклоняющегося и растения-регенеранты являются перспективными продуцентами фенольных соединений. Экстракты, полученные из корней растений-регенерантов и каллусной ткани не уступают по содержанию биологически активных веществ экстрактам корневищ растений из природного местообитания. Использование этанола в качестве экстрагента является наиболее перспективным для получения действующих веществ из биомассы культивируемых *in vitro* тканей.*

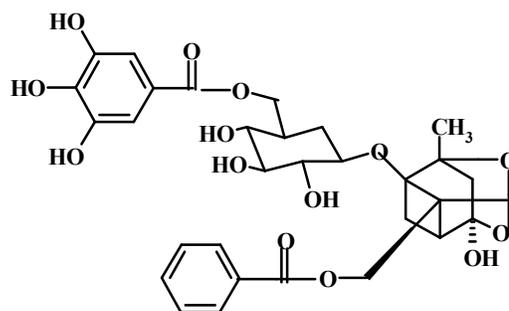
Наряду с поисками новых лекарственных растений проводится углубленное изучение ранее известных фармакопейных растений, их интродукция и введение в культуру *in vitro*. К таким растениям относится пион уклоняющийся *Paeonia anomala L.* (syn. *P. sibirica* Pallas) – ценное лекарственное растение семейства пиониевых *Paeoniaceae*. Растение широко используется в народной медицине Западной Сибири под названием «Марьин корень» в качестве противовоспалительного, протистоцидного, бактерицидного средства при желудочно-кишечных заболеваниях [1]. В государственный реестр лекарственных средств включены как корневища и корни (№ 95/124/6), так и трава *P. anomala* (№ 72/736/2/7) [2]. В научной медицине используют 40 % спиртовую настойку из равных по массе сухих надземных и подземных частей пиона ук-

лоняющегося (*Tinctura Paeoniae*) как седативное средство при неврастении, вегетативно-сосудистой дистонии и др. *P. anomala* входит в состав пищевой добавки «Нейростабил» рекомендуемой при нарушениях функциональной активности желудка и печени, нервных и простудных заболеваниях [3].

Лечебные эффекты корня пиона связаны с наличием в нем 1,10-1,59 % эфирного масла, содержащего более чем 30 компонентов. Считают, что ведущую роль в фармакологической активности экстрактов *Paeonia* играет монотерпеновый гликозид – пеонифлорин, содержание которого колеблется от 0,05 до 6,01 % [4]. В Японии подлинность сырья оценивается по наличию пеонифлорина и его бензоил- и оксипроизводных [5], рассматриваемых как перспективное средство профилактики старческого слабоумия [6].



Апиопионозид



Галлопеонифлорин

* Зарипова Альфия Ануровна – младший научный сотрудник Ботанического сада-института УНЦ РАН.

Шаяхметов Изгам Фазлиахметович – профессор кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ.

Баширова Раиса Миннуловна – доцент кафедры физиологии растений БашГУ

Байбурина Рима Кашафовна – старший научный сотрудник, зав. лабораторией морфогенеза и биотехнологии растений Ботанического сада-института УНЦ РАН

Монотерпеновые гликозиды представляют собой пролонгированные, полифункциональные антибиотики, при расщеплении которых высвобождаются как соединения бензойной и галловой кислот, подавляющие патогенную кишечную микрофлору, так и монотерпеноиды, оказывающие антиспастическое и противоспазмолитическое действие [5]. Производные пеонифлорина как в свободном виде, так и в форме соединений с галлотанинами ингибируют агрегацию тромбоцитов, вызванную тромбином, арахидоновой кислотой и коллагеном. Пион широко применяется в составе гепатопротекторных и противоопухолевых сборов [7].

Основным препятствием для расширения производства препаратов на основе пиона уклоняющегося является дефицит сырья, более того пион занесен в «Красную книгу СССР» [8]. Для увеличения сырьевой базы *P. anomala* необходимо введение растения в культуру, в том числе с использованием биотехнологических методов.

В связи с тем, что закономерности синтеза вторичных метаболитных соединений в клетках *in vitro* отличаются от таковых в интактных растениях, а установленные закономерности этого процесса в культуре клеток противоречивы, перед нами была поставлена задача провести сравнительное изучение содержания биологически активных веществ в растительных тканях интактного растения и биомассе культуры *in vitro* с использованием различных экстрагентов.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили:

1) корни *P. anomala* генеративного периода развития из природного местообитания (контроль); 2) корни молодого генеративного растения, интродуцированного в Ботаническом саду Уфимского научного центра РАН; 3) корни растения-регенеранта прегенеративного периода развития; 4) каллусная ткань, полученная из почки возобновления.

P. anomala был интродуцирован в Уфимский Ботанический сад-институт РАН из Татышлинского района республики Башкортостан. Стерилизацию сред, растительного материала проводили по стандартным методикам. В качестве экспланта для получения каллусной ткани использовали почки возобновления, которые культивировали на агаровой среде Мурасиге и Скуга с содержанием сахарозы 3%.

Образцы тканей растений растирали и экстрагировали гидрофобные вещества в течение суток хлороформом, после чего экстрагировали производные пеонифлорина и фенольные соединения с использованием в качестве экстрагента метанол и этанол. Содержание пеонифлорина оценивали на основании прямого спектрофотометрирования метанольных и этанольных экстрактов при длине волны 231,7 нм (ϵ 1% 1 см = 265,4) [5]. Содержание флавоноидов определяли по цветным комплексным соединениям с хлористым алюминием. Содержание катехинов в сравниваемых образцах оценивали по реакции с ванилином при $\lambda=500$ нм [9]. Содержание пеоновых лактонов оценивали в метанольном экстракте используя реакцию с пикратом.

Интегральную характеристику полученных экстрактов проводили путем сравнения спектров поглощения на спектрофотометре СФ-121 в диапазоне волн 200-350 нм.

Результаты и обсуждение

Кривые светопоглощения метанольных экстрактов имели два четко выраженных пика при $\lambda=232$ и $\lambda=275$ нм характерные для пеонифлорина (рис.1), причем в корнях растений, полученных из природных местообитаний содержание этого терпенового гликозида было минимальным.

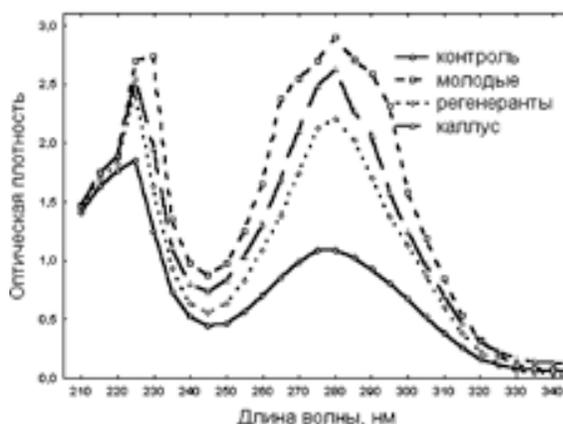
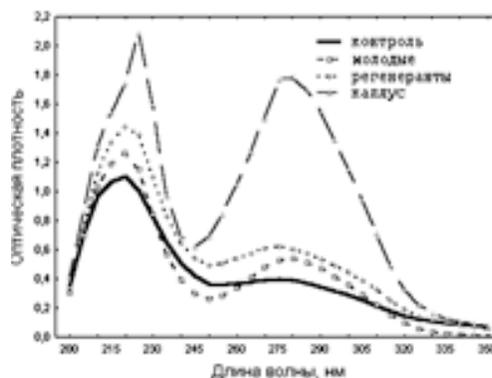


Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов *P. anomala* в метаноле

Судя по оптической плотности метанольного экстракта, в корнях молодых растений содержание пеонифлорина было на 80 % выше, чем в контрольном растении. Как известно, максимальное содержание гликозидов сосредоточено снаружи камбия в клетках вторичной флоэмы [10]. Следовательно в тонких, разветвленных корнях содержание гликозидов выше, чем в толстых. В каллусной культуре содержание этого гликозида было выше, чем в корнях дикорастущих растений на 44 %, и на 26 % ниже чем в корнях растений-регенерантов.

Рис.2. Спектры поглощения экстрактов *P. anomala* в этаноле

Использование этанола в качестве экстрагента показало более высокую оптическую плотность экстракта из каллусной ткани (рис.2). Сравнение спектров поглощения метанольных и этанольных экстрактов из разных тканей пиона показывает, что метанол обладает высокой экстрагирующей способностью обеих фракций фенольных соединений. В этанольном же экстракте наиболее полно представлены соединения из каллусной ткани, тогда как вещества из корней с максимумом спектра поглощения при 275 и 290 нм представлены в незначительном количестве. Это свидетельствует о том, что биологически активные вещества из тканей интактного растения плохо экстрагируются этанолом, особенно те, которые соответствуют второму пику с максимумом поглощения 290 нм.

Сравнение полученных спектров в области, соответствующей поглощению фенольных соединений, показывает наиболее высокое содержание фенольных соединений в корнях молодых растений. Судя по максимуму светопоглощения это могут быть фенольные кислоты. Наименьшее содержание низкомолекулярных фенольных соединений отмечено в корнях взрослых растений, где визуально отмечается высокое содержание флобафенов. Очевидно, что с возрастом растения накапливают более конденсированные фенольные соединения. Как известно, в китайской медицине используют корни диаметром 4-6 см, в которых сформировались морфологические структуры, накапливающие флобафены [11].

Высокое содержание фенольных соединений отмечено в молодых корнях и каллусной ткани. Очевидно, это связано с тем, что именно эти образцы тканей характеризуются самой высокой удельной поверхностью, где и сосредоточено максимальное количество фенольных соединений. Следует отметить, что способность более активно синтезировать танниновые производные пентагаллоилглюкозы в культуре ткани нежели в интактном растении отмечена также у представителя кизиловых — *Cornus officinalis* [12]. Соответственно экстракты поверхностной части корня *P. suffruticosa* ингибируют эластазную активность более эффективно, нежели экстракты целостного корня [13].

Сопоставление оптических свойств сравниваемых экстрактов после внесения пикрата натрия, реагирующего с лактонным кольцом, позволяет сделать вывод, что содержание пеониллактонов в них существенно не отличается.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что каллусная культура *P. anomala* является перспективным продуцентом монотерпеновых гликозидов и фенольных соединений. Метанольные экстракты, полученные из корней регенерантов и каллусной культуры, не уступают по содержанию биологически активных веществ экстрактам корневищ дикорастущих и интродуцированных растений. Учитывая, что в медицинской практике используют этанольные экстракты пиона, можно заключить о целесообразности получения действующих веществ из биомассы культивируемых *in vitro* тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Минаева В. Г. Пион марьин корень — *Paeonia anomala* L. // Лекарственные растения Сибири. Новосибирск. Наука. 1991. С. 146-148.
2. Государственный реестр лекарственных средств. М. МЗРФ. 2000.
3. Пилат Т. Л., Иванов А. А. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение). М. Аваллон, 2002 С. 328.
4. Radix *Paeoniae*. WHO monographs Reports on selected medicinal Plants. Geneva. P. 195 – 201.
5. Koide T, Iwata M, Saito H, Tanimoto [Paeoniflorin Reference Standard (Control 011) of National Institute of Health Sciences]/Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. 2002; (120), p. 124-127.
6. Ohta H. et al. Paeoniflorin attenuates learning impairment of aged rats in operant brightness discrimination task // Pharmacology, biochemistry and behavior. 1994. 49. P. 213 – 217.

7. Oh G. S., Pae H.O., Oh H. et al. In vitro antiproliferative effect of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose on human hepatocellular carcinoma cell line, SK-HEP-1 cells // *Cancer letters*, 2001, 174(1), P. 17 – 24.
8. Красная книга СССР: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. Т. 2 / Главная ред. коллегия: А. М. Бородин, А. Г. Банников, В. Е. Соколов и др. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – Лесн. Пром-сть, 1984. – 480 с.
9. Ferreira E. C., Nogueira A. R. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry // *Talanta*. 2000. 51. P.1-6.
10. Shan S.-J., Waporin P., Fukuda et al. Elisa, Western Blotting, Immunolocalization and Immunoaffinity Column for naturally occurring bioactive compounds using monoclonal antibodies // *J. of food and drug analysis*. 2000. Vol.8, N4, P.258 – 269.
11. Paeony (*Paeonia spp.*) // *Alternative medicine review*. 2001. Vol. 6, N 5, P. 495 – 499.
12. Jazaki K., Okuda T. Gallotannin production in cell cultures of *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. // *Plant cell repts*. 1989. Vol. 8, P. 346 – 349.
13. Lee K.-K., Kim J.H., Cho J.J. et al. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects // *International j. of cosmetic science*. 1999. 21. P. 71 – 82 .