

Статья поступила в редакцию 08.08.2016 г.

Yegorova N.A., Stavtseva I.V., Mitrofanova I.V. Influence of cultivar and cultivation factors *in vitro* on the essential oil rose clonal micropropagation // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 36-43.

The development of meristem cultures of five essential oil rose cultivars (Lany, Raduga, Lada, Michurinka, Festivalnaya) was investigated on the second stage of micropropagation, depending on the composition of the culture medium, genotype and number of subcultures *in vitro* were studied as well. The efficiency of MS used for medium propagation, supplemented with 1,0 mg/l BAP, 0,2 mg/l IAA, 0,5 mg/l gibberellic acid was revealed in terms of the research. . When analyzing the development of meristem cultures during 9 subcultivations it was shown that the reproduction coefficient increased by the third subcultivation, reaching maximum for 'Raduga'(15.7) and 'Michurinka' (13.2), and subsequently – ranged from 4,6 to 8,2, depending on cultivar and a number of subcultivations.

Keywords: *cultivar; Rosa damascena; R. gallica; R. alba; meristem culture; subcultivation; micropropagation*

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 58.08:543.05

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

Виктор Николаевич Бехтерев^{1,2}, Татьяна Михайловна Коломиец¹,
Валентина Ивановна Маляровская¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,
Россия, Сочи
malyarovskaya@yandex.ru

²Сочинский государственный университет, Россия, Сочи
vic-bekhterev@yandex.ru

Показано, что применение метода экстракционного вымораживания позволяет существенно повысить селективность экстракции природных органических веществ. Этот метод позволил уже на начальной стадии экстракции органических веществ из корней иглицы понтийской *Ruscus ponticus* Woronow отделить углеводы от стероидных сапонинов. Установлено, что углеводный состав органической и водной фазы экстракта иглицы существенно отличается. Применение экстракционного вымораживания на этапе извлечения целевых компонентов позволяет отделять углеводы от остальных фракций БАВ, оставляя сахара преимущественно в водной фазе, при этом суммарная концентрация фруктозы, глюкозы и сахарозы в водной части ($\approx 0,9\%$), что выше, чем в ацетонитрильной фракции ($\approx 0,3\%$). В этанольных экстрактах синеголовника морского *Eryngium maritimum* L. с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии идентифицирован ряд ценных БАВ, в том числе фалкаринол (относительное содержание которого, $\approx 18\%$) и стигмастерол (относительное содержание $\approx 23\%$).

Ключевые слова: *Иглица понтийская; Синеголовник морской; экстракционное вымораживание; хроматография.*

Введение

Сохранение биологического разнообразия – одна из важнейших задач в деле охраны природы. Связано это с ограниченностью необходимых для существования человека биологических ресурсов и угрозой их истощения. На территории Западного

Кавказа сосредоточено более 65% редкого генофонда, подлежащего охране на государственном и региональном уровнях.

Интерес к изучению биохимического состава редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа обусловлен, с одной стороны, необходимостью более глубокого понимания особенностей их физиологии, роли тех или иных природных химических соединений в повышении устойчивости к неблагоприятным условиям внешней среды с целью сохранения регионального фиторазнообразия [1]. С другой стороны, он связан также с поиском биологически активных веществ (БАВ), которые могли бы в перспективе стать прототипами разрабатываемых биологически активных синтетических аналогов и лекарственных средств.

В этой связи, актуальным является внедрение новых технологий выделения и концентрирования целевых органических соединений из растительного материала. Важнейшими критериями методов извлечения должны быть высокая эффективность, снижение термического и химического воздействия на исследуемый образец, оптимизация, сокращение временных затрат и многостадийности процедуры, как следствие, уменьшение потерь извлекаемых компонентов.

Целью настоящей работы было исследование биохимического состава иглицы понтийской *Ruscus ponticus* Woronow и синеголовника морского *Eryngium maritimum* L. редких и исчезающих видов растений флоры Западного Кавказа, а также оценка эффективности метода экстракционного вымораживания (ЭВ) [2].

Иглица понтийская (*Ruscus ponticus* Woronow) – реликтовое растение третичного периода, ареалом распространения в России которого является Крым и Кавказ. Корневище иглицы содержит стероидные сапонины – рускозиды, состоящие из агликона – рускогенина или его изомера неорускогенина и углеводной части, присоединенной к С₁-гидроксилу и содержащей до 4-х молекул сахаридов (раминоза, глюкоза, арабиноза) и целый ряд других БАВ [3, 4].

Синеголовник морской (*Eryngium maritimum* L.) редкий, исчезающий вид флоры Западного Кавказа. В России он произрастает в Калининградской области, Ростовской области, а также в Краснодарском крае. Синеголовник можно встретить в Западном Закавказье: в районе береговой линии от Туапсе до Адлера (окр. г. Туапсе, от р. Шахе до р. Псоу, берег моря у пос. Аше, Кучук-Дере, г. Сочи, (мыс Константиновский, к. п. Адлер, окр. с. Веселое) [4]. В Красной книге РФ *Eryngium maritimum* имеет категорию статуса 2 (таксоны и популяции с неуклонно сокращающейся численностью, которые при дальнейшем воздействии факторов, снижающих численность, могут в короткие сроки попасть в категорию находящихся под угрозой исчезновения). Причинами сокращения ареала являются усиление хозяйственной деятельности человека в естественных местах обитания, а также использование растения в лекарственных целях.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлось растительное сырье иглицы понтийской, собранной в октябре 2014г. в районе горы Благодать г.Сочи, и синеголовника морского, собранного в июле 2014г. в районе Нижнеимеретинской низменности г.Сочи.

Экстракцию свободных сапонинов из высушенного на воздухе измельченного корня Иглицы осуществляли смесью воды с ацетонитрилом в соотношении 1:1 при кипячении в стеклянной колбе с обратным холодильником в течение 2 часов. Объем экстрагента брали такой, чтобы над поверхностью пробы был его слой толщиной не менее 1 см. Полученные ацетонитрильные экстракты с целью удаления воды и углеводов, извлечения БАВ в органический растворитель подвергали экстракционному вымораживанию в условиях центрифугирования пробы (ЭВЦ) на лабораторной установке, описанной в [5, 6], в стеклянных виалах емкостью 12 мл (National Scientific)

с герметично завинчивающимися пробками. Условия концентрирования экстракта: скорость вращения ротора – 4000 об./мин (фактор разделения 1450g), температура – минус $28 \pm 1^\circ\text{C}$, время процедуры – 25 мин. В результате кристаллическая фаза льда с дисперсными твердыми частицами находилась внизу виалы, в верхней части – прозрачный светло-желтый ацетонитрильный экстракт. Получаемые ацетонитрильные экстракты объединяли и затем концентрировали с помощью вакуумно-ротационного испарителя «Rotavapor R215». Окраска концентрата – желто-коричневая.

Определение углеводов (моно- и дисахаридов) в экстрактах иглицы понтийской осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с рефрактометрическим детектированием по методике [8] на аналитическом комплексе-хроматографе «Accela-600» (Thermo Scientific, USA). В основе метода лежит обращено-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) определения углеводов, активно применяемый в настоящее время в анализе пищевых продуктов, БАД и решении научно-исследовательских задач. Нижний предел обнаружения сахаров составлял 0,5 г/кг. Условия хроматографирования:

- температура детектора $+36^\circ\text{C}$, температура колонки $+35^\circ\text{C}$;
- элюент 20 % ацетонитрил в дистиллированной воде, скорость потока 800 мкл/мин;
- колонка с неподвижной аминопропильной фазой Restek Ultra Amino Columns (USP L8) $3\ \mu\text{m}$ (100\AA), длиной 100 мм, внутренним диаметром 3 мм;
- объем инжестируемой пробы 10 мкл.

Определение углеводов в экстрактах иглицы понтийской проводили методом абсолютной калибровки. Расчет содержания C_x (%) изучаемых сахаридов осуществляли по формуле, усредняя результат в серии определений:

$$c_x = \frac{m_{cm} \times S_x \times 100}{S_{cm} \times M_{np}} \quad (1)$$

где m_{cm} – масса определяемого компонента в стандартном образце, г;

S_x и S_{cm} – площади хроматографического максимума определяемого компонента на хроматограммах пробы и в стандартном образце;

M_{np} – масса аналитической навески взятой на исследование пробы, г.

Извлечение природных органических веществ из свежего растительного материала синеголовника (1 г) вели путем мацерации при комнатной температуре 95% этанолом (5 мл) в пенициллиновом флаконе с полиэтиленовой пробкой после измельчения. Продолжительность стадии мацерации с периодическим перемешиванием (четыре-пять раз в сутки) составляло 7 дней. Компонентный состав экстракта изучали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии на основе электронной базы спектральных данных NIST. Использовали газовый хроматограф “Focus SSL/DSQ” Thermo Scientific (USA), детектор DSQ II с ионизацией электронным ударом 70 эВ, колонка TR-5MS $30\text{m} \times 0.25\text{mm}$ ID=0.25мкм, режим программирования $T_{\text{кол.}}$: 70°C – 1 мин, затем 30°C /мин до 280°C , $T_{\text{инж.}}$: 230°C

Результаты и обсуждение

Изучение биохимического состава получаемых экстрактов иглицы понтийской является важным этапом поиска и разработки наиболее оптимальных технологических решений получения природных БАВ из растительных объектов.

На рисунках 1 и 2 приведены хроматограммы углеводного состава ацетонитрильного экстракта корневища иглицы и водной части исходного извлечения после процедуры ЭВЦ.

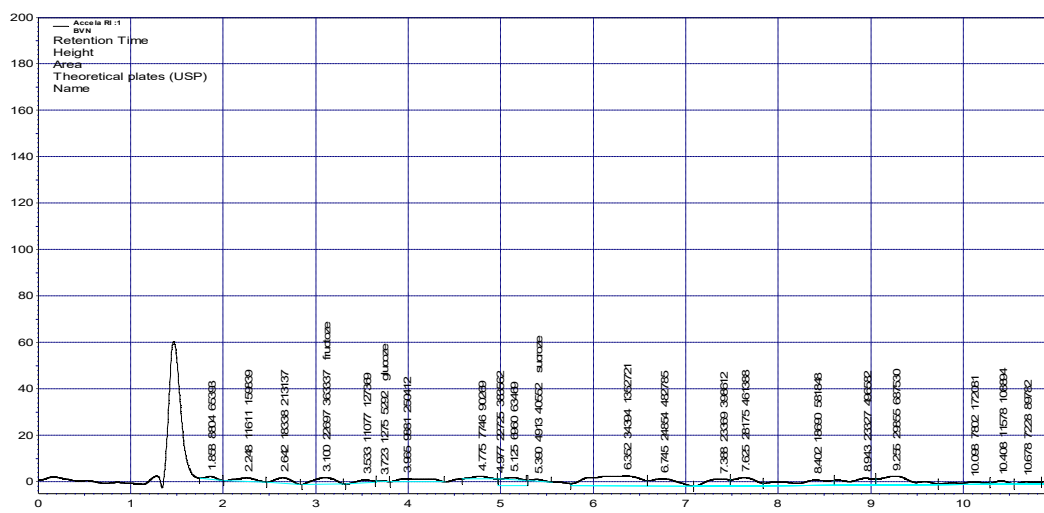


Рис. 1 ВЭЖХ исследование ацетонитрильного экстракта корня иглицы понтийской после процедуры ЭВЦ в режиме определения сахаридов

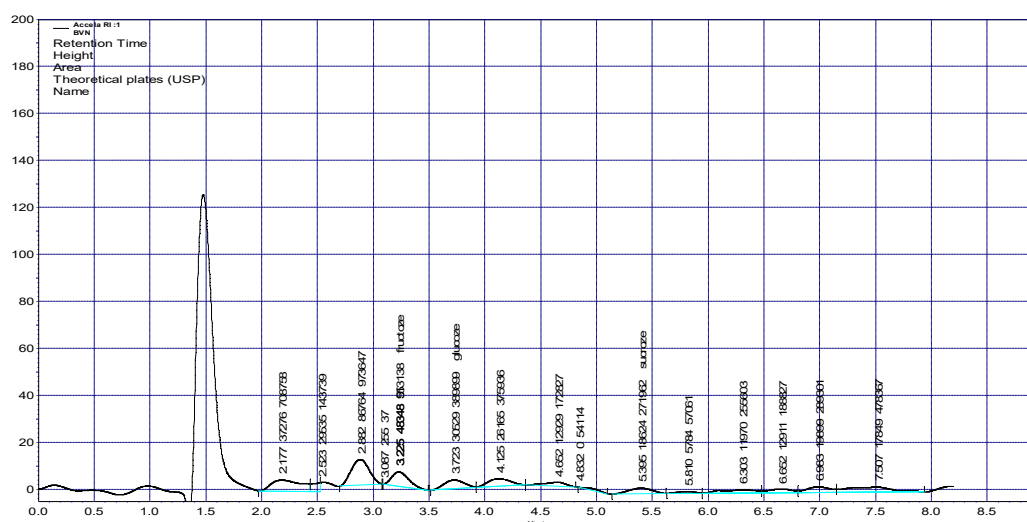


Рис. 2 ВЭЖХ исследование водной фракции экстракта корня иглицы понтийской после процедуры ЭВЦ в режиме определения сахаридов

Анализ представленных хроматограмм (рис. 1, 2) с учетом результатов количественного определения сахаридов методом ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием в полученных экстрактах иглицы (таб. 1) свидетельствует, что применение экстракционного вымораживания на этапе извлечения целевых компонентов позволяет отделять углеводы от остальных фракций БАВ, оставляя сахара преимущественно в водной фазе. Суммарная концентрация фруктозы, глюкозы и сахарозы в водной части ($\approx 0,9\%$) втрое выше, чем в ацетонитрильной фракции ($\approx 0,3\%$).

В отличие от известной технологии выделения сапонинов из корней иглицы [8], в которой в качестве экстрагента используют водно-спиртовую смесь, получаемые ацетонитрильные экстракты после ЭВЦ упариваются до сухого состояния на порядок быстрее. Объяснением, на наш взгляд, является низкое содержание углеводов, которые в результате данной процедуры концентрируются в водной части образца. Следовательно, использование метода экстракционного вымораживания позволяет повысить избирательность выделения изучаемых природных органических соединений из растительной массы (табл. 1).

Таблица 1

Содержание сахаридов в экстрактах иглицы понтийской после выполнения ЭВЦ

Экстракт	Содержание сахаров, %		
	фруктоза	глюкоза	сахароза
Ацетонитрильная фракция (органическая фаза)	0,04	0,17	0,13
Водная часть	0,28	0,36	0,21

При хромато-масс-спектрометрическом исследовании спиртовых экстрактов синеголовника морского был идентифицирован ряд эндогенных органических веществ и определено их относительное содержание: эндо-1,5,6,7-тетраметилбицикло[3,2]гепт-6-ен-3-ол; 2-гидрокси-4-изопропил-7-метокситропан; 3,4-гексадиеналь,2-бутил-2-этил-5-метил; 1-(4-метоксифенил)-1-циклогексанкарбоновая кислота; эремофилен; (-)- α -панасинсен; 2,4,5-трихлорфенил-4-(октилокси)бензоат; 3-метил-2-бутеновой кислоты 2,6-диметилнон-1-ен-3-ин-5-иловый эфир; 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол; этилпальмитат; фалкаринол; фитол; этиллиноленат; стигмастерол (рис. 3).

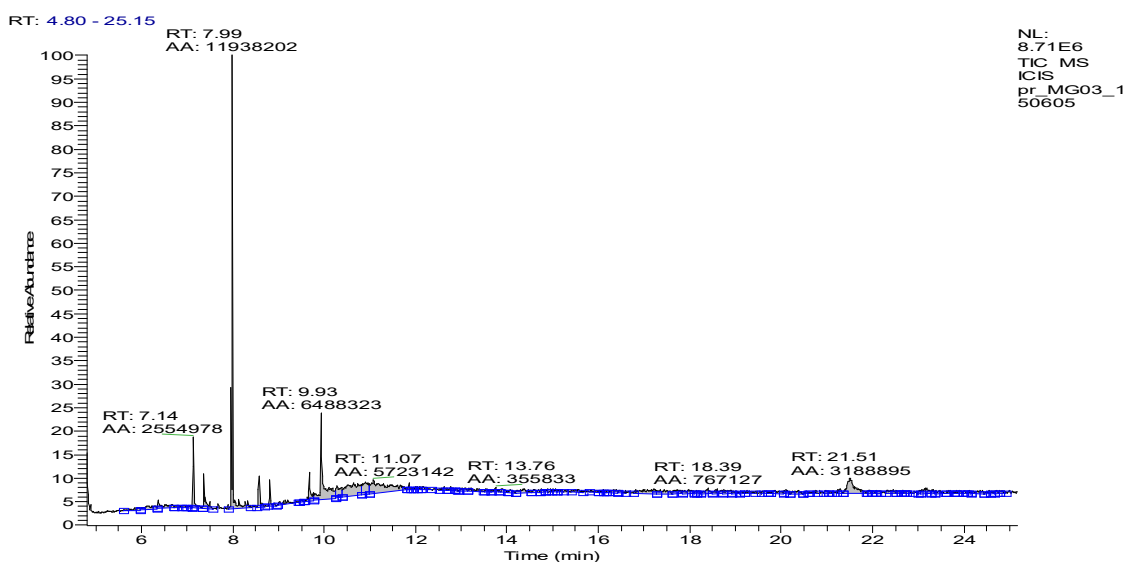


Рис. 3 ГХ-МС исследование этанольного экстракта синеголовника

Из общего количества обнаруженных в этанольных вытяжках органических соединений с наибольшей степенью достоверности (до 70%) идентифицированы фалкаринол (относительное содержание \approx 18%) и стигмастерол (относительное содержание \approx 23%). Это ценные биологически активные вещества, которые используются в медицине. Являясь непредельными соединениями, могут быть отнесены к классу натуральных антиоксидантов. Так, к примеру, фалкаринол содержится в корнях американского женьшеня. Стигмастерол, входящий в состав структурных компонентов клеточных мембран, также является типичным представителем природных органических веществ.

Заключение

Таким образом, методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии установлена возможность повышения селективности выделения целевых природных органических соединений уже на стадии сепарации и экстракции за счет применения способа ЭВ в сочетании с центрифугированием.

В биологических пробах у эндемичного вида синеголовника морского определены и идентифицированы четырнадцать эндогенных органических веществ, среди них ряд ценных БАВ, в том числе фалкаринол и стигмастерол.

Полученные результаты перспективны и могут быть в дальнейшем использованы для разработки технологии получения ценных биологически активных веществ из биомассы иглицы понтийской и синеголовника морского.

Список литературы

1. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Бехтерев В.Н. Влияние света различного спектрального состава на биометрические и физиолого-биохимические показатели синеголовника морского (*Eryngium maritimum* L.) в культуре *in vitro* // Проблемы развития АПК региона 2015. - №4 - С.22-28.
2. Бехтерев В.Н. Патент РФ на изобретение № 2303476 // Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракцией в сочетании с вымораживанием // Б.И. – 2007. – №21.
3. Simona De Marino. Novel Steroidal Components from the Underground Parts of *Ruscus aculeatus* L. // *Molecules*. – 2012. – V.17. – P. 14002-14014.
4. Красная книга краснодарского края. Том Растения и грибы. – Краснодар: ООО «Дизайн Бюро № 1», 2007. - 640 с.
5. Бехтерев В.Н. Патент РФ на изобретение №2564999 // Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракционным вымораживанием в поле центробежных сил // Б.И. – 2015. – №28.
6. Бехтерев В.Н. Экстракционное вымораживание карбоновых кислот из водного раствора в ацетонитрил в условиях действия поля центробежных сил // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т.15. – Вып.5. – С. 280-289.
7. Guvenc A., Satir E., Coskun M. Determination of Ruscogenin in Turkish *Ruscus L.* Species by UPLC // *Chromatographia Supplement*. 2007. V. 66, P. 141-145.
8. Томашевская О.Ю. Фармакогностическое изучение и стандартизация иглицы шиповатой и сухого экстракта на ее основе: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / ВИЛАР РАСХН. – М., 2009. – 24 с.

Статья поступила в редакцию 26.07.2016 г.

Bekhterev V.N., Kolomiyets T.M., Malyarovskaya V.I. Biochemical researches of rare and endangered species within West Caucasus // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 43-48.

In terms of the research it was found out freezing extraction makes it possible to increase selectivity of natural organic substances extraction. On the initial stage of natural organic substances extraction out of *Ruscus ponticus* Woronow roots this method permits to separate carbohydrates from steroid saponins. It was determined that carbohydrate composition of organic and aqueous phases of *Ruscus ponticus* Woronow extraction differs a lot. Extraction freezing while obtaining the target components enables to separate carbohydrates from other fractions BAS, leaving saccharides mainly in the aqueous phase; in this way total concentration of fructose, glucose and sucrose in aqueous phase makes $\approx 0,9\%$, what is higher than in acetonitrile fraction $\approx 0,3\%$. In ethanol extracts of *Eryngium maritimum* L. a number of BAS including falcarinol ($\approx 18\%$) and stigmaterol ($\approx 23\%$) were identified applying gas chromatography-mass spectrometry.

Key words: *Ruscus ponticus* Woronow; *Eryngium maritimum* L.; extraction freezing; chromatography