

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕОРГАНИЧЕСКИХ И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 547.92

DOI: 10.17223/24135542/7/5

С.С. Кравцова, М.П. Санду, Л.А. Байгулова, В.В. Хасанов

*Национальный исследовательский Томский государственный университет
(г. Томск, Россия)*

Определение биологически активных веществ и антиоксидантной активности надземной части аконита байкальского *Aconitum baicalense Turcz*

Изучено качественное и количественное содержание свободных и связанных углеводов, определено общее содержание пектиновых веществ, флавоноидов, кумаринов и антиоксидантной активности аконита байкальского.

Ключевые слова: *углеводы свободные; углеводы связанные; пектины; флавоноиды; кумарины; антиоксидантная активность; аконит байкальский; *Aconitum baicalense Turcz*.*

Аконит – многолетнее травянистое растение. Основной ареал произрастания аконитов – умеренный пояс Северного полушария. В России распространено около 90 видов, из них в Сибири – 30 видов аконитов, на Дальнем Востоке – 27 видов. Большинство видов аконитов – достаточно ядовитые растения, хотя среди них встречаются и относительно малотоксичные, в частности аконит байкальский (Чекановского).

Лечебные и токсические свойства аконитов известны с древнейших времен, особенно в восточной медицине. В народной медицине акониты широко используются в качестве противовоспалительных, болеутоляющих, антимикробных средств [1]. Биологическая активность аконитов обусловлена всем комплексом его химических соединений [2], из которых наиболее изученными являются алкалоиды, витамины, макро- и микроэлементы [3–4].

В настоящее время остается малоизученным вопрос о качественном и количественном углеводном составе аконитов. Установлено, что полисахариды растений проявляют высокие неспецифические иммуностимулирующие свойства, известна противовоспалительная, противоязвенная и

противовирусная активность полисахаридов [5–6]. Биологическая активность аконита байкальского может быть связана со способностью торможения процессов свободнорадикального окисления за счет наличия флавоноидов и кумаринов, которые являются антиоксидантами.

Цель работы – изучение углеводов, флавоноидов, кумаринов и антиокислительной активности аконита байкальского.

Экспериментальная часть

Исследуемое в данной работе сырье аконита байкальского собрано в фазе цветения в Иркутской области. Наземную часть растения сушили до воздушно-сухого состояния, упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации [7].

Получение сухого водного экстракта. Экстракцию углеводов из измельченного сухого растения вели водой, при соотношении сырье : вода 1 : 10, с предварительным настаиванием в течение 2 ч и дальнейшей экстракцией при УЗ-воздействии (44 кГц, 1 Вт/см²) в течение 40 мин при комнатной температуре. Полученный экстракт отделяли от сырья фильтрованием и центрифугированием, после чего высушивали при пониженном давлении на ротационном испарителе до постоянной массы. До проведения исследований сухой экстракт хранили в морозильнике при температуре –18–24°C.

Определение углеводов. Навеску сухого водного экстракта перерастворяли в 20 мл воды, после чего раствор подкисляли соляной кислотой (конц.) до pH=4,0. При этом образовывался темный хлопьевидный осадок комплекса полифенольных соединений, который отделяли и промывали. В оставшийся раствор добавляли NaOH до нейтральной реакции (pH=7.0) и осаждали полисахариды двукратным объемом 96%-ного этанола на холоде (4–6°C). Из полифенольного комплекса связанные углеводы выделяли гидролизом при кипячении в 10%-ном растворе HCl в течение 2 ч.

Сумму углеводов определяли фотометрически, фенолсернокислотным методом. Калибровку выполняли по растворам глюкозы.

Разделение моно- и дисахаридов проводили методом хроматографии на катионите КУ-2-8 в кальциевой форме на колонке 10x250 мм при температуре 55±0,5°C. В качестве элюента использовали дистиллированную воду, скорость элюции – 0,15 мл/мин, отбирали фракции элюата по 1 мл, детектирование – по фенолсернокислотному методу. Наблюдавшиеся на профиле элюции пики идентифицировали по стандартным растворам углеводов, разделяемых в тех же условиях. Определение пектинов проводили объемным Си-пектатным методом.

Определение флавоноидов. Флавоноиды экстрагировали 70%-ным этанолом при нагревании на кипящей водяной бане, двукратно, по 50 мл этанола, в течение 1 и 0,5 ч. Объединенные экстракты промывали хлороформом для удаления хлорофилла, кумаринов и других мешающих веществ. Экстракты подвергали гидролизу 1 н соляной кислотой при нагревании на

водяной бане в течение 30 мин. Для количественного определения 2 мл экстракта переносили в мерную колбу на 25 мл, добавляли 2 мл 2%-ного раствора хлорида алюминия в 95%-ном этаноле, одну каплю 5%-ной CH_3COOH , доводили до метки 95%-ным этанолом и перемешивали. Через 40 мин определяли оптическую плотность полученного раствора на фотометре КФК-2 на длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Измерения проводили относительно стандарта (ГСО) кверцетина. Суммарное содержание флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на кверцетин в процентах (X) вычисляли по формуле

$$X=100\{100*D*K*m_s\}/\{(100-W)*D_s*K_s*m\}, \quad (1)$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; D_s – оптическая плотность раствора ГСО кверцетина; m – масса сырья (аконита), г; m_s – масса кверцетина, г; K – коэффициент разбавления исследуемого раствора; K_s – коэффициент разбавления ГСО кверцетина; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Определение кумаринов. Точную навеску аконита (около 1 г) трехкратно экстрагировали хлороформом (50, 25 и 25 мл), экстракт отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении до объема 10 мл. В пробирки вместимостью 10 мл вносили по 1 мл упаренного экстракта, добавляли по 8 капель свежеприготовленного 5%-ного спиртового раствора щелочи и по 20 капель свежеприготовленного диазореактива (диазотированная сульфаниловая кислота), доводили объем до 5 мл этанолом. Оптическую плотность растворов измеряли на фотометре КФК-2 на длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Измерения проводили относительно раствора сравнения. Раствор сравнения приготавливали, как описано выше для образца, с той разницей, что вместо экстракта брали 1 мл этанола. Количественные определения кумаринов (X, %) проводили по калибровочной зависимости, построенной на растворах ГСО кумарина, по формуле

$$X=C \times V \times A / m, \quad (2)$$

где C – концентрация кумарина, найденная по градуировочной характеристике; V – объем, в котором измеряли оптическую плотность; m – масса навески аконита; A – коэффициент разбавления.

Антиоксидантную активность (АОА) определяли по ингибированию окисления водного раствора сульфита натрия [8]. Растворы для определения АОА готовили из нативного сырья экстракцией 0,05 М фосфатным буфером (рН=7,2) при нагревании до 40 С (2 ч) в атмосфере азота непосредственно перед измерением.

Результаты и их обсуждение

При изучении растительного сырья, как правило, определяются только свободные углеводы, содержание которых варьирует от 0,7 до 20% [9–11].

Общее содержание свободных углеводов аконита байкальского составляет $1,7 \pm 0,2\%$. Кроме того, определено содержание связанных углеводов, которое составило $2,1 \pm 0,2\%$. Изучен количественный и качественный состав свободных и связанных углеводов, данные приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Содержание углеводов надземной части *Aconitum baicalense Turcz*

| Соединение | Содержание, масс. % (воздушно-сухое сырье) | |
|------------|---|-----------------------|
| | Свободные углеводы | Связанные углеводы |
| Глюкоза | 0,97 | 0,59 |
| Сахароза | 0,51 | – |
| Рамноза | – | 0,66 |
| Арабиноза | – | 0,22 |
| Ксилоза | – | 0,25 |
| Сорбит | 0,25 | 0,36 |

Количество связанных углеводов несколько превышает количество свободных, и они более разнообразны. Наибольшую часть свободных углеводов представляет глюкоза, а связанных – глюкоза и рамноза. Кроме углеводов, в заметных количествах в аконите байкальском обнаруживается шестиатомный спирт сорбит.

Количественное содержание пектина в плодах и стеблях растения значительно разнится, от 0,2 до 28% от сухой массы [9–13], наибольшее количество его содержится в плодах. В травах пектин обнаруживается в значительно меньших количествах. Содержание пектиновых веществ в аконите байкальском и сравнительные данные по другим растениям приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Содержание пектинов в некоторых растениях

| Растение | Содержание пектинов, масс. % (воздушно-сухое сырье) |
|---|--|
| Аконит | 1,5 |
| Яблоки | 10–15 [9] |
| Корочки цитрусовых | 20–35 [9] |
| Подсолнечник | 15–25 [9] |
| Свекла | 10–20 [9] |
| Подземные органы <i>Hemerocallis minor</i> | 0,99–3,92 [10] |
| Корни девясила | 1,82 [12] |
| Растения рода <i>Agastache clayton ex gron</i> (<i>Lamiaceae L.</i>) | 0,46–1,76 [13] |

Полифенольные соединения являются хорошими антиоксидантами. Аконит байкальский содержит $1,61 \pm 0,02\%$ флавоноидов в форме агликонов и $0,13 \pm 0,03\%$ кумаринов.

Антиоксидантная активность надземной части аконита составила $4,0 \pm 0,6$ мг/100 г в пересчете на галловую кислоту.

Выводы

1. Связанные углеводы аконита байкальского более разнообразны и в количественном отношении превышают свободные, представленные в основном глюкозой и сахарозой.

2. Аконит байкальский обладает выраженной антиокислительной активностью, связанной с наличием флавоноидов, кумаринов и свободных углеводов.

3. Содержание углеводов, пектинов, полифенольных соединений, наряду с алкалоидами, обуславливает широкий спектр биологической активности аконита байкальского.

Литература

1. Пушкарский С.В., Пашинский В.Г., Поветьева Т.Н. и др. Стресс-модулирующий эффект алкалоидов *Aconitum baicalense* (Ranunculaceae) при воспалении и иммобилизации // Растительные ресурсы. 2006. № 2. С. 115–119.
2. Пашинский В.Г. Теория фитотерапии. Томск, 2014. 331 с.
3. Погодаева Н.Н., Жапова Ц., Верещагин А.Я. и др. Алкалоидный состав некоторых видов *Aconitum* L. флоры Сибири // Растительные ресурсы. 2000. Т. 36, № 2. С. 79–84.
4. Жапова Ц. Исследование химического состава *Aconitum baicalense* : автореф. дис. ... канд. хим. наук. Иркутск, 1995. 19 с.
5. Wu Ya-Lin, Huang J., Pan Yuan-jiang. Isolation of polysaccharides from the plant *Solanum lyratum* Thunb and study of their biological immunocompetence // J. Zhejiang Univ. Sci. Ed. 2004. Vol. 31, No 3. P. 319–321.
6. Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.А. Фенольные соединения и полисахариды *Viola hirta* L. // Фармаком. 2004. № 3. С. 23–27.
7. ГОСТ 17768-90. Международный стандарт. Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
8. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 77–85.
9. Ефремов А.А., Кондратюк Т.А. Выделение пектина из нетрадиционного растительного сырья и применение его в кондитерском производстве // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 171–176.
10. Сидельникова Л.Л., Кукушкина Т.А. Содержание некоторых групп соединений у *Nemerocallis minor* в условиях интродукции // Химия растительного сырья. 2014. № 1. С. 177–183.
11. Сорокопудов В.Н., Башутов С.А., Мячикова Н.И., Навальнева И.А. Содержание БАВ в плодах некоторых представителей видов рода *Crataegus* L. // Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 335–336.

12. Матасова С.А., Митина Н.А., Рыжова Г.Л., Жуганов Д.О., Дычко К.А. Получение сухого экстракта из корней девясила высокого и изучение его химического состава // Химия растительного сырья. 1999. № 2. С. 119–123.
13. Мяделец М.А., Кукушкина Т.А., Воробьева Т.А., Шалдаева Т.М. Биологическая активность вещества и антиоксидантная активность растений рода *Agastache clayton ex gron* (Lamiaceae L.), культивируемых в условиях среднего Урала // Химия растительного сырья. 2014. № 4. С. 147–152.

Авторский коллектив:

Кравцова Светлана Степановна, канд. хим. наук, доцент кафедры органической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: sskrav@mail.ru

Санду Мария Петровна, студентка кафедры органической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: maria94@sibmail.com

Байгулова Лариса Александровна, студентка кафедры органической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: baygulovaolga@mail.ru

Хасанов Виктор Вазикович, канд. хим. наук, доцент кафедры органической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: xasanov@xf.tsu.ru

Tomsk State University Journal of Chemistry, 2017, 7, 55–61. DOI: 10.17223/24135542/7/5

S.S. Kravtsova, M.P. Sandu, L.A. Baygulova, V.V. Khasanov

Tomsk State University (Tomsk, Russia)

Determination of biologically active substances and antioxidant activity of the aerial parts of Baikal aconite *Aconitum baicalense Turcz*

*The qualitative and quantitative content of free and bound carbohydrates was studied, and the total content of pectin, flavonoids, coumarins, and antioxidant activity were determined in Baikal aconite (*Aconitum baicalense Turcz*).*

Carbohydrates were isolated from the plant by pre-infusion in water and subsequent extraction with ultrasonic exposure at room temperature. The resulting extract was dried under reduced pressure in a rotary evaporator. Polysaccharides were precipitated by 96% ethanol in the cold (4–6 °C). Bound carbohydrates were isolated from polyphenol complex by hydrolysis. Total carbohydrates were determined photometrically, by the phenol–sulfuric acid method.

*The separation of mono- and disaccharides was performed on cationite KU-2-8 in the calcium form in a 250*10 mm (ID) column at 55 ± 0.5 °C. The total amount of available carbohydrates in Baikal aconite is 1.7 ± 0.2%. In addition, the content of bound carbohydrates is 2.1 ± 0.2%. The quantity of bound carbohydrates is slightly higher than that of free carbohydrates and they are more diverse. The largest part of free carbohydrate consists of glucose. Glucose and rhamnose are the majority of bound carbohydrates. In addition to carbohydrates, appreciable quantities of the hexahydroxy alcohol sorbitol were discovered in the Baikal aconite.*

Flavonoids were extracted with 70% ethanol under heating. The extracts were washed with chloroform to remove chlorophyll, coumarin, and other interfering substances, and hydrolyzed. Flavonoids were determined photometrically at a wavelength of 400 nm. Coumarins were determined photometrically after reaction with diazotized sulfanilic acid, with quantification by reference standard solutions of coumarin. Pectin was determined by a Cu–pectin volumetric method.

Baikal aconite contains 1.61 ± 0.02% flavonoids in the form of aglycones and 0.13 ± 0.03% coumarin. The antioxidant activity of the aerial parts of aconite is 4.0 ± 0.6 mg/100 g in terms of gallic acid. Baikal aconite has a pronounced antioxidant ac-

tivity associated with the presence of flavonoids, coumarins, and free monosaccharides. The content of carbohydrates, pectin, and polyphenolic compounds, along with alkaloids, leads to a wide spectrum of biological activity of *Aconitum baicalense* Turcz.

Keywords: carbohydrates, pectins, flavonoids, coumarins, antioxidant activity, *Aconitum baicalense* Turcz.

References

1. Pushkarskiy S.V., Pashinskiy V.G., Povet'yeva T.N. i dr. Stress-moduliruyushchiy effekt alkaloidov *Aconitum baicalense* (Ranunculaceae) pri vospalenii i immobilizatsii. *Rastitel'nyye resursy*. 2006;2:115-19. In Russian
2. Pashinskiy V.G. *Teoriya fitoterapii*. Tomsk. 2014; 331 P. In Russian
3. Pogodayeva N.N., Zhapova T.S., Vereshchagin A. A. Alkaloidnyy sostav nekotorykh vidov *Aconitum* L. flory Sibiri. *Rastitel'nyye resursy*. 2000;36(2):79-84. In Russian
4. Zhapova T.S. *Issledovaniye khimicheskogo sostava Aconitum baicalense: avtoref. dis. ... kand. khim. nauk*. Irkutsk. 1995;19 P. In Russian
5. Wu Ya-Lin, Huang J., Pan Yuan-jiang. Isolation of polysaccharides from the plant *Solanum lyratum* Thunb and study of their biological immunocompetence. *J. Zhejiang Univ. Sci. Ed.* 2004; 31(3):319-321.
6. Litvinenko V. I., Bubenichikov R. A. Fenol'nyye soyedineniya i polisakharidy *Viola hirta* L. *Farmakom*. 2004;3:23-27. In Russian
7. GOST 17768-90. Mezhdunarodnyy standart. Sredstva lekarstvennyye. Upakovka, markirovka, transportirovaniye i khraneniye.
8. Khasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva Ye.V. Metody issledovaniya antioksidantov. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2004;3:77-85. In Russian
9. Yefremov A.A., Kondratyuk T.A. Vydeleniye pektina iz netraditsionnogo rastitel'nogo syr'ya i primeneniye yego v konditerskom proizvodstve. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2008;4:171-176. In Russian
10. Sidel'nikova L.L., Kukushkina T.A. Soderzhaniye nekotorykh grupp soyedineniy u *Hemerocallis minor* v usloviyakh introduksii. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2014;1:177-183. In Russian
11. Sorokopudov V.N., Bashutov S.A., Myachikova N. I., Naval'neva I.A. Soderzhaniye BAV v plodakh nekotorykh predstaviteley vidov roda *Crataegus* L. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2011;4:335-336. In Russian
12. Matasova S.A., Mitina N.A., Ryzhova G.L., Zhuganov D.O., Dychko K.A. Polucheniye sukhogo ekstrakta iz korney devyasila vysokogo i izucheniye yego khimicheskogo sostava. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 1999;2:119-123. In Russian
13. Myadelets M. A., Kukushkina T.A., Vorob'yeva T.A., Shaldayeva T.M., Biologicheskaya aktivnost' veshchestva i antioksidantnaya aktivnost' rasteniy roda *Agastache* clayton ex gron (Lamiaceae L.), kul'tiviruyemykh v usloviyakh srednego Urala. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2014;4:147-152. In Russian

Information about authors:

Kravtsova Svetlana S., PhD in Chemistry, docent of Department Organic Chemistry Tomsk State University (Tomsk, Russian). E-mail: sskrav@mail.ru

Sandhu Maria P., student of Department Organic Chemistry Tomsk State University (Tomsk, Russian). E-mail: maria94@sibmail.com

Baygulova Larisa A., student of Department Organic Chemistry Tomsk State University (Tomsk, Russian). E-mail: baygulovaolga@mail.ru

Khasanov Victor V., PhD in Chemistry, docent of Department Organic Chemistry Tomsk State University (Tomsk, Russian). E-mail: xasanov@xf.tsu.ru