

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
“АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ” ГНКО**

АНАНИКЯН ГРАЧЬЯ СИМАСОВИЧ

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
МЕТАБОЛИТОВ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ**

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 03.00.14 —«Биотехнология»

Научный руководитель: д.х.н. проф. С.А. Саргисян

ЕРЕВАН - 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Литературный обзор	10
1.1 Флавоноиды.....	10
1.1.1. Структурное разнообразие флавоноидов.....	10
1.1.2. Биосинтез флавоноидов	17
1.1.3. Методы выделения и идентификации флавоноидов.....	21
1.1.4. Свойства и функции флавоноидов.....	23
1.1.5. Сырье, содержащее флавоноиды	23
1.2. Жирные масла и омега-3 ненасыщенные кислоты.....	29
1.2.1. Жиры, жирные масла и жирные кислоты.....	29
1.2.2. Жирные масла в медицине.....	34
1.2.3. Характеристика жирных масел методом ЯМР-спектроскопии... ..	38
2. Обсуждение результатов экспериментальной части.....	39
2.1. Изучение соцветий бессмертника красноватого в качестве возможного источника препарата “Фламин”	39
2.2. Изучение флаволигнанов лиловоцветковой расторопши	43
2.3. Сравнительное изучение содержания жирного масла и флаволигнанов в семенах расторопши пятнистой / <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn./ почвенного и гидропонического происхождения	47
2.4. Осаин и помиферин – биологически активные вещества настойки плодов маклюры оранжевой	51
2.5. Сравнительный анализ антирадикальной активности флавоноидных соединений соцветий бессмертника красноватого, плодов расторопши пятнистой и маклюры оранжевой	56

2.6. Точность определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот в жирных маслах методом ^1H -ЯМР –спектроскопии	58
2.7 Обсуждение результатов изучения гепатопротекторной активности выделенного из соцветий бессмертника красноватого фламина и смеси Фламина с Силимарином... ..	64
3. Экспериментальная часть.....	65
3.1. Материалы и методы	65
3.2. Выделение суммы флавоноидов из соцветий бессмертника красноватого (<i>Helichrysum Rubicundum</i> L.).....	73
3.2.1. Сравнение суммы флавоноидов соцветий бессмертника красноватого (Ф1) с Фламином методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).....	73
3.2.2. Разделение суммы флавоноидов Ф1 на колонке с силикагелем... ..	74
3.3.Выделение силимарина	75
3.4. Испытание гидропонического метода выращивания расторопши	79
3.5. Выделение осаина и помиферина из плодов маклюры оранжевой	79
3.5.1. Препаративная тонкослойная хроматография смеси осаина с помиферином	80
3.5.2. Изучение спиртовой настойки плодов маклюры, полученной по методу народной медицины	81
3.6. Изучение антирадикальной активности выделенных флавоноидов	82
3.7. Выделение жирных масел семян для анализа методом ^1H -ЯМР-спектрометрии	87
3.7.1. ^1H -ЯМР-спектры шестнадцати масел, содержащих омега-3 ненасыщенные жирные кислоты.....	89
3.7.2. Щелочной гидролиз масел.....	97
Выводы.....	99

Список использованной литературы.....	101
Приложения	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одним из важнейших процессов биотехнологии является процесс выделения и изучения продуктов биосинтеза. Общность представленной диссертационной работы с биотехнологией в том, что она посвящена именно этому процессу - выделению и изучению продуктов биосинтеза из биологических объектов – растений: флавоноидных соединений из цветков бессмертника красноватого, семян расторопши пятнистой, плодов маклюры оранжевой, а также жирных масел из семян (и плодов) более полусотни других растений, представленных во флоре Армении. Актуальность данной и подобных ей исследований безусловна и объясняется потребностью медицины в расширении сырьевой базы лекарственных средств. Растительный мир (флора), несмотря на продолжающееся бурное развитие синтетической фармацевтической химии, продолжает оставаться источником, «кладезью» биологически активных (лекарственных) веществ.

В медицинской практике уже более пятидесяти лет при хронических холициститах и гепатохолициститах успешно применяют в качестве лекарственного средства препарат “Фламин”, состоящий из смеси флавоноидов соцветий бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L./ Moench., семейства Астровые), обладающей выраженной желчегонной активностью. Во флоре Армении, однако, отсутствует официальный вид бессмертника – бессмертник песчаный и по этой причине фарминдустрия республики лишена возможности производить этот препарат из сырья Армении. В то же время, на территории республики произрастает, по крайней мере, шесть дикорастущих других разновидностей бессмертника. Некоторые из них произрастают в количествах, которые могут быть, в случае их пригодности по химическому составу, возобновляемыми источниками сырья для умеренного масштаба производства “Фламина”. Это обстоятельство, а также факт традиционного, успешного использования издавна населением Армении для лечебных целей

настоев и отваров из всех разновидностей бессмертника, делают резонным и обоснованным поиск заменителя бессмертника песчаного посредством изучения флавоноидного состава других видов бессмертника.

Семена (плоды) лиловоцветковой расторопши пятнистой (*Silybum marianum* /L./ Gaertn., семейства Астровые) содержат смесь флаволигнанов, которая носит название “Силимарин” и является “действующим началом” эффективных лекарственных (гепатопротекторных) препаратов, таких как Карсил, Легалон. Лиловоцветковая расторопша произрастает в Армении небольшими группами в Иджеванском и Горисском районах, но встречается часто в Арцахе в виде густых зарослей, которые могут служить сырьевым источником для производства из их семян гепатопротекторных лечебных средств. Главными активными компонентами “Силимарина” являются флаволигнаны силибин и силидианин. В зависимости от соотношения этих двух флаволигнанов в семенах различают две хеморасы расторопши –силибиновую и силидианиновую хеморасы. Хеморасы лиловоцветковой расторопши как Арцах, так и расторопши горисского и иджеванского распространения не были установлены. Установление же хеморасы, т.е. количественного соотношения силибина и силидианина в “Силимарине”, будет иметь большое значение при разработке лекарственного препарата на основе этого сырья.

Плоды маклюры оранжевой (*Maclura pomifera* Raf.)– обильно плодоносящего дерева (родина - Северная Америка) семейства тутовых (Moraceae), интродуцированного в садах Еревана, содержат пренилизофлавоны (осаин и помиферин), в качестве главных биологически активных ингредиентов. Плоды используются в народной медицине в качестве сырья для приготовления разнообразных галеновых лечебных препаратов. Таким препаратом, в частности, является спиртовой настой (настойка) плодов маклюры, который, согласно публикуемым рекомендациям народной медицины, обладает профилактическим и лечебным свойством при злокачественных новообразованиях. Эти данные свидетельствуют об

актуальности исследований в области химического состава плодов маклюры и его галеновых препаратов.

Известно, что для нормального функционирования человеческого организма крайне важное значение имеет сбалансированный прием ненасыщенных и насыщенных жиров. Еще большее значение имеет оптимальное соотношение в жирах количеств омега-3 и омега-6 жирных кислот. Омега-3 ненасыщенные жирные кислоты, такие как альфа-линоленовая, необходимы для роста и развития организма, для предотвращения и лечения ишемической болезни сердца, гипертонии, диабета и ряда других заболеваний. Эти данные обосновывают востребованность и актуальность поиска и изучения новых потенциальных сырьевых источников омега-3 кислот, в качестве возможных заменителей таких общеизвестных пищевых и лекарственных жиров, как рыбий жир, льняное и конопляное масла.

Цель работы. Целью диссертационного исследования являлось выделение и изучение структуры биологически активных веществ - флавоноидных соединений цветков бессмертника красноватого *Helichrysum rubicundum* (С.Koch./Bornm), семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum*/L./ Gaertn.), плодов маклюры оранжевой (*Maclura pomifera* Schneid.), а также жирных масел семян (и плодов) более полусотни других растений, представленных во флоре Армении.

Научная новизна. Изучение соцветий бессмертника красноватого (*Helichrysum rubicundum* (С.Koch./Bornm), собранных на окрестных с озером Севаном холмах, показало (посредством хроматографического сравнения с препаратом “Фламин” и идентификацией выделенных главных компонентов), что этот вид бессмертника может быть использован в качестве сырья для получения препарата “Фламин”.

Из плодов лиловоцветковой разновидности расторопши пятнистой (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.), собранных на территории Арцаха, выделена (с выходом 2,89%) смесь флаволигнанов (“Силимарин”), изучением которой методами

хроматографии, сравнением с препаратом “Легалон”, а также ЯМР-спектроскопией, установлена принадлежность данной разновидности расторопши к силидианиновой хеморасе.

Апробирован гидропонический метод выращивания расторопши пятнистой и производство его семян. Показано преимущество гидропонического метода перед почвенным, благодаря как его управляемости (за счет применяемых схем водно-минерального питания, регулирования состава, концентрации и соотношения питательных элементов и pH питательного раствора), так и более высоким количественным и качественным показателям получаемых семян.

Изучено содержание (до 4%) главных биологически активных компонентов (смеси пренилизофлавонов - осаина с помиферином) в плодах маклюры оранжевой, собранных с деревьев, выращенных в Ереване. Установлено впервые, что максимальная разовая доза настойки (30 капель) содержит около 1 мг смеси осаина с помиферином.

Изучена сравнительная антирадикальная активность (относительно дифенил-пикрил-гидразил свободного радикала, в качестве показателя потенциальной антиоксидантной активности) полученных флавоноидных фракций и некоторых отдельных флавоноидов. Показано, что наибольшей активностью обладает помиферин, а “Фламин” более активен, чем “Силимарин”.

Разработан и апробирован приемлемый для использования метод количественного определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот (с точностью порядка $\pm 1\%$) в жирных маслах, а также в гидролизатах жирных масел, использованием спектров ^1H -ЯМР.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в обнаружении во флоре Армении перспективных сырьевых источников лекарственных средств: бессмертника красноватого, лиловоцветковой расторопши силидианиновой хеморасы, маклюры оранжевой, содержащих флавоноиды. Апробирован приемлемый для использования метод

количественного определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот (с точностью порядка $\pm 1\%$) в жирных маслах, а также в гидролизатах жирных масел, использованием спектров ^1H -ЯМР. Результаты диссертации могут быть основанием для осуществления медико-биологических исследований, с целью создания новых лекарственных препаратов.

Публикации. Основное содержание диссертационной работы изложено в 7-и статьях и в 2-х тезисах докладов конференций.

Апробация работы. Содержание диссертационной работы доложено на конференциях: H.S. Ananikyan, V.A. Mnatsakanyan "Helichrysum rubicundum as a raw material for the "Flamin" drug . Poster number 200 in conference "ArmChemFront", Armenia, august 25-29, 2013.

H.S. Ananikyan, V.A. Mnatsakanyan, M.V, Avetisyan. Comparative investigations of fatty oils from some Fabaceae species. Book of abstracts of 4-th international Conference of young scientists: Chemistry Today-2014. August 18-22, 2014. Yerevan. Young Chemists Association, 2014. p.138

Г.С.Ананикян, С.А.Саргисян, В.А.Мнацаканян. "Силимарин" расторопши из Арцаха. IV научная конференция Армянского химического общества (с международным участием). " Достижения и Проблемы" 7-11 октября 2014г., Ереван-Ванадзор. Материалы конференции, Ер. Армянская химическая ассоциация,. 2014, с.155

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Флавоноиды.

1.1.1. Структурное разнообразие флавоноидов.

Флавоноиды (лат. *Flavus*- желтое)– органические полифенольные вещества растительного происхождения, с довольно разнообразным строением и многообразными свойствами. В общем случае скелет флавоноидов можно представить в виде двух бензольных колец, связанных между собой пропиловыми или изопропиловыми цепочками. Скелет строения флавоноидов представлен на Рис. 1 и Рис. 2

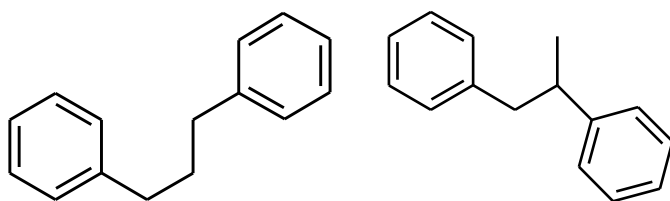


Рис. 1. Скелет флавоноидов

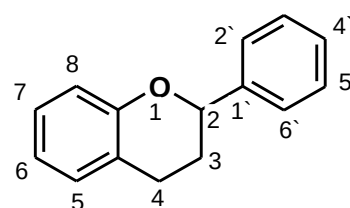


Рис. 2. Структура флавана

Флавоноиды рассматривают как фенилпроизводные хромана[1] или дифенилпроизводные пропана[2] и классифицируют их, исходя из нескольких факторов:- степени окисления и гидроксирования флавоноидного скелета;

- положения боковой фенильной части;

- наличия и отсутствия гетероциклического (пиранового) кольца.

Флавоноиды, у которых хроман во втором положении связан с бензольным кольцом, подразделяют на группы: флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванолы, флаванолы (катехины), антоцианидины. Рассмотрим основные типы флавоноидов:[1]

Флавоны. У флавоноидов этой группы между положениями 2 и 3 хромановой части присутствует двойная связь, а также кето-группа в положении 4 (Рис. 3). Хромановая часть большинства растительных соединений этой группы в положении 5 содержит гидроксильную группу.[1]

Кроме самого флавана, эта группа соединений включает в себя также его алкильные, ацилированные и гликозифицированные производные.[1]

К группе флавонов также относят конденсированные соединения - флаволигнаны, которые являются действующими веществами многих гепатопротекторных, желчегонных препаратов (Легалон, Карсил, Силибор, Силибинин) [1].

В случае гликозидов флавонов, гликозидная часть связана чаще всего с 5 или 7 положением хромановой части.[1]

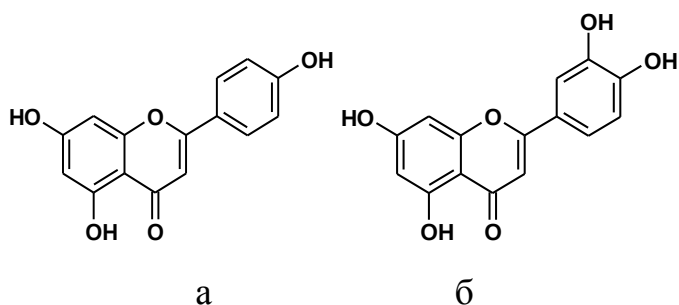


Рис. 3. Структуры флавонов: а-апигенина, б-лютеолина.

Флавонолы в 3-ем положении хромановой части содержат гидроксильную группу, которая может быть гликозилирована. Известно, что в более 50 % флавонолсодержащих растениях имеются именно производные кемпферола и кверцетина (Рис. 4). В растениях, путем биосинтеза, накапливается широкий спектр (от моно- до окта-) метоксилированных, моно- и диметилендиокси- и гликозилированных производных.[1]

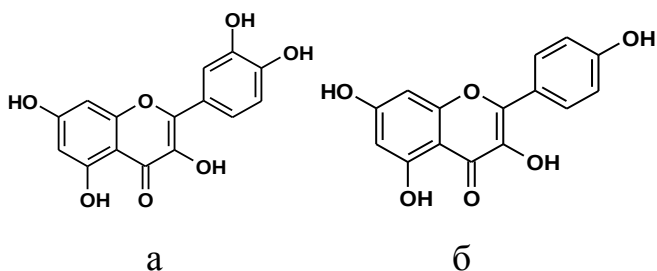


Рис. 4. Структуры флавонолов: а- кверцетина , б - кемпферола.

Варианты метилирования и гликозилирования как у флавонов, так и у флавонолов довольно разнообразны. Флавонолы гликолизуются в разных положениях и поэтому флавонолы и их гликозиды являются очень распространенными соединениями в растениях.[1,3]

Флаваноны (дигидрофлавоны, Рис. 5) - класс флавоноидов, у которых, в отличие от флавонов, связь между положениями 2 и 3 насыщенная. Каждый из флаванонов имеет два изомерных состояния, поскольку в структуре этих соединений во втором положении хромановой части присутствует асимметрический углеродный атом. В растительном сырье чаще всего встречаются S-изомеры флаванонов [3].

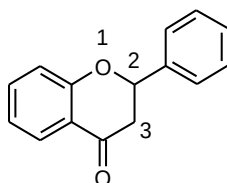


Рис. 5. Структура флаванона.

Флаванолы (Рис. 6) - группа тех флавоноидов, которые являются 3-гидроксипроизводными флаванонов. Они имеют два асимметричных углеродных атома в положениях 2 и 3 хромановой части, что приводит к возможности существования четырех изомерных состояний [4].

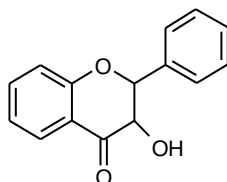


Рис. 6. Структура флаванолола.

Флаванолы. Большинство из них в своей структуре содержат гидроксильную группу в положении 3, вследствие чего их относят к флаван 3-олам. Флаванолы также содержат в структуре два хиральных центра в положениях 2 и 3, что объясняет наличие четырех диастереоизомерных состояний.

Катехины являются транс - изомерами флаванолов, а цис-изомеры называют эпикатехинами. Каждый из перечисленных двух видов изомеров имеет два стереоизомера (+ и -), самыми распространенными из которых являются (+)- катехины и (-) –эпикатехины (Рис. 7). [1]

Кроме того, как катехины, так и эпикатехины обладают свойством образовывать полимеры - так называемые проантоцианы или, как их еще называют, конденсированные танины.[1,4]

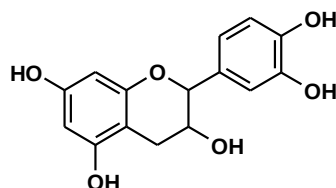


Рис. 7. Формула (каркас) катехина (и эпикатехина).

Антоцианидины структурно представляют из себя катионы флавилиума. В растениях распространены гликозиды антоцианидинов – антоцианы. Сахарная группа чаще всего соединена с 3-м положением хромановой части антоцианов (Рис. 8).[1]

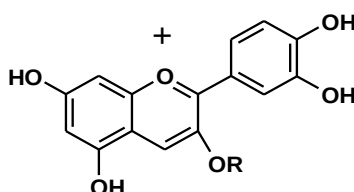


Рис. 8. Пример структуры антоциана; R=сахар.

Халконы (Рис. 9) являются флавоноидами, у которых раскрыто пирановое кольцо. Они чаще встречаются в гликозилированном виде. В растениях реже представлены дигидрохалконы, у которых восстановлена двойная связь в трехуглеродной части. [1]

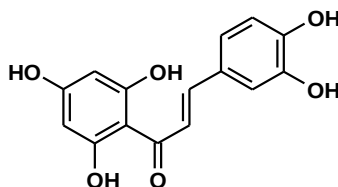


Рис. 9. Пример структуры халконов.

Изофлавоноиды— тип флавоноидов (Рис. 10), в которых хромановая часть связана с бензольным кольцом в положении 3. При рассмотрении строения

изофлавоноидов отмечается их структурная схожесть с эстрогенами. Учитывая эту особенность, изофлавоны называют также фитоэстрогенами. [4]

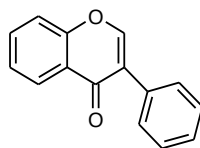


Рис. 10.Скелет изофлавона.

Неофлаваноидами называют те флавоноиды, у которых второе бензольное кольцо находится при углеродном атоме положения 4 хромановой системы. Кроме этих основных групп известны также группы гомоизофлавоноидов и бифлавоноидов. Типичным примером бифлавоноидов служат соединения листьев дерева Гинкго билоба(*Ginkgo Biloba*) (Рис. 11)[5].

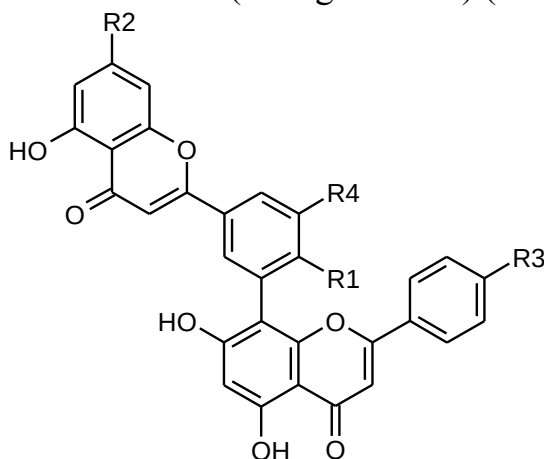


Рис. 11.Общая формула бифлавоноидов плодов Гинкго билоба.

Во флавоноидном классе природных фенольных соединений подкласс пренилированных флавоноидов отличается богатством структурного и фармакологического разнообразия. За последние 25 лет появилось ошутимое количество сообщений об этих веществах, выделенных в основном из растений семейств Бобовые (*Leguminosae* =*Fabaceae*), Тутовые (*Moraceae*), и редко - из других семейств. Наличие в этих соединениях в различных комбинациях изопреноидной цепочки приводит к кардинальному изменению их биологической активности, из за их сродства с биологическими мембранами, облегчающего взаимодействие с белками. [6].

Из надземной части софоры лисохвостной (*Pseudosophora alopecuroides* (L.) Sweet) выделена сумма флавоноидов, содержащая смесь пренилфлавонов

(главные компоненты - глаброл и изобревахин, Рис. 12). Эти пренилфлавоны являются составной частью потенциального лекарственного препарата “Фланорин”, находящегося на стадии предклинического изучения, в качестве средства для лечения гепатита, хронических заболеваний печени, цирроза печени и воспалительных заболеваний желчного пузыря и желчевыводящих путей [7,8].

Из листьев почечного чая (семейства Яснотковые, *Orthosiphon stamineus*, *Lamiaceae*) выделено 23 флавоноида, в том числе два пренилфлавона: 5,7,3¹,5¹-тетраметокси-8-С-пренилфлавон (Рис. 13, а) и 5,7,3¹,5¹-тетраметокси-6-С-пренилфлавон (Рис. 13, б) [9].

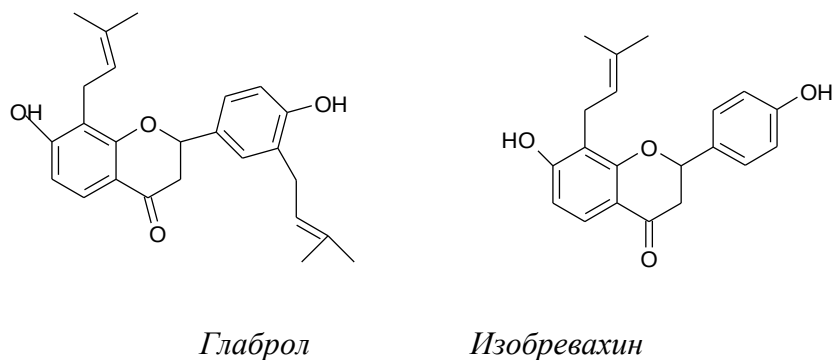


Рис. 12. Пренилфлавоны софоры лисохвостной.

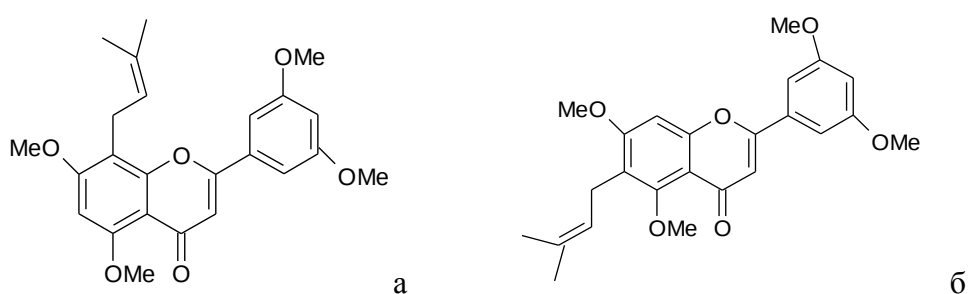


Рис. 13. Монопренилфлавоны листьев почечного чая.

Из надземной части Тефронии пурпурной – травянистого растения семейства Бобовые, произрастающей в Египте, выделено три монопренилфлавона –тепропурпирин, изоглабротерпин, глабротерприн.[10].

Исследованиями японских [11] и камерунских [12] химиков растений другого рода семейства Бобовых (Fabaceae) - рода *Erithrina*, было показано наличие в них характерных для семейства веществ – пренилированных флавоноидов: из коры ствола *Erithrina fusca* было выделено четыре пренилфлаванона и один пренилизофлавоны, смесь которых проявила антималярийную активность. В коре *Erithrina senegalensis* было обнаружено присутствие трех пренилизофлавонов, обладающих гепатопротекторной активностью [11,12].

Род Маклюра семейства Тутовые - один из первых растительных родов, обнаруженных в качестве продуцирующих пренилированные флавоноиды. Наряду с маклюрой оранжевой (*Maclura pomifera*), являющейся частью исследований данной работы, известна также маклюра красильная – *Maclura tinctoria*(L.) D. Don ex Steudel, в плодах которой обнаружено не менее десяти пренилированных флавоноидов (Рис. 14) [13,14]

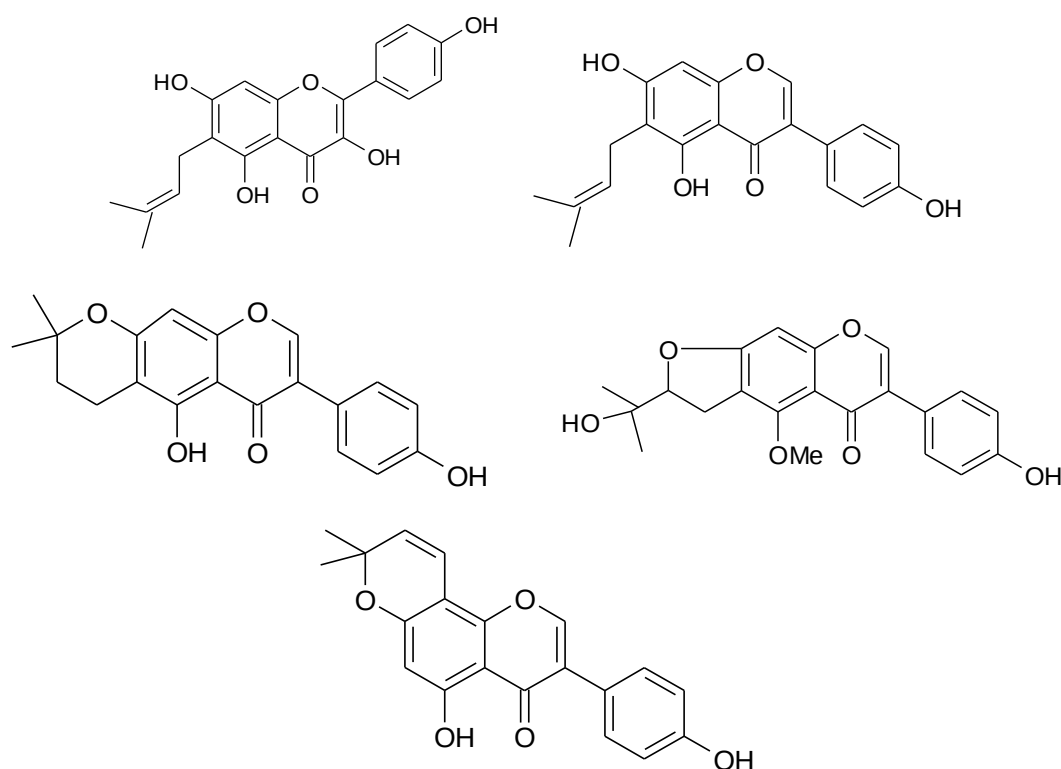


Рис. 14. Структуры пяти пренилфлавонов из Маклюры красильной.

1.1.2. Биосинтез флавоноидов.

Исследования, посвященные биосинтезу флавоноидов, проводились еще в начале 1900-ых годов и считалось что биосинтез происходит через шикимовую кислоту, как у большинства полифенолов. [1].

Согласно предполагаемой схеме биосинтез полифенолов протекает через шикимовую кислоту и полиуксусная кислота путем конденсации ацетатных частей может быть источником образования не только флавоноидов, но и многих других полифенолов.[15] Эта гипотеза подтвердилась исследованиями Робинсона и Берча[16;17].

В итоге, на данный момент установлено, что биосинтез флавоноидов проходит по смешанному пути [1]:

А). Кольцо А получается из полиуксусной кислоты по ацетатному пути, с участием ацетил-КоА и малонил-КоА(Рис. 15)[18].

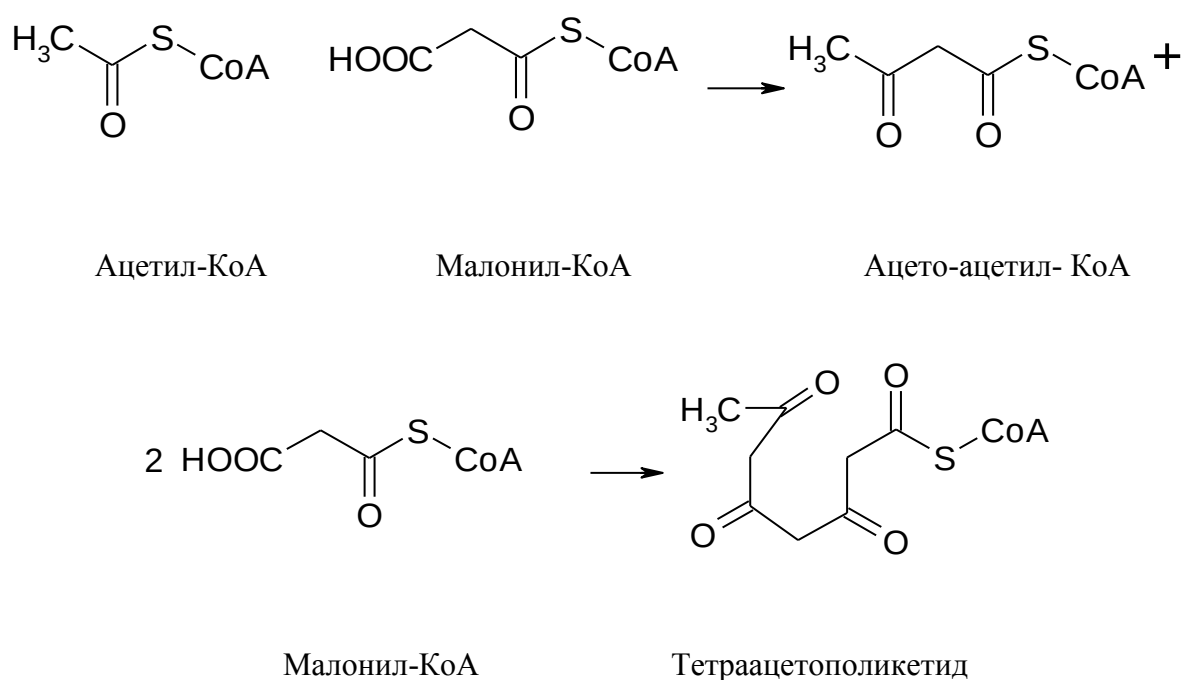


Рис. 15. Образования предшественника(Тетраацетополикетида) кольца А

Б). Кольцо В возникает по шикимовому пути (рис.16)[1,18,19]:

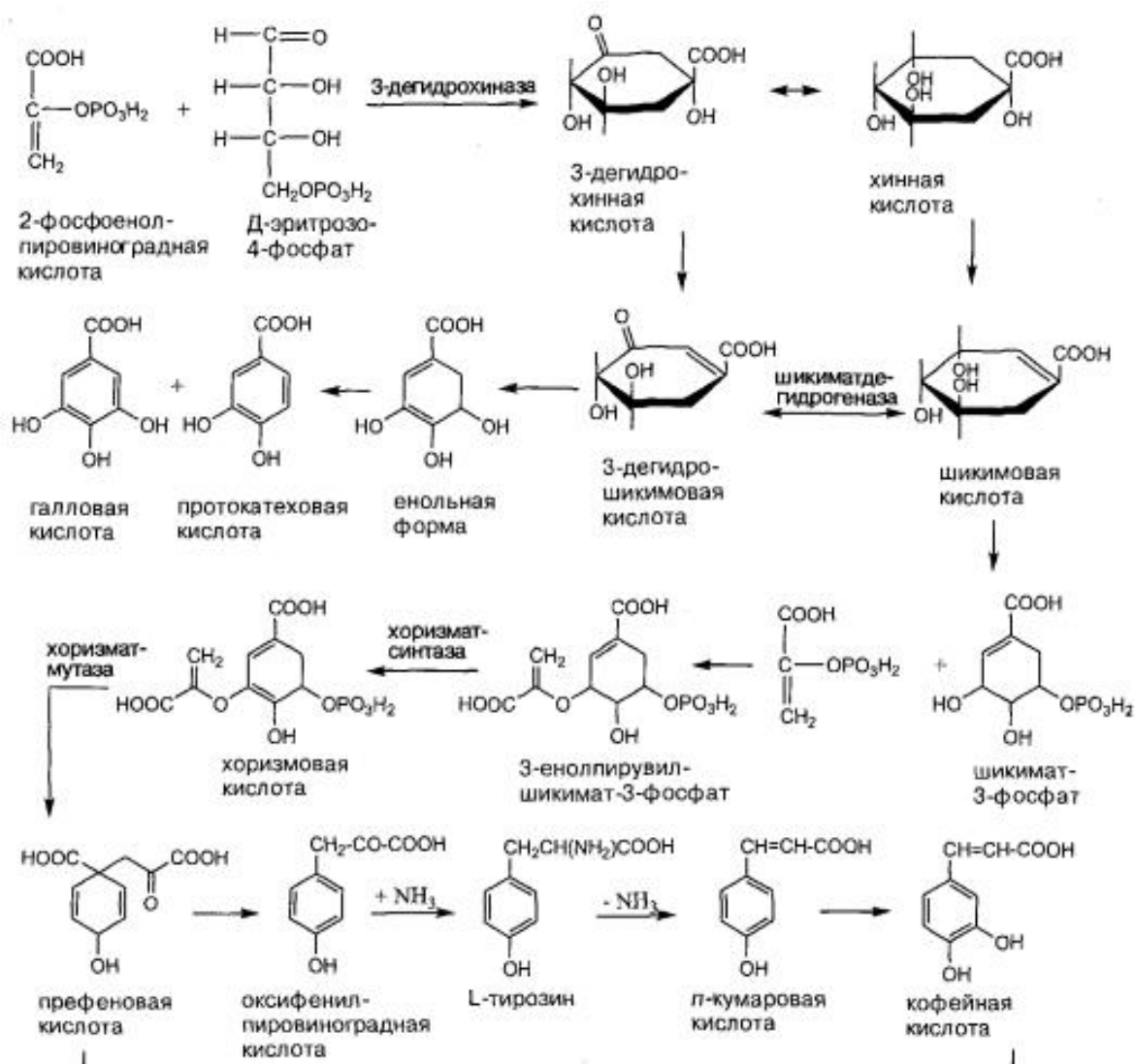


Рис. 16. Образование п-кумаровой кислоты[1]

п-кумаровая кислота с КоА-SH образует п-кумароил КоА.[18]

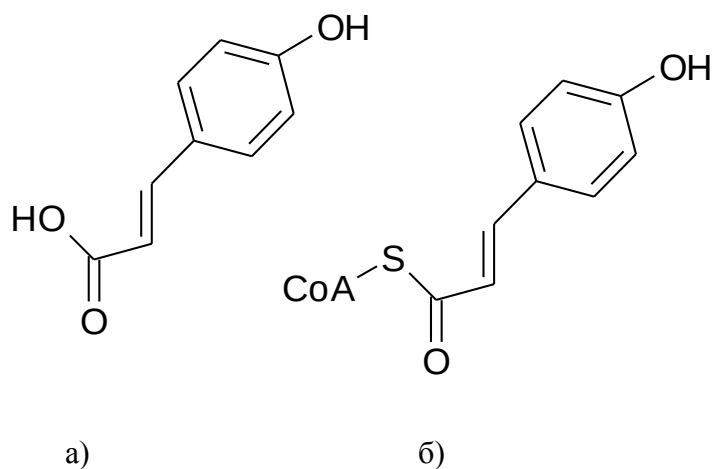


Рис. 17. а) п-кумаровая кислота б) п-кумароил КоА[18]

После ферментативной конденсации п-кумароил КоА и тетраацетополикетида с участием халкон синтазы образуется тетрагидрохалкон, из которого далее образуются нарингенин и другие флавоноиды [18,20] (Рис. 18)

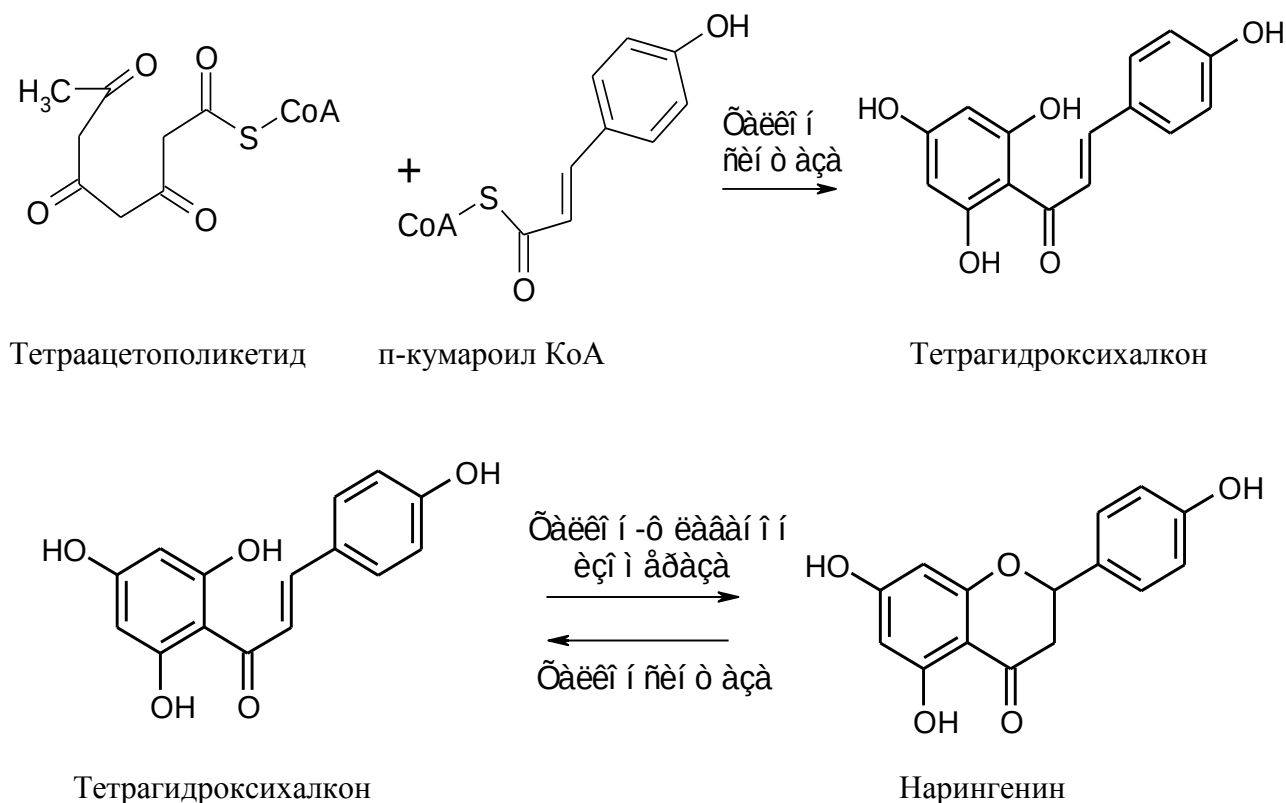


Рис. 18.Образование нарингенина [18].

Далее из халконов образуются все остальные флавоноиды. В своей работе В.Winkel представила схему биосинтеза флавоноидов в растениях с участием синтезированного в растении по шикимовому пути фенилаланина (схема. 1)[21].

Похожая схема представлена так же в более ранней работе[22]. Как видно из схемы после образования халконов, из них при участии определенных ферментов образуются остальные флавоноиды, такие как антоцианы, флавононы, флавонолы, изофлавоноиды

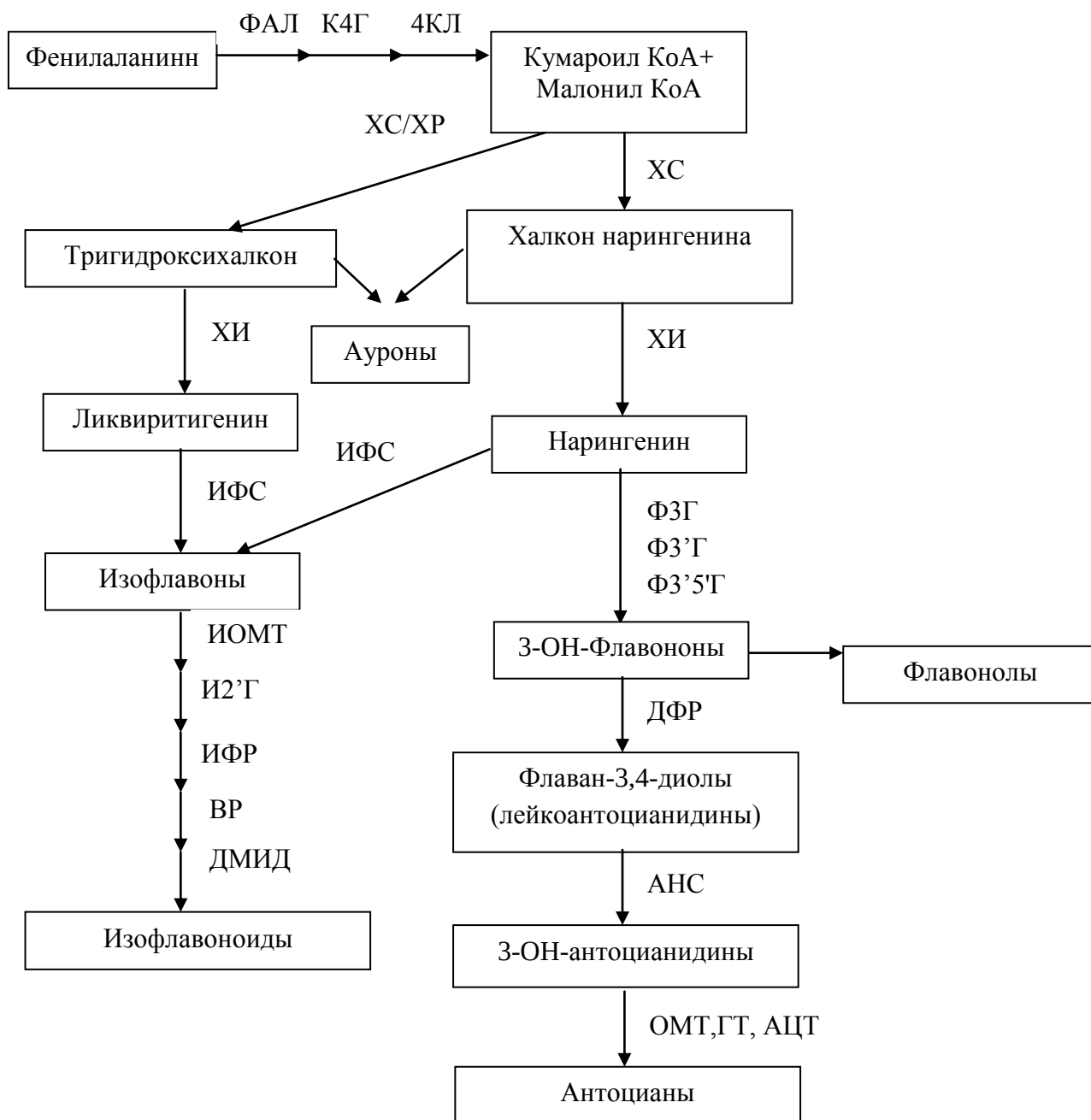


Схема 1. Биосинтез флавоноидов в растениях. ФАЛ – Фенилаланин аммонил лиаза, K4Г- кинамат(цинамат)-4 гидроксилаза, 4КЛ- 4-кумароил-КоА-лигаза, ХС-Халкон синтетаза, ХР-халкон редуктаза, ХИ-халкон изомераза, ИФС- изофлавоон синтаза, Ф3Г,Ф3'Г,Ф3'5'Г- флавоноид Зили 3' или 3'5' гидроксилаза, ИОМТ-изометил О-метилтрансфераза, И2'Г- изофлавоон 2' гидроксилаза, ИФР-изофлавоон редуктаза, ВР-веститон редуктаза, ДМИД -7,2'- дигидрокси 4'-метоксиизофлаванол дегидратаза, ДФР- дигидрофлавонол 4-редуктаза, АНС- антоцианидин синтаза (известна так же как лейкоантоцианидин диоксигеназа), ОМТ- О- метилтрансфераза , ГТ -гликозил трансфераза, АЦТ – ацетилтрансфераза.

1.1.3. Методы выделения и идентификации флавоноидов.

Методы выделения флавоноидов довольно многообразны и зависят от структуры того конкретного соединения или смеси соединений, которые нужно выделить. В большинстве случаев для выделения флавоноидов используется высушенное по всем нормам сырье. Если сырье содержит липидные компоненты, то сначала его экстрагируют липофильным растворителем, таким как гексан или хлороформ. После обезжиривания сырье подсушивается и экстрагируется этанолом, метанолом либо водным спиртом (50%-70%-ным). Экстракт упаривают, на остаток добавляют теплую воду и оставляют остыть, после чего из раствора удаляют липофильные вещества хлороформом или CCl_4 [23]. Для выделения флавоноидов из очищенного от неполярных веществ раствора обычно экстрагируют этот раствор этилацетатом или н-бутанолом. Полученную сумму флавоноидов подвергают разделению колоночной хроматографией, (в качестве адсорбента используют силикагель, полиамид или сефадекс LH-20). В качестве элюента применяют хлороформ, а затем метанольные либо спиртовые смеси с хлороформом.[18,19]

Для идентификации флавоноидов используют как качественные реакции [18], так и спектрофотометрические методы, УФ- и ЯМР-спектроскопию.

Известной качественной реакцией является цианидиновая реакция (проба Shinoda)– восстановление в кислой среде в присутствии лития или магния; при содержании флавоноидов (кроме халконов) окраска становится красной или оранжевой.(Рис. 19). Реакция проводится с использованием спиртовых экстрактов, в водном растворе реакция не идет.

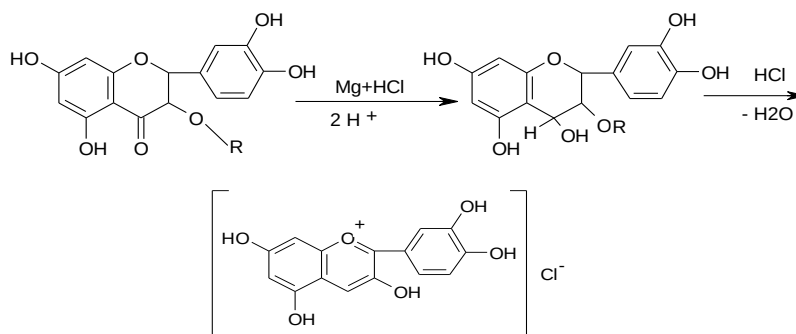


Рис. 19. Цианидиновая реакция флавоноидов.

Цианидиновая реакция по Брианту представляет из себя продолжение первой реакции с разбавлением полученного в октиловом или бутиловом спирте. Если в экстракте содержатся агликоны, то в верхнем слое появляется малиновая окраска, а в присутствии гликозидов окраска остается в нижнем слое.[18].

При добавлении к флавоноидам 2 % спиртового раствора хлорида алюминия (реакция с хлоридом алюминия) образуются окрашенные соединения, имеющие желто-зеленую флюоресценцию при длине волны 366 нм (батохромный сдвиг).

Известна также боролимонная реакция с использованием реактива Вильсона. Реактив Вильсона представляет из себя раствор 0,5г борной кислоты и 0,5 г безводной лимонной кислоты в 20 мл метанола. При применении этого раствора (в качестве проявителя тонкослойной хроматографии), если в УФ - свете видна зелено-желтая флюоресценция, то это свидетельствует о наличии 5-оксифлавонов и 5-окси- и 5- метоксифлавонолов, а если наблюдается желтая флюоресценция, то это означает присутствие 5-окси- и 5- метоксихалконов. При реакции хлористого цирконила с флавоноидами также образуется ярко-желтая окраска и желто-зеленая флюоресценция.[19]

При реагировании флавонов, флаванонов, флавонолов и флаванололов с раствором аммиака появляется желтое окрашивание, которое при нагревании переходит в оранжевое или красное. При реакции с халконами и аурунами образуется красное или пурпурное окрашивание. В отличие от перечисленных выше флавоноидов, антоцианы в присутствии аммиака образуют синюю окраску, а катехины не окрашивают. Эту реакцию используют при хроматографии на бумаге. При этом коричневые пятна гликозидов флавонов и флавонолов при проявлении парами аммиака приобретают в УФ-свете желто-зеленую флюоресценцию. Важным является также реакция флавоноидов с треххлористым железом: 1% спиртовый раствор треххлористое железа используется как проявитель для флавоноидов в тонкослойной хроматографии,

так как пятна приобретают коричневую окраску, если в 3-ем положении есть ОН группа, а если ОН -группа в 5 положении – зеленую, и - синюю окраску, если ОН группа находится в 3',4',5' положениях. [18].

1.1.4.Свойства и функции флавоноидов [18,19]

Флавоноиды являются природными красителями растительного характера и не синтезируются животными организмами. Флаваноиды и их производные, кроме применения в качестве красителей и стабилизаторов (в пищевой промышленности), имеют и важную биологическую ценность - обладают Р-витаминной активностью [24], проявляют желчегонные и гепатопротекторные свойства, применяются при разного рода болезнях печени, сердечно-сосудистой и нервной систем. Благодаря присутствию в структуре фенольных гидроксильных групп и карбонильной группы, флавоноиды обладают высокой биологической активностью и принимают участие в важных процессах жизнедеятельности растений, в частности, флавоноиды регулируют энергетические процессы, протекающие во время метаболизма.[18,19] Они являются переносчиками протонов через двухслойные липидные мембраны, стимулируют дыхание в митохондриях. Благодаря тому, что некоторые флавоноиды и антоцианидины поглощают свет в УФ спектре, они выполняют важные функции в процессе трансформации энергии, кроме того, именно способностью флавоноидов поглощать УФ свет обусловлена функция экранирования растений от радиации и избытка УФ лучей.[18,19]

1.1.5 Сырье, содержащее флавоноиды

Флавоноиды встречаются в разных частях растений, чаще всего в надземной части: в листьях, цветках, траве, плодах и семенах. В качестве наиболее используемых в медицине флавоноидсодержащих лекарственных растений можно отметить боярышники, пустырник, бессмертник песчаный, зверобой, горцы, софору японскую, расторопшу, а также хвощ полевой [18,19]. *Боярышник (Crataegus)*: все его виды - кустарники, принадлежащие

семейству Розоцветных (Rosaceae). Сырьем служат как цветки, так и плоды растения. В них содержатся флавоноидные гликозиды - кверцетрин (3-О-рамнозид кверцетина) и гиперозид (3-О-галактозид кверцетина), агликоном которых является, как видно из рисунка, кверцетин (Рис. 20) [25,26].

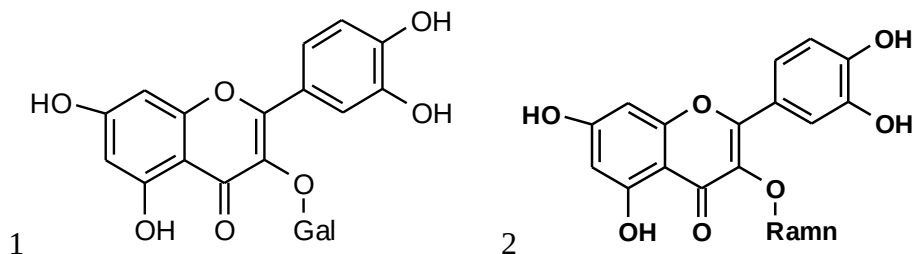


Рис. 20. Флавоноиды боярышника. 1- гиперозид, 2-кверцетрин.

Препараты, получаемые из цветков и плодов боярышника, обладают кардиотоническими свойствами и применяются при сердечной слабости. Из цветков и плодов получают настойки[27], из плодов получают также сухой экстракт, который входит в состав препарата “Кардиовален.”[27].

Софора японская (Sophora japonica) – дерево семейства бобовых (Fabaceae). Сырьем являются бутоны и плоды, в которых содержатся до 20% рутина (витамина Р), представляющего собой 3-О-рамноглюкозид кверцетина [28]. Кроме того, в сырье содержится также кемпферол-3-О-софорозид (Рис. 21).

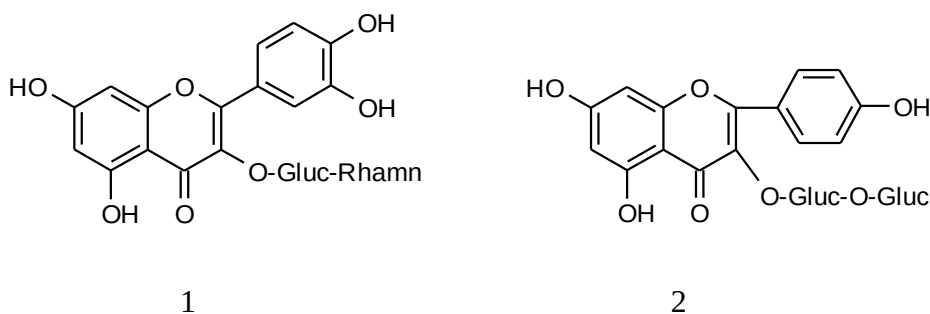


Рис. 21. Флавоноиды софоры японской: 1) рутин; 2) кемпферол-3-софорозид.

Из сырья получают как рутин, так и кверцетин в виде таблеток или порошков, оба вещества обладают Р-витаминной активностью, применяются при профилактике, недостатке витамина Р и при болезнях связанных с нарушением проницаемости сосудов [29,30].

Пустырник сердечный (Leonurus cardiaca L.) многолетнее растение семейства Яснотковых (Lamiaceae). Сырьем служит цветущая верхняя часть растения, содержит рутин и квинквелозид [19,30] (Рис. 22).

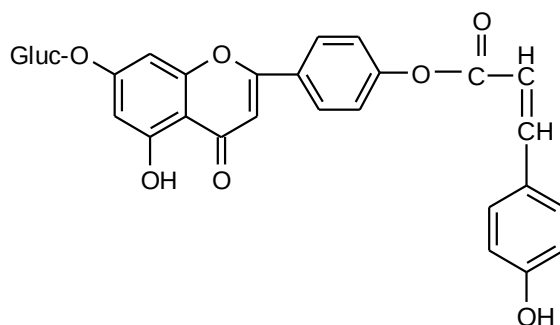


Рис. 22. Структура квинквелозида.

Из травы получают настойки и жидкие экстракты, которые обладают седативным действием и применяются при сердечно-сосудистых болезнях [31]. *Зверобой продырявленный (Hypericum perforatum L.)* - многолетнее растение семейства Зверобойных (Hypericaceae). Сырьем является цветущая трава, которая содержит рутин и гиперозид [32,33]. Из него получают настои, настойки, которые имеют антисептические, противовоспалительные свойства, применяются при кишечных воспалениях, а также обладают антидепрессантным действием [34].

Горец перечный (водный перец, Polygonum hydropiper L.) - однолетнее растение семейства Гречишных (Polygonaceae), сырьем служит цветущая трава, которая содержит до 2% флавоноидов, в основном кверцетин [35] и его гликозиды, персикарин. Из травы получают экстракты, которые входят в состав противогеморройных свечей, экстракты оказывают также кровоостанавливающее действие при маточных кровотечениях [36].

Хвощ полевой (Equisetum arvense.) - многолетнее спороносное растение семейства Хвощных (Equisetaceae). Сырьем служит надземная часть, которая содержит производные лютеолина, кемпферола [37]. Из сырья получают настои, обладающие мочегонным действием, которые применяются для лечения плеврита, воспалений мочевого пузыря и мочевых путей [38,39].

Василек синий (Centaurea cyanus L.) – однолетнее растение семейства Астровых (Asteracea). Сырьем служат краевые цветки [39;40], которые содержат производные апигенина, лютеолина, а также антоцианы, в частности цианин (3,5-диглюкозид цианидина, Рис. 23).

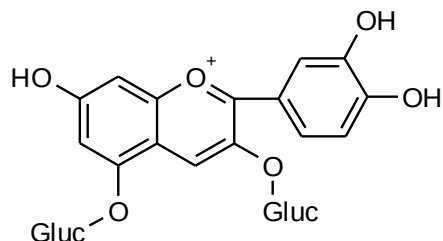


Рис. 23. Цианин.

Антоцианин проявляет в василке анионные свойства, чем и обусловлена синяя окраска. Отвары и экстракты, получаемые из василька обладают желчегонным, мочегонным свойствами и, поэтому цветки василька синего входят в состав лекарственных сборов .

Фиалка трехцветная (Viola tricolor L.) и *фиалка полевая (Viola arvensis)*- одно, двулетние растения семейства Фиалковые (Violaceae).[39]. Сырьем является цветущая трава. Растения содержат гликозиды дельфинидина, виоланин (Рис. 24).

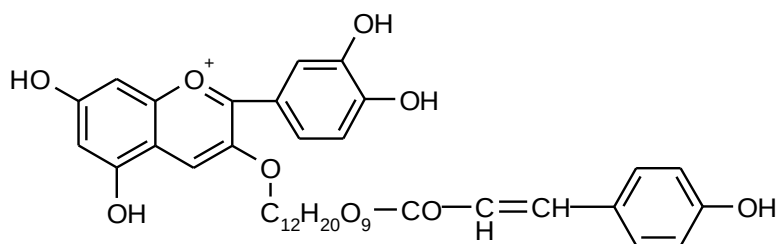


Рис. 24. Формула виоланина

Трава входит в состав мочегонных сборов. Настой травы обладает отхаркивающим действием, усиливает секрецию бронхиальных желез, разжижает мокроту[40].

Лимон (Citrus limon Burm f.) – дерево семейства Рутовые (Rutaceae). Сырьем для получения флавоноидного комплекса служит кожура плода лимона, после получения эфирного масла. В состав флавоноидного препарата

входят диосмин и гесперитин, которые являются биосидами – 7- β -рутинозидами диосметин и гесперетин (Рис. 25). [18,19]

Получаемый комплекс обладает Р витаминной активностью, увеличивает эластичность капилляров, уменьшает венозный застой, повышает тонус и снижает растяжимость вен, улучшает микроциркуляцию крови и лимфатический дренаж, понижает проницаемость капилляров [39;40].

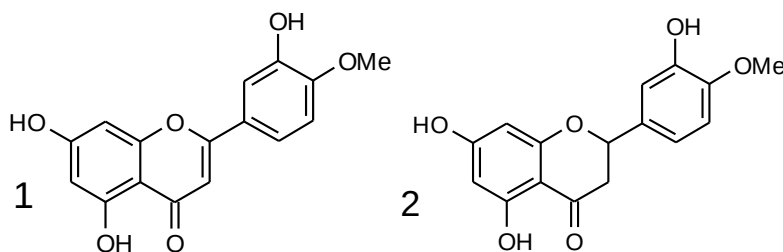


Рис. 25.1-диосметин, 2-гесперетин.

Из коры калины сливолистной (*Viburnum prunifolium* L.) [41] приготавливают препарат, содержащий бифлавоноид аментофлакон (Рис. 26) и используемый при терапии дисменореи и астмы [42].

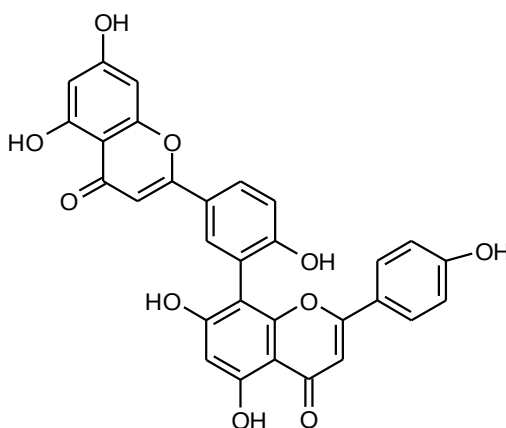


Рис. 26. Структура аментофлавона.

Экстракты плодов Черники (*Vaccinium myrtillis* L.), содержат вместе с дубильными и пектиновыми веществами также и смесь антоцианов (Рис. 27), состоящую из дельфинидина ($R_1=R_2=OH$), мальвидина ($R_1=R_2=OCH_3$), пеонидина ($R_1=OCH_3$; $R_2=H$) и петунидина ($R_1=OH$; $R_2=OCH_3$). Экстракты

используются в качестве сырья для приготовления лекарственных препаратов, применяемых в офтальмологии и кардиологии [43] .

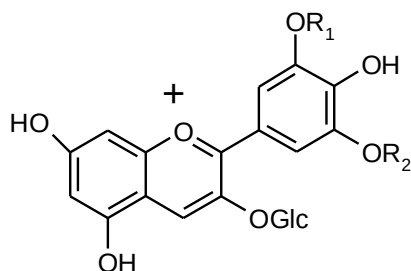


Рис. 27. Антоцианы черники.

Из высушенных листьев вахты трехлистной (трифоли, трилистника водяного –Menyanthes trifoliata L.) приготавливают применяемые в гинекологии галеновые препараты [44], содержащие в качестве главных активных компонентов смесь изофлавоноидов(Рис. 28): даидсенин ($R_1=R_2=H$), формамометин ($r_1=H$, $R_2=CH_3$), генистеин ($R_1=OH$, $R_2=H$), доханин А ($R_1=OH$, $R_2=CH_3$)

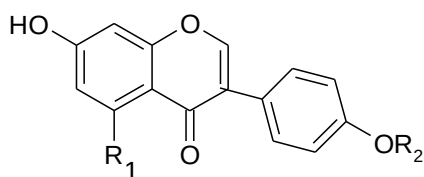


Рис. 28. Структура изофлавоноидов вахты трехлистной[43].

Соцветия бессмертника песчаного (Helichrysum arenarium)являются сырьем для получения лекарственного препарата Фламин.[45]

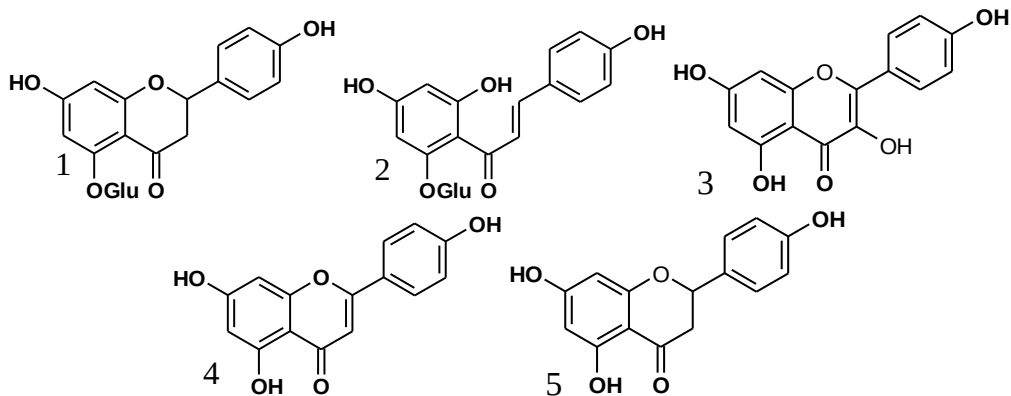


Рис. 29.Основные компоненты Фламина: 1.салипурпозид, 2. изосалипурпозид, 3. кемпферол, 4.апигенин, 5. нарингенин

Фламин представляет собой смесь флавоноидных соединений (Рис. 29)-гликозидов салипурпозид (1), изосалипурпозид(2) и агликонов: кемпферол (3), апигенин (4), нарингенин (5) и является желчегонным препаратом. Он используется для лечения болезней печени, желчного пузыря, при хронических холециститах, при воспалении желчных желез [19].

Плоды расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) содержат “Силимарин”- смесь флаволигнанов (Рис. 30) (силибина-1, силидианина -2, силикрстина-3) и флаванолола(таксифолина-4), из которой приготавливают эффективные гепатопротекторные препараты. [46,47]

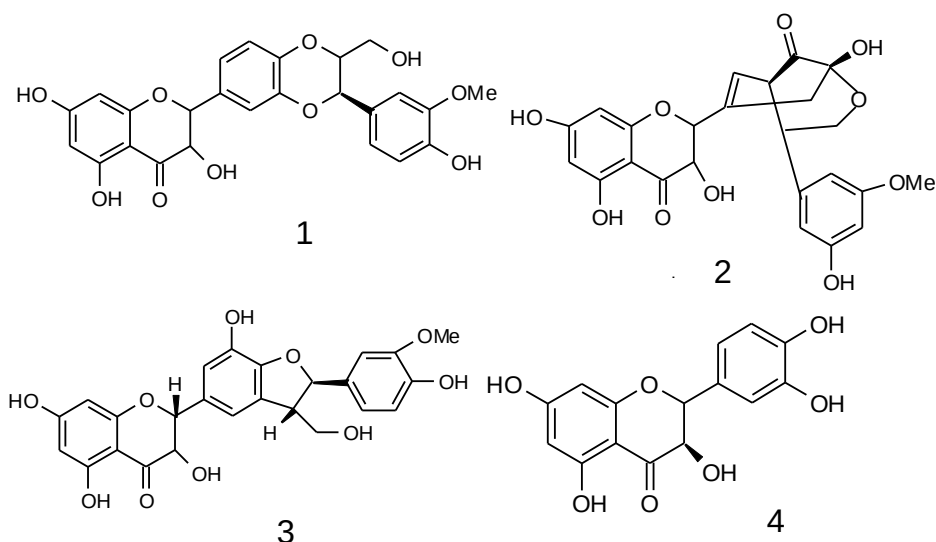


Рис. 30. Флавоноидные соединения расторопши.

1.2. Жирные масла и омега-3 ненасыщенные кислоты

1.2.1. Жиры, жирные масла и жирные кислоты.

Понятие о жирах и жирных маслах общеизвестно из школьного курса по химии и биологии: это вещества, необходимые для человеческого организма, как и сахара, в качестве питательных и энергетических продуктов. И жиры, и жирные масла, в принципе, одинаковы по своей химической структуре: являются сложными эфирами глицерина и моноосновных (“жирных”) кислот (Рис. 31). Это вещества животного и растительного происхождения. Под названием “жиры” подразумевают животные жиры, а под названием “жирные масла” – растительные и, отчасти, рыбы жиры. Структурное отличие

растительных жиров от животных жиров обусловлено различием кислот в триглицеридных молекулах. [48]

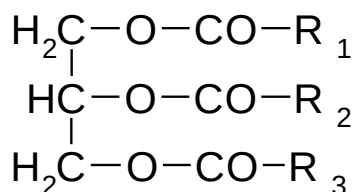


Рис. 31. Общая структура триглицерида.

Как в животных, так и в растительных жирах в качестве кислотных фрагментов выявляются остатки кислот с количеством углеродных атомов в них от 14 до 22 (большой частью 18), но в растительных маслах это остатки, главным образом, ненасыщенных кислот, а у животных жиров, в основном – насыщенных.

Эти различия отражаются на физических, химических характеристиках и свойствах животных и растительных жирных масел, а также на их биологической активности. Структурное разнообразие жирных масел, кроме разнообразия, различия структур кислот, включенных в молекулу триглицерида, обусловлено также и различием положения кислотных остатков в молекуле триглицерида, что приводит, разумеется, к еще большему разнообразию триглицеридных молекул в маслах.

Наиболее распространенными кислотными компонентами в растительных жирных маслах являются: из насыщенных кислот – пальмитиновая (гексадекановая), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ и стеариновая (октадекановая), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ кислоты, а из ненасыщенных – олеиновая (цис-9-октадеценная) кислота, линолевая (9,12-цис-октадекадиеновая кислота), из полиненасыщенных кислот: α-линоленовая (цис,цис,цис-9,12,15-октадекатриеновая кислота), $\text{CH}_3-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_3-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$; γ-линоленовая (цис,цис,цис-6,9,12-октадекатриеновая кислота), $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$; арахидоновая кислота (цис-5,8,11,14-эйкозотетраеновая

кислота), $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$, а также другие цис-эйкозановые кислоты: эйкозапентаеновые и эйкозагексаеновые кислоты.

Источником образования ингредиентов жирных масел в растениях являются сахара - глюкоза и фруктоза, которые под воздействием ферментов трансформируются, как в молекулы глицерина, так и в молекулы жирных кислот.[48] Биосинтез жиров в растениях проходит в несколько этапов, сначала в пластидах синтезируются жирные кислоты[49], их синтез происходит по ацетато-малонатному пути с участием ацетил КоА и кофермента Никотинамидадениндинуклеотид (НАД), образуется пальмитиновая кислота, из которой далее наращиванием углеродной цепи синтезируются и остальные жирные кислоты [50-52]. В биосинтезе жиров в качестве предшественника глицерина выступает дигидроксиацетон, который является продуктом катаболизма углеводов. Завершающий этап биосинтеза триглицеридов в растениях представляют протекает как показано на Рис. 32. [18]:

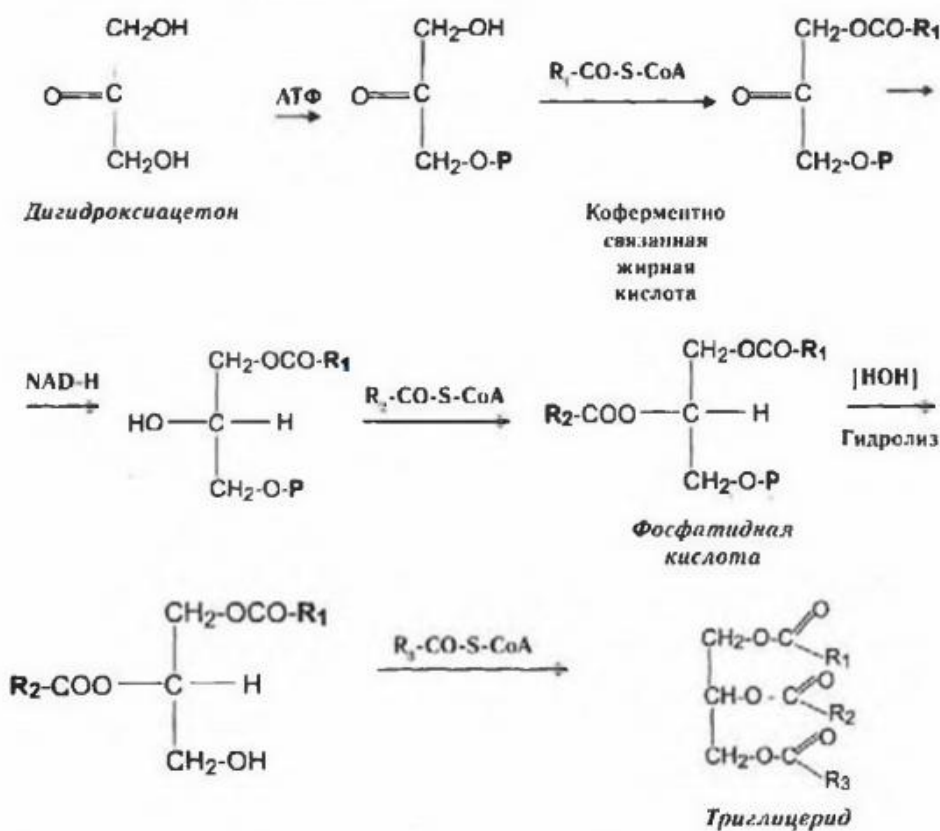


Рис. 32. Процесс биосинтеза триглицеридов.[18]

Очевидно то, что процесс биосинтеза и накопления триглицеридов в существенной мере зависит от биохимических особенностей конкретного растительного организма и, в неменьшей степени, от почвенно-климатических условий, места его произрастания, то есть, как от наследственных, особенностей, присущих каждому виду растения, и стадий его онтогенеза, так и от условий окружающей среды обитания или условий возделывания. Таким образом, количество жирного масла, его состав, не являются постоянными и зависят как от биологического вида, сорта, так и от почвы и климата. Состав жирного масла, качественный набор жирных кислот (насыщенных и ненасыщенных) остается более или менее постоянным, т.к. это - признаки, присущие данному виду, в то время как климатические факторы - свет, тепло и влага, почва оказывают существенное влияние на эффективность протекания синтеза триглицеридов.

Издревле человечество использует жиры и жирные масла животного и растительного происхождения, в основном, для пропитания. Наиболее существенным источником растительных масел, как известно, являются семена однолетних растений (подсолнечника, кукурузы, сои), возделываемых крупномасштабно во многих странах мира с умеренным климатом, а также плоды деревьев (кокосовых, пальмовых, оливковых) выращиваемых в жарких (тропических и субтропических) странах и в других странах с теплым климатом. В Таблице 1 представлено мировое ежегодное потребление растительного масла в тысячах тонн, в 2001 – 2002 г.г. (по данным [53]).

Растущее во всем мире потребление растительного масла, безусловно превышает сегодня цифру 91 млн. тонн в год. Вместе с этим, все больше внимания уделяется улучшению вкусовых и питательных качеств (показателей) пищевых масел. Так, например, удержанию соевого масла на позиции самого используемого растительного масла способствовало устранение из него (или уменьшение в нем), методом частичной гидрогенизации, избыточного

количества линоленовой кислоты, являющейся причиной неприятного, для многих, привкуса этого масла.

Таблица 1.

Потребление растительного масла в мире в тыс.т. (в 2001-2002 г.г.)

1	Соевое	28685
2	Пальмовое	24850
3	Рапсовое	12185
4	Подсолнечное	7557
5	Арахисовое	4295
6	Хлопковое	2815
7	Кокосовое	3256
8	Пальмоядерное	3106
9	Оливковое	2627
10	Кукурузное	1116
Итог	Всего	91302

Общеизвестным фактом является и то, что многие жирные масла используются в качестве растворителей (носителей) для приготовления различных препаратов косметологии и медицины. Известны также многочисленные примеры прямого использования в научной и народной медицине растительных жирных масел в качестве лекарственных средств.

В структурном аспекте, как было отмечено выше, растительные масла отличаются от масел животных (животного жира) высоким, а чаще 100%-ным содержанием непредельных кислот в триглицеридах, в то время как у животных жиров, в триглицеридах которых, если и есть остатки непредельных кислот, то они, как правило, связаны сложноэфирной связью не со вторым, а с первым и (или) третьим углеродным атомом глицериновой молекулы [54].

Переваривая пищу, человеческий организм получает высвободившуюся энергию и продукты переработки этой пищи – метаболиты, часть которых

необходима организму. Однако, есть ряд веществ, которые человеческий организм не в состоянии синтезировать сам. К числу таких веществ относятся, так называемые, «незаменимые жирные кислоты». Незаменимыми жирными кислотами являются омега-3- и омега-6-полиненасыщенные жирные кислоты: омега-3-ПЖК и омега-6-ПЖК. В организме альфа- и гамма-линоленовые кислоты, омега-3-ПЖК и омега-6-ПЖК, служат предшественниками простагландинов – биорегуляторов, которые оказывают противовоспалительное действие, препятствуют развитию сердечно-сосудистых заболеваний, образованию тромбов, стимулируют формирование и развитие тканей мозга [55].

Пищевые растительные масла получают (выделяют) из растительного сырья, как правило, методом прессования (горячего и холодного), затем полученные масла подвергают очистке, рафинированию.

Медицинские (лекарственные) масла также получают прессованием, обычно – холодным, но в некоторых случаях выделяют методом экстракции растворителями.

Выделенные масла характеризуют для сравнения со стандартами, определяя их «кислотное число», «число омыления», «показатель преломления», «плотность», подвергают щелочному гидролизу, выделяют кислоты из гидролизата, затем превращают их в эфиры (метиловые или этиловые) и последние анализируют методом газожидкостной хроматографии для выяснения кислотного состава исходных триглицеридов. Работа эта довольно кропотливая, но необходимая.

1.2.2. Жирные масла в медицине.

Ниже приведены сведения о ряде наиболее используемых в медицинской практике растительных жирных маслах: [19,25,40,48,56,57]

1. Оливковое масло - *Oleum Olivarum*.

Сырье – плоды Маслины европейской (*Olea europaea* L.), принадлежащей семейству Маслиновых (*Oleaceae*). Плоды маслины (сочные, спелые костянки до 2-3 см длиной) подвергают холодному прессованию. Полученное с выходом не менее 50% масло (прозрачное, бесцветное) используется как пищевое и для медицинских целей, в качестве растворителя при изготовлении инъекционных лекарственных препаратов (препаратов половых гормонов, камфоры) [25]. Триглицеридный состав масла представлен почти на 100% триолеином.

2. Персиковое масло – *Oleum Persicorum*.

Под общим названием “Персиковое масло” объединены растительные жирные масла, получаемые с выходом не менее 30% из семян косточковых плодов ряда деревьев семейства розоцветных: сливы, алычи (*Prunus*), персика (*Persica*), абрикоса (*Armenia*) . Масла эти близки по составу и используются в медицине так же, как и оливковое.

3. Миндальное масло – *Oleum Amygdalarum*.

Получают из семян плодов миндаля (*Semina Amygdali*), сладкого (*Amygdalus communis forma dulcis*) и горького (*Amygdalus communis forma amara*), с выходом: из семян сладкого миндаля до 50%, а из горького – меньше. Жирнокислотные составы очищенных масел одинаков: 85%- олеиновая кислота, 12% - линолевая кислота. Миндальное масло используется в медицине так же, как оливковое и персиковое.

4. Арахисовое масло – *Oleum Aravhides*.

Получают из плодов – семян подземных бобов арахиса (*Arachis hypogaea* L., семейство бобовых) с выходом 40-50%, методом прессования. Кислотный состав масла: до 70% олеиновая и до 20% линолевая кислоты. Жирное масло и выделенные кислоты нашли использование в медицине и косметологии при приготовлении мазей и суппозиториев для наружного применения.

5. Подсолнечное масло – *Oleum Helianthi*. Получают, как известно, из семян подсолнуха (*Helianthus annuus* L., семейство Астровые) методами холодного (для медицинских целей) и горячего прессования, с выходом, в среднем 40% и с кислотным составом триглицеридов: 39% - олеиновая и 47% - линолевая кислоты. В фармации подсолнечное масло широко используется для получения масляных экстрактов лекарственных растений и для приготовления масляных растворов лекарственных препаратов.

6. Кукурузное масло - *Oleum Maydis*.

Получают из зародышей зерновок кукурузы (*Zea mays* L.) методом прессования с выходом до 50%. Содержание олеиновой кислоты в триглицеридах достигает 45%, линолевой 48%. Масло содержит также токоферолы (витамин E) и фитостеролы. Масло кукурузы используют в медицине в качестве гипохолестеринэмического средства.

7. Касторовое масло – *Oleum Ricini*.

Получают из семян клещевины обыкновенной (*Ricinus communis* L.) - однолетнего растения семейства Молочайные, с выходом 40 – 60%, методом прессования. Основным триглицеридом касторового масла является (до 85%) глицерин ацилированный полностью рицинолевой кислотой. По своему строению рицинолевая кислота это олеиновая кислота, содержащая гидроксильную группу при 12-м углеродном атоме (считая от карбоксильной группы). Рафинированное касторовое масло с давних пор используется в медицине в качестве эффективного слабительного средства. Техническое касторовое масло является уникальным, стойким смазочным материалом в промышленности.

8. Льняное масло – *Oleum Lini*.

Получают из семян льна методом горячего прессования. Содержание масла и количественное соотношение главных кислотных компонентов триглицеридов масла (линолевых и линоленовых кислот) существенно

зависит от сорта льна и условий его выращивания – колеблется в пределах 24 – 44% содержания масла и 25 -60% и 20 – 15% содержания указанных кислот.

Из льняного масла приготавливают линимент от ожогов и производят препарат “Линетол” – смесь этиловых эфиров названных выше кислот, применяемого при атеросклерозе.

9. Облепиховое масло – *Oleum Hipporphae*.

Получают из плодов облепихи крушиновидной (*Hipporphae rhamnoides* L.), методом экстракции подсолнечным маслом. Содержит смесь подсолнечного масла с жирным маслом плодов облепихи (в соотношении 3:7) и растворенные в этой смеси каротиноиды. Используется в медицине как противовоспалительное, ранозаживляющее средство.

10. Беленное масло – *Oleum Hiosciami*. [57]

Получают из высушенных листьев белены (*Hiosciamus niger* L.) методом экстракции подсолнечным маслом. Содержит раствор липофильных компонентов листьев белены в подсолнечном масле, в том числе менее 0,1% смеси алкалоидов атропин, гиосциамин. Используется в медицине наружно при невраглии.

11. Масло какао – *Oleum Cacao*.

Получают из обжаренных семян плодов шоколадного дерева (дерева какао – *Theobroma cacao* L.) методом горячего прессования. Представляет собой при комнатной температуре (20-25°C) светложелтоватую воскообразную массу. Содержит почти равную смесь триглицеридов насыщенных (лауриновой, стеариновой) и ненасыщенных (олеиновой, линолевой) кислот. Используется при восполении пищевода, а также как усиленное и диетическое питание в виде разных модификаций шоколада.

1.2.3. Характеристика жирных масел методом ЯМР-спектроскопии.

Изучение жирных масел посредством ^1H - и ^{13}C -ЯМР- спектроскопии было предпринято в конце 20-го столетия, когда стало возможным исследование столь сложных смесей природных соединений, какими являются жиры и жирные масла, благодаря внедрению и использованию для этих целей более мощных приборов, чем спектрометры ЯМР - 60 и даже 100 мегагерц. К числу наиболее информативных и обстоятельных научных сообщений в этой области относятся статьи исследователей из Китая [58] и Италии [59;60] . В работах этих исследователей, на примере рассмотрения спектров ЯМР оливкового масла (Рис. 33), а затем и других растительных масел было продемонстрировано подобие картин спектров разных масел по расположению сигналов водородных атомов (в ^1H -ЯМР-спектре) и атомов углерода (в ^{13}C -ЯМР –спектре), сделано корректное отнесение фиксированных сигналов к определенным структурным фрагментам, что позволило сделать заключение о наличии конкретных кислот в триглицеридных смесях. Эти работы и последующие публикации в этой области [61;62] подтвердили целесообразность использования методов ЯМР-спектроскопии для изучения и структурного анализа жирных масел.

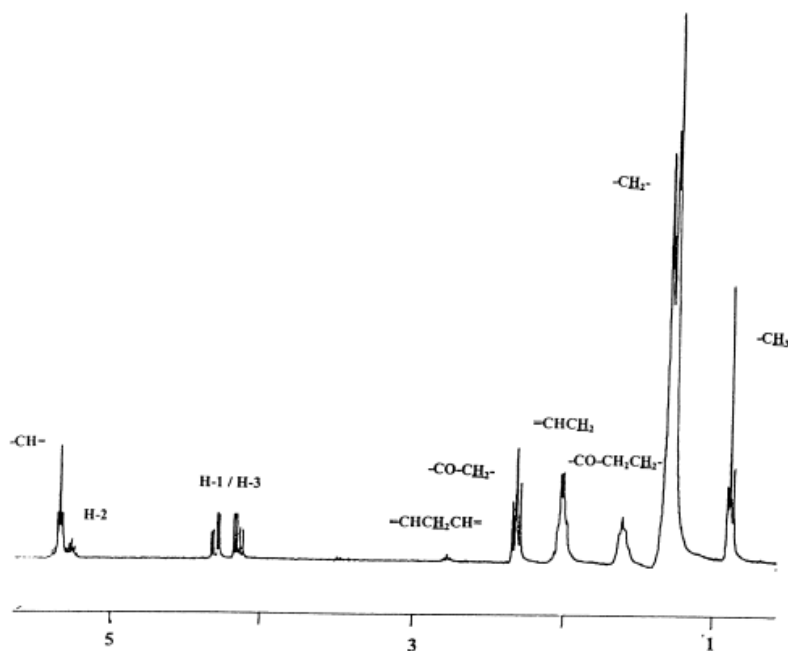


Рис. 33 ^1H -ЯМР – спектр оливкового масла (на приборе 300 МГц)[58].

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ

2.1. Изучение соцветий бессмертника красноватого в качестве возможного источника препарата “Фламин”[63;64]



а)

б)

Рис. 34. Разновидности бессмертника. а) Бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium*), б) Бессмертник красноватый (*Helichrysum rubicundum*)

Вещество под названием “Фламин” - желтый порошок, который получают из цветков Бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) (Рис. 34,а). Известно много разновидностей рода Бессмертник (*Helichrysum* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*). Бессмертник песчаный произрастает в основном на территории России и Украины, по этой причине фламин производится, в основном, именно в этих регионах по методу [65]. Бессмертник песчаный не зафиксирован во флоре Армении, где есть 6 других видов.

Один, из них наиболее распространенный, полиморфный вид - Бессмертник красноватый (Рис. 34.б) (*Helichrysum rubicundum* (C. Koch)) [66]. “Фламин” представляет собой смесь флавоноидных соединений - гликозидов салипурпозид, изосалипурпозид и агликонов: кемпферол, апигенин, нарингенин[39,67,68]

Нами по методу [65] было предпринято изучение химического состава соцветий бессмертника красноватого, собранного на территории, окружающей озеро Севан, и производимого в упакованном виде (Рис. 35.) кооперативом «Бусабуйж нана» при Севанском ботаническом саде.



Рис. 35. Упаковка соцветий бессмертника красноватого

Измельченные, высушенные соцветия бессмертника были экстрагированы 50% этанолом в аппарате Сокслета. Полученный экстракт упаривался до водного раствора, который охлаждался, фильтровался, подвергался экстрагированию смесью этилацетат- этанол (9:1) и затем полученный этилацетатный экстракт упаривался досуха.

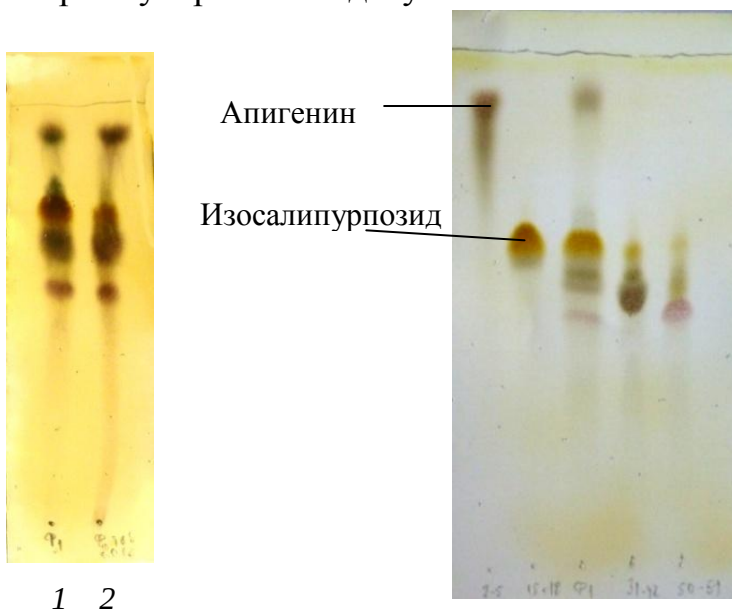


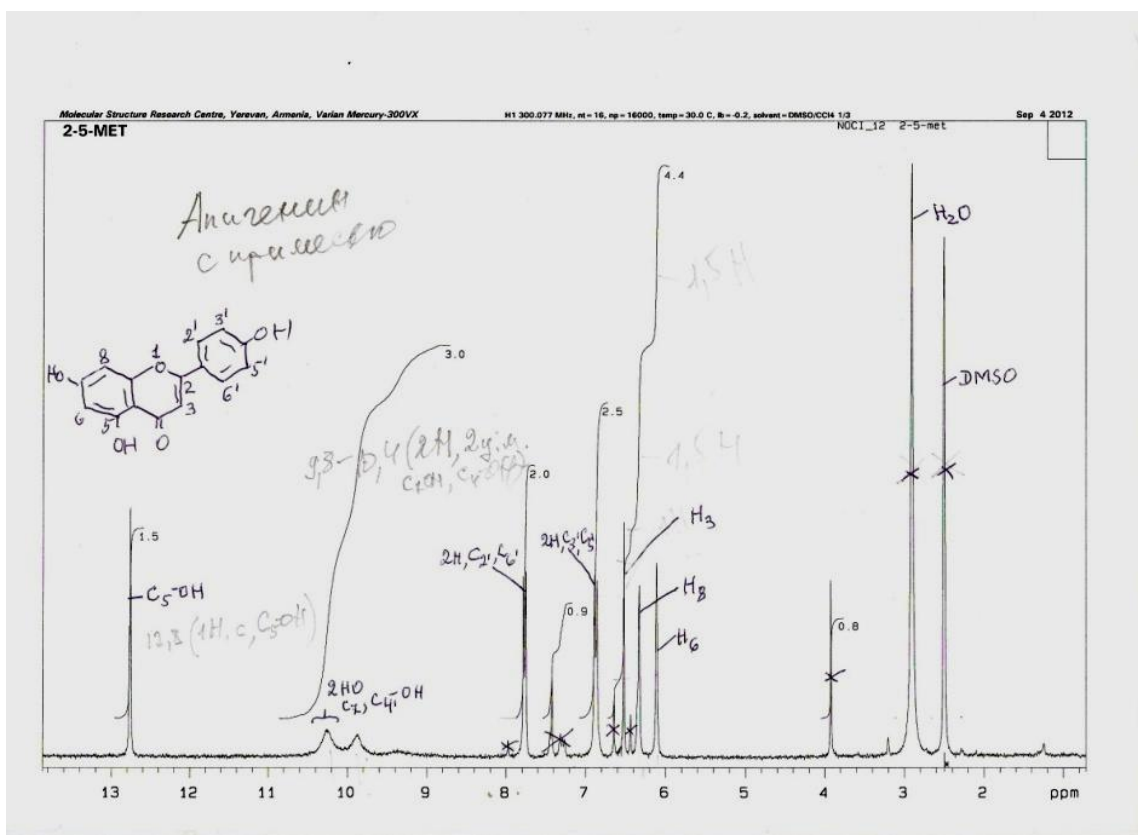
Рис. 36. ТСХ полученного экстракта(1) и аптечного препарата «Фламин»(2)

Рис. 37 ТСХ полученных фракций(2-5)- апигенин, (15-18)-изосалипурпозид

Выход высушенного экстракта (условно обозначенного как Ф1) составил около 6%. Сравнением его с аптечным препаратом “Фламин”, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (Рис. 36), была показана схожесть картин ТСХ флавоноидных составов полученного экстракта (Ф1) и препарата “Фламин”.

Далее, экстракт Ф1 подвергли разделению на фракции колоночной хроматографией на силикагелевой колонке. Элюированием смесью этилацетат - метанол в разных соотношениях, с последующей перекристаллизацией полученных фракций были выделены два из главных компонентов Фламина - изосалипурпозид и апигенин (Рис. 37.), Истинность изосалипурпозид и апигенина была подтверждена и доказана, главным образом, методами ТСХ и ЯМР – спектроскопии (Рис. 38-

Рис. 40).



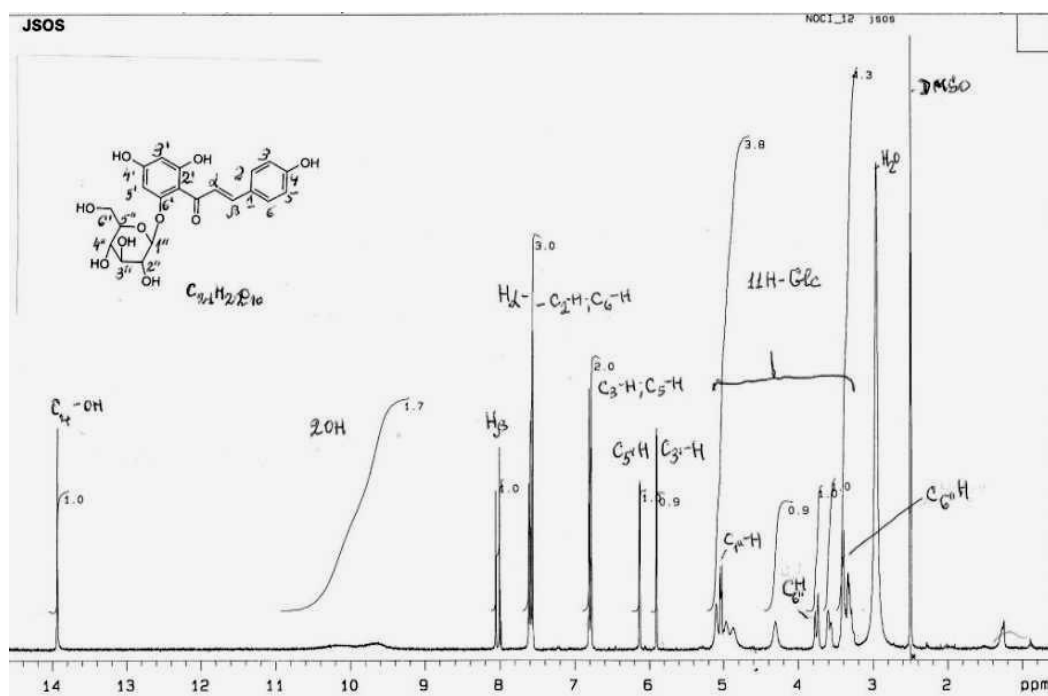
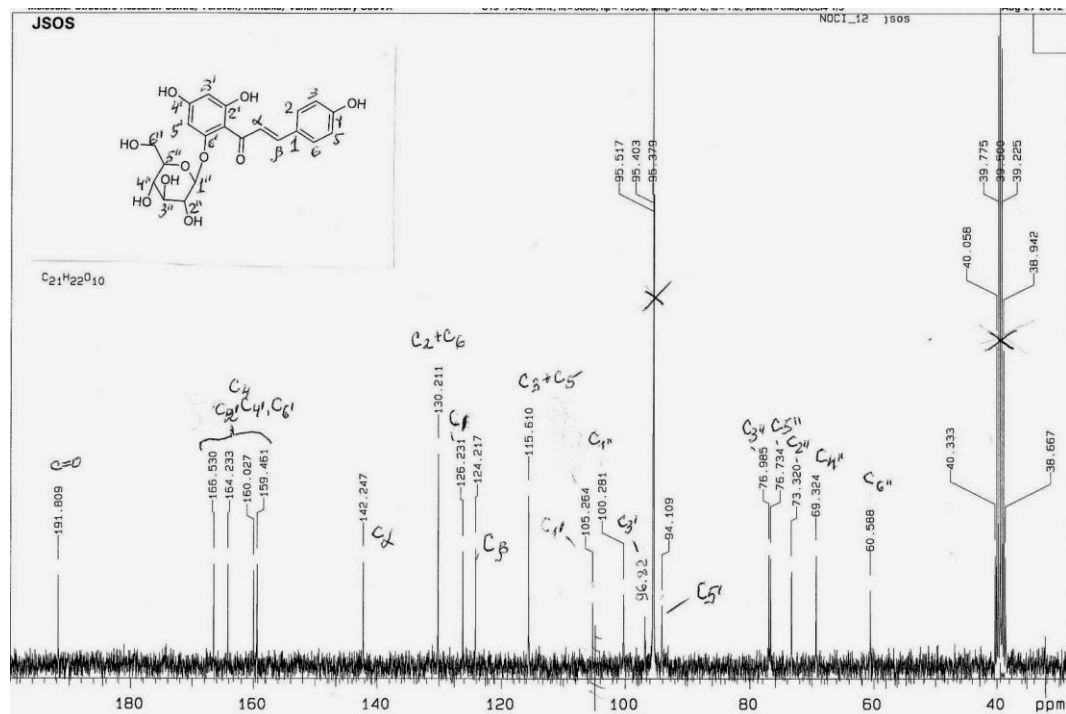


Рис. 38. Спектр ^1H - ЯМР выделенного апигенина

Рис. 39. ^1H -

спектр выделенного
изосалиурпозид



Как показали ^1H - ЯМР- спектр и тонкослойная хроматограмма, выделенный апигенин недостаточно чист, что затруднило его идентификацию по температуре плавления образца, однако это не помешало его идентификации, отнесением сигналов спектра ^1H -ЯМР.

Полученные результаты оправдывают использование соцветий бессмертника красноватого в традиционной медицине в качестве заменителя бессмертника песчаного и являются, по нашему мнению, достаточным основанием для его дальнейшего медико-биологического исследования с целью официнализации.

2.2. Изучение флаволигнанов лиловоцветковой расторопши [69;70].

Уже более 50-и лет в качестве эффективных гепатопротекторных лечебных средств в медицинской практике разных стран используются препараты, созданные на основе «Силимарина» - смеси флаволигнановых соединений, выделяемой из семян расторопши пятнистой [*Sylibum marianum* (L.) Gaertn.] [71,72,73], принадлежащей семейству Астровых (Asteraceae). Растение это - дикорастущий во многих странах двулетник, покрытый мелкими, острыми колючками, легко поддающийся выращиванию на плантациях [74] и характеризующийся наличием белоцветковой и лиловоцветковой разновидностей [75]. У лиловоцветковой расторопши обнаружены две разные хеморасы [76;77]. На территории Республики Армения встречается лиловоцветковая расторопша (довольно редко, в основном в окрестностях Иджевана) [66], но в Арцахе, как это было показано ресурсной оценкой [78], его лиловоцветковая разновидность образует местами густые заросли, занимающие значительные территории. Отличие хеморас расторопши друг от

друга проявляется, в основном, разным количественным соотношением в «силимарине» двух из шести его главных компонентов – флаволигнанов «силибин» и «силидианин» (Рис. 41). Соответственно, различают силибиновую хеморасу (с содержанием по количеству в «силимарине» силибина и силидианина в соотношении порядка 17:1) и силидианиновую хеморасу (с подобным соотношением в пределах 0,64:1), как это было показано [79;80;81] анализом «силимаринов», выделенных из семян разных образцов расторопши, выращенных в одиннадцати ботанических садах Европы. При изучении «силимарина» методом препаративной ВЭЖХ [81] было также доказано, что силибин является смесью четырех стереоизомеров (по C-2, C-3, C-2¹, C-3¹) : силибинов А, Б и изосилибинов А, Б. Эти обстоятельства обуславливают актуальность изучения состава флаволигнановых фракций расторопши из химически малоисследованных ареалов произрастания, с целью выяснения, в первую очередь, ее хеморасы, а также целесообразности дальнейших исследований, в качестве лекарственного сырья.

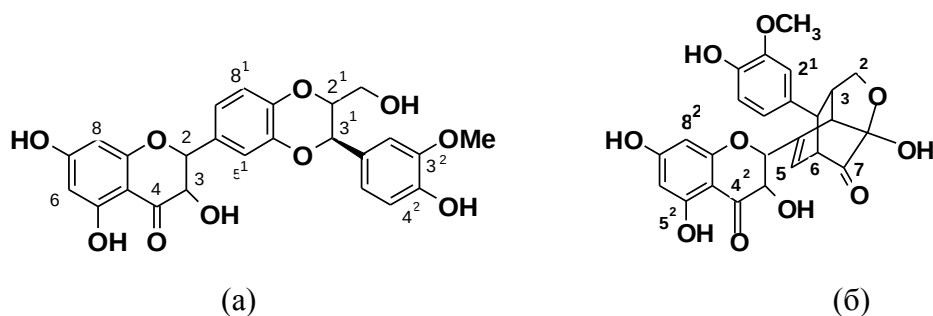


Рис. 41. Главные флаволигнаны «Силимарина»: силибин (а), силидианин (б).

Задачей данной работы являлось определение хеморасы дикорастущей в Арцахе лиловоцветковой расторопши пятнистой. Для разрешения этой задачи из семян расторопши пятнистой, собранных на территории Арцаха, была получена по известной методике [81] флаволигнановая вытяжка - «силимарин», выход которой (2,89%) соответствовал ожидаемому. Методом сравнительной тонкослойной хроматографии (ТСХ) была выявлена схожесть хроматограмм полученной флаволигнановой вытяжки и образца препарата Легалон, содержащего «силимарин». Затем, колоночной хроматографией (КХ)

флаволигнановой вытяжки на силикагеле, выделили силибинсодержащую (2,9 г) и силидианинсодержащую (3,3 г) фракции, а из последних, обработкой растворителями отделили в чистом состоянии силибин (0,431 г) и силидианин (0,98 г). Об идентичности выделенных флаволигнанов с силибином и силидианином, свидетельствовали характеристики их спектров ЯМР (Рис. 42-Рис. 45.), совпадающие с описанными [75;81]. Сравнение количеств выделенных флаволигнанов показало, что в семенах лиловоцветковой расторопши из Арцаха главным по количеству компонентом флаволигнановой смеси является силидианин (соотношение силибиновой фракции к силидианиновой составило 0,88:1), а соотношение выделенных флаволигнанов – 0,44:1,0. Полученные данные указывают на принадлежность изученной нами расторопши пятнистой к силидианиновой хеморасе.

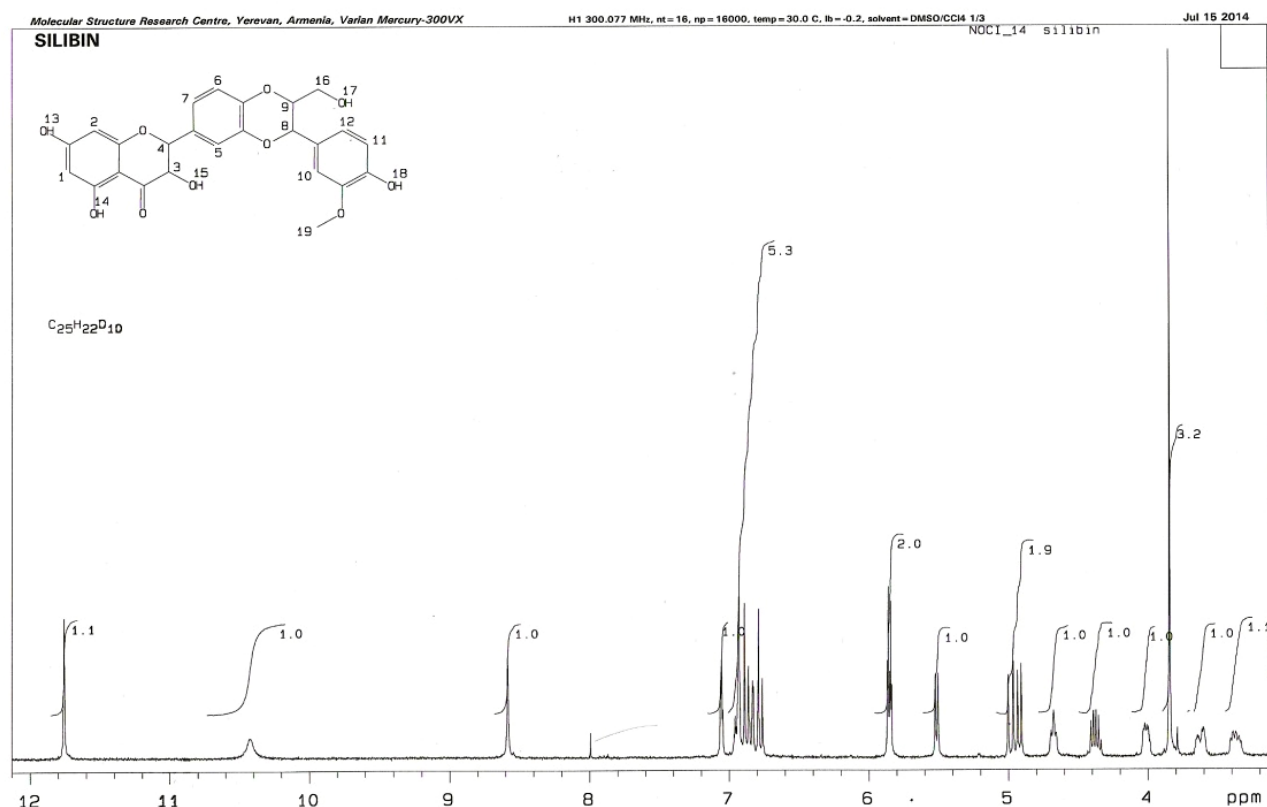


Рис. 42. ^1H ЯМР- спектр Силибина

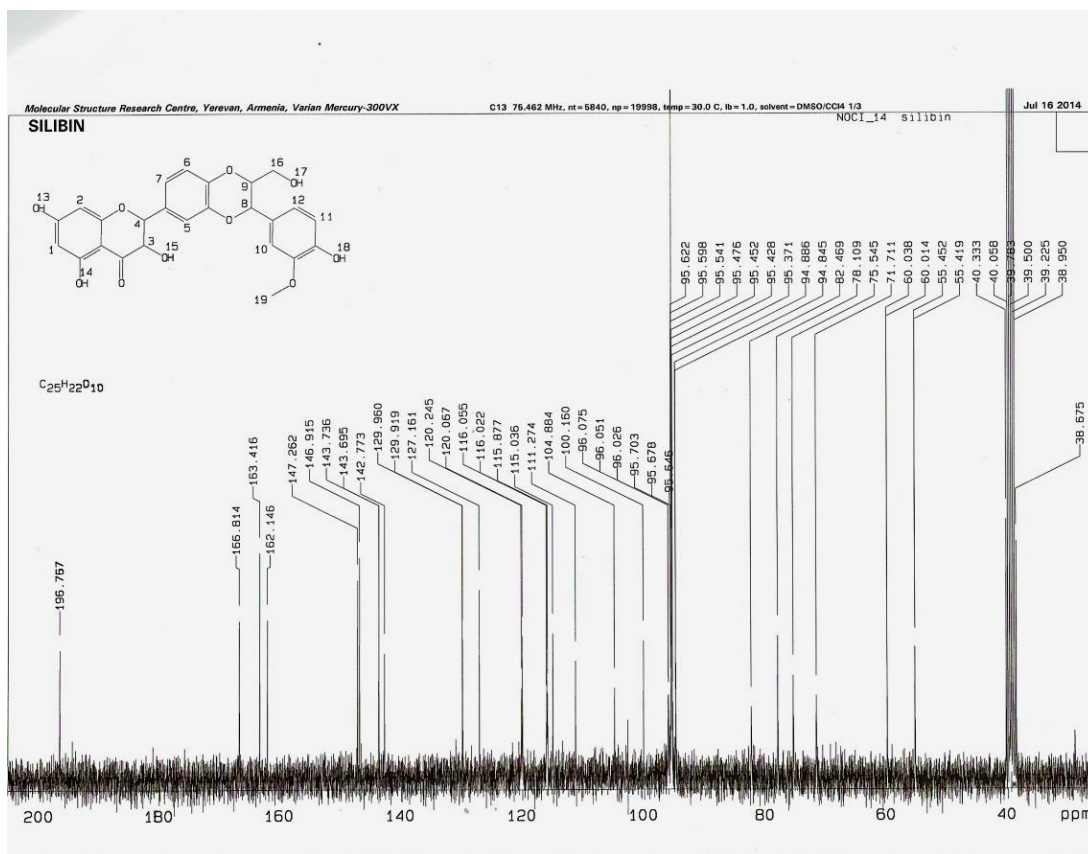


Рис. 43. ^{13}C ЯМР – спектр Силибина

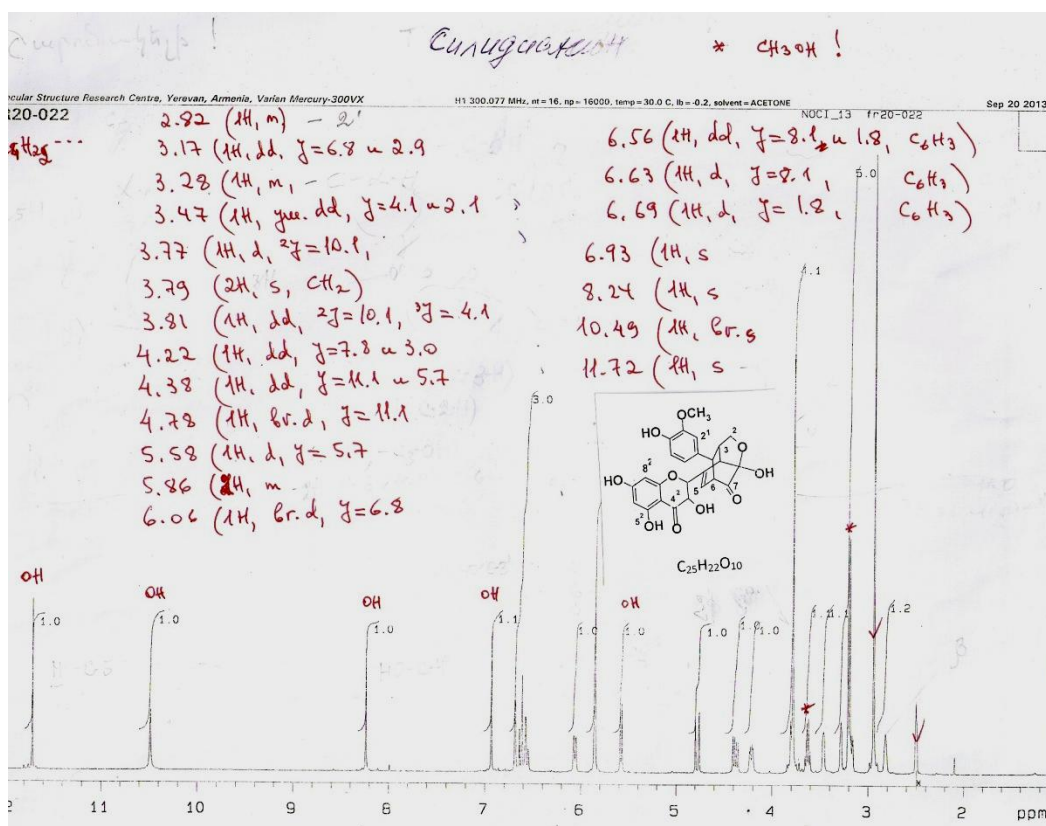


Рис. 44. ^1H ЯМР-спектр Силидианина

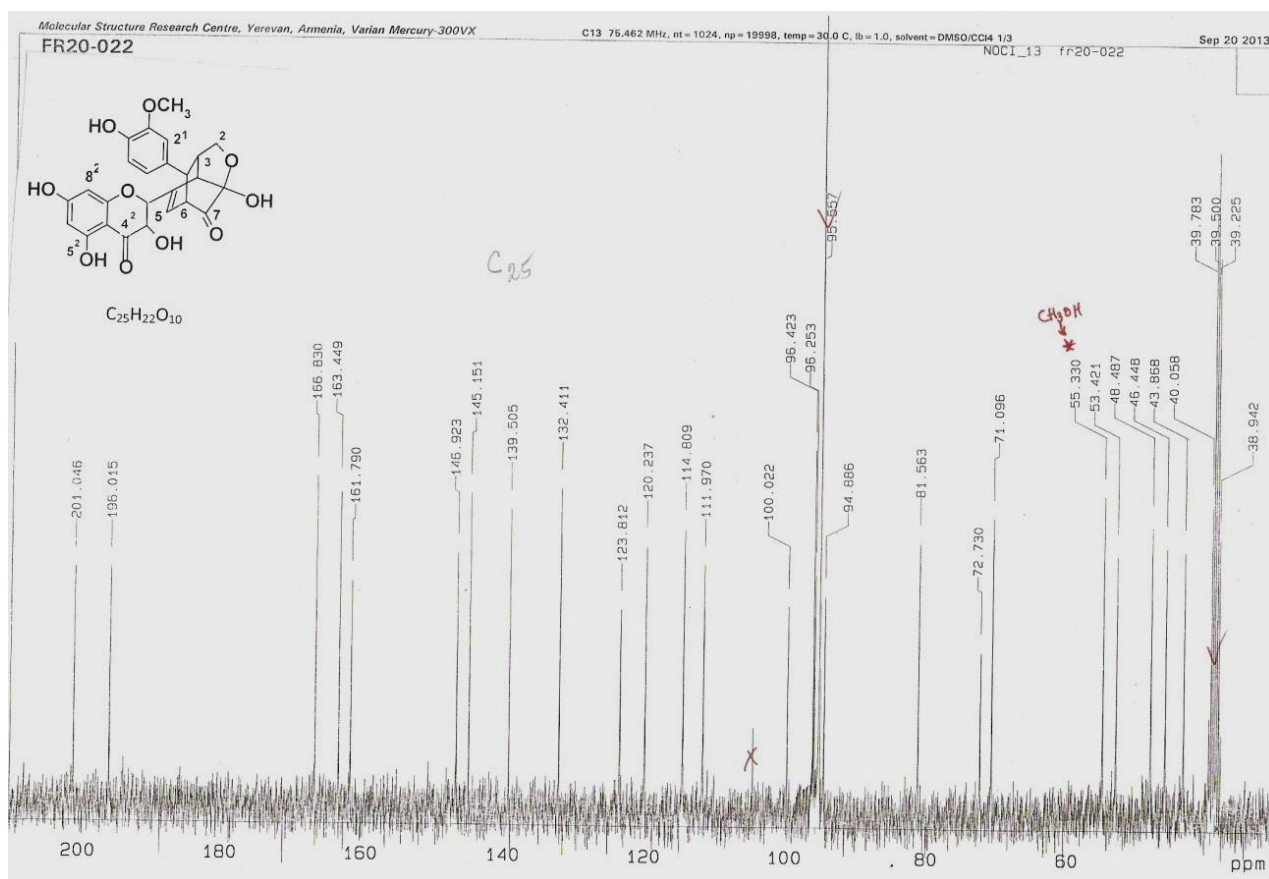


Рис. 45. ^{13}C ЯМР-спектр Силидианина

2.3. Сравнительное изучение содержания жирного масла и флаволигнанов в семенах расторопши пятнистой /*Silybum marianum* (L.) Gaertn. / почвенного и гидропонического происхождения. [82]

Семена расторопши пятнистой, как было отмечено выше, являются сырьем для приготовления ценных гепатопротекторных препаратов (Карсил, Легалон, Силибор, Силимар, Силиминин и др.) [72] и целебного жирного масла (Масло расторопши) [83]. Изучение семян растения, произрастающего в окрестности села Ннги (НКР), показало (см. раздел 2.2) его принадлежность к силидианиновой хеморасе лиловоцветковой расторопши.

Представлялось интересным изучить возможность и целесообразность получения полноценного лекарственного сырья – семян расторопши, посредством гидропонической фитотехнологии. С этой целью, образец семян силидианиновой хеморасы лиловоцветковой расторопши высевали ранней

весной на глубину 2 – 3 см в наполнитель (красный вулканический шлак), находящийся в деланках на открытой гидропонике. Для роста и развития растений использовали питательный раствор Давтяна [84], подаваемый периодически, в соответствии с гидропонической фитотехнологией [85;86].

Первые всходы расторопши появились в конце апреля начале мая (Рис. 47,а), а зрелые плодоносящие корзинки в конце июля начале августа (Рис. 47,б). Визуальная оценка среднего количества корзинок, зрелых семян (Рис. 46) расторопши первого и второго года в течение вегетации свелась к следующему: у растений первого года количество плодоносящих корзинок составляет $(6 \div 8) \pm 2$, а у растений второго года – $(19 \div 23) \pm 2$; количество семян в корзинках и средняя масса семени у растений первого и второго годов одинаковы: по 60 ± 10 штук и 18 ± 2 мг.

Полученные семена, после подсушивания при комнатной температуре в тонком слое, подверглись измельчению и экстрагированию по описанному методу [70] гексаном, затем этанолом, с целью выделения, отдельно жирного масла и «силимарина».



Рис. 46. Семена расторопши



а



б

Рис. 47. Расторопша в гидропонике

В качестве контроля, для сравнения, такой же обработке подвергли образцы семян дикорастущей расторопши из трех районов Арцаха (Агдама,

Гюлиджана и Храморда) и образцов расторопши, выращенной в ИТОХ НТЦОФХ НАН РА.

Проведены и представлены сравнения количественного содержания масла и «силимарина» (табл.2), качественные характеристики спектров ^1H -ЯМР жирных масел (табл. 3) и сравнение методом тонкослойной хроматографии выделенных «силимаринов» (Рис. 48).

Из данных таблицы 2 следует, что наибольшее количество как масла, так и «силимарина» содержат семена растений двухлетнего гидропонического возделывания. Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что масло семян однолетней расторопши содержат меньше жирных кислот с двойными связями, удаленными друг от друга метиленовой группой, чем семена двухлетней расторопши. Наконец, хроматографическое сравнение «силимаринов» из шести изученных образцов семян показывает их качественное сходство и подтверждает принадлежность всех образцов к силидианиновой расе расторопши, поскольку на ТСХ всех образцов второе сверху пятно, принадлежащее следу силидианина, как это было показано [70], интенсивнее по окраске, чем самое верхнее, от силибина.

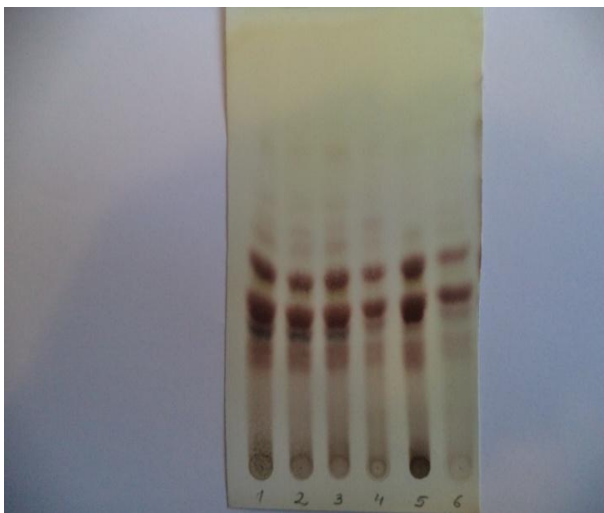


Рис. 48. ТСХ «силимаринов» из семян расторопши: 1-й образец – гидропонического происхождения 1-го года; 2-й – гидропонического происхождения 2-го года; 3-й - из Гюлиджана; 4-й – из Храморда; 5-й образец “силимарина” из ИТОХ НТЦОФХ; 6-й - из Агдама.

Таблица 2.

Сравнение количественного содержания жирного масла и «силимарина»

Образцы семян	Жирное масло	«Силимарин»
Гидропонического происхождения 2-го года	24,0%	4,9%
Гидропонического происхождения 1-го года	15,49%	3,99%
Агдама	22,0%	4,45%
Гюлиджана	20,4%	4,55%
ИТОХ	19,26%	3,25%
Храморда	20,56%	2,18%

Таблица 3.

Спектры ^1H -ЯМР жирных масел семян расторопши пятнистой

Области сигналов "Н" (в миллионных долях, м.д.), их характер и интенсивность									
№	Образцы семян	0,85-1,05	1,22-1,40	1,58-1,70	1,98-2,20	2,28-2,37	2,70-2,82	4,08-4,35	5,20-5,30
1	Агдама	9,21	57,1	7,1	9,8	6,1	2,8	4,0	8,3
2	Гидропонического происхождения 2-го года	9,21	57,1	7,1	9,8	6,1	2,8	4,0	8,3
3	Гидропонического происхождения 1-го года	9,21	58,0	7,1	9,8	6,1	2,5	4,0	8,3
4	Группы сигналов	-CH ₃	CH ₂ -	- CH ₂ - CH ₂ - COO		CH ₂ - COO		2CH ₂ глиц.	CH- глиц. и Н (=)

Резюмируя приведенные данные, следует заключить, что гидропонический метод возделывания расторопши пятнистой и производства семян расторопши имеют преимущество перед почвенным, благодаря как его управляемости (за счет применяемых схем водно-минерального питания, регулирования состава, концентрации и соотношения питательных элементов и pH питательного раствора), так и более высоким количественным и качественным показателям получаемых семян.

2.4. Осаин и помиферин - биологически активные вещества настойки плодов маклюры оранжевой [87]

Маклюра оранжевая – *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. – дерево семейства тутовых (Moraceae), родина которого – Северная Америка, откуда оно было распространено в другие континенты и страны. Плоды дерева – “Адамово яблоко” используются деятелями народной медицины в качестве сырья для приготовления настойки и мазей широкого лечебного действия, в том числе, судя по публикуемым в интернете рекламным материалам, и канцеролитического.

Описанный процесс приготовления настойки из свежих плодов предусматривает их продолжительное (до тринадцати месяцев) настаивание в этиловом спирте, лечение же настойкой предписывается проводить многомесячным приемом еженедельно увеличиваемых доз (до максимальной в 30 капель) с последующим постепенным снижением дозы до нуля. Исследовательской группой химической лаборатории Университета Огайо (США) в 1937-1946 годы были выделены из плодов Маклюры оранжевой и структурно изучены ее главные активные соединения – два ранее неизвестных пренилизофлавона, названных осаином и помиферином (Рис. 49) [88]. При исследовании осаина и помиферина в опытах *in vivo* и *in vitro* были выявлены антимикробное [89], антиоксидантное [90], кардиопротекторное [91],

противоопухолевое [92] свойства этих изофлавонов, более выраженные у помиферина [93.].

Приведенный краткий перечень биологической активности является, по нашему мнению, веским основанием для осуществления данной работы. Целью ее было - определить наличие осаина и помиферина в настойке, рекомендуемой рецептом народной медицины, а также изыскать метод более быстрого приготовления спиртового раствора смеси этих флавоноидов для предложения его к последующему предклиническому изучению в качестве потенциального официального средства.

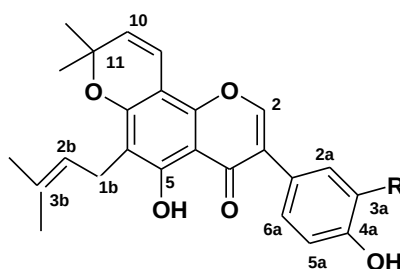


Рис. 49. Структурные формулы осаина ($R=H$) и помиферина ($R=OH$)

Использованные в качестве сырья желтовато-зеленые, бугристые, шарообразные плоды (массой 250 – 400 г) собраны нами в сентябре 2013 года с деревьев *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid., интродуцированных в садах г. Еревана еще в середине прошлого столетия, в частности, с деревьев Института тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна (ИТОХ) Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии и института ботаники НАН РА (Рис. 50).

Часть плодов, после измельчения их в свежем состоянии на куски в 2 -3 см, использовали для приготовления настойки по рецепту народной медицины (в котором не нормировано количество сырья и спирта): в двухлитровые стеклянные банки с плотно уложенными в них кусочками плодов налили доверху 96% этанол, банки герметично укупорили и хранили в затемненном месте при комнатной температуре ($18^{\circ} - 25^{\circ}\text{C}$) в течении года. Большая же

часть собранных плодов (15 кг) в разрезанном на 1-2 сантиметровые куски подверглась подсушиванию в тонком слое при 25 - 30 °С в затемненном,



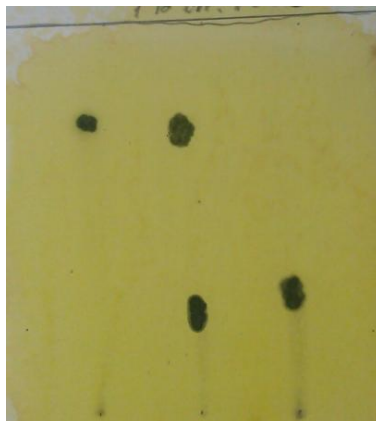
Рис. 50. Плоды маклюры с дерева на территории ИТОХ.

проветриваемом помещении до постоянной остаточной массы в $20 \pm 0,5\%$ от исходной, на что потребовалось не менее 13 суток.

Для получения хроматографически чистых осаина, помиферина и их смесей мы использовали в качестве исходного сырья высушенные приведенным выше способом плоды, которые измельчили до частиц размером в 2-3 мм и подвергли экстрагированию. Из более чем десяти различных вариантов использованных нами растворителей и схем, мы выбрали для указанной цели следующий, по нашему мнению, наиболее оптимальный метод: сырье экстрагируют хлороформом в аппарате Сокслета 18-20 часов (до обесцвечивания раствора в патроне с сырьем).

Полученный хлороформный экстракт упаривают до сухого остатка, который растворяют при нагревании в пятикратном количестве (мл/г исходного сырья) 50%-ной водно-этанольной смеси. Водно-этанольный раствор охлаждают до комнатной температуры, отфильтровывают, промывают в делительной воронке трижды гексаном (порциями по $\frac{1}{4}$ от водноэтанольного раствора). Промытый водно-этанольный раствор упаривают при пониженном давлении до сухого остатка, который выдерживают не менее часа при 60°C и 3 мм ртутного столбца остаточного давления. С выходом $4,0 \pm 0,3\%$ получается

желтовато-серый пушистый порошок – смесь осаина и помиферина, обнаруживающую на ТСХ только два пятна с R_f 0,73 и 0,23 (Рис. 51).



1 2 3

Рис. 51 .ТСХ: осаина(1), эстракта (2) и помиферина (3)

Для достоверной идентификации компонентов смеси было осуществлено ее разделение методом препаративной хроматографии. Структурная идентичность выделенных компонентов с осаином и помиферином была подтверждена адекватным совпадением их спектров ЯМР (

Рис. 52 и Рис. 53) с описанными в литературе [92]. Изучение спиртовой настойки, полученной по методу народной медицины, показало, что она содержит около 0,1% смеси осаина с помиферином (что в пересчете на максимальную единовременную дозу соответствует около 1 мг) и незначительные количества липофильных и полярных примесей.

Результаты изучения нами плодов маклюры следующие: 1). Показано, что в настойке плодов маклюры оранжевой, приготавливаемой по рецепту народной медицины, содержание смеси главных активных компонентов – пренилизофлавонов (осаина и помиферина) составляет около 0,1%; 2). Предложен и апробирован рациональный метод выделения из высушенных плодов маклюры оранжевой очищенной смеси осаина и помиферина, пригодной для приготовления ее спиртового раствора любой концентрации.

2.5. Сравнительный анализ антирадикальной активности флавоноидных соединений соцветий бессмертника красноватого, плодов расторопши пятнистой и маклюры оранжевой [94]

Известно, что флавоноидные соединения, благодаря содержанию в своей структуре фенольных гидроксильных групп, обладают антиоксидантной, антирадикальной активностью, обуславливающей широкий спектр их лечебных свойств. Представлялось интересным и целесообразным провести сравнение антирадикальной активности выделенных нами ранее фламина, силимарина и смеси осаин-помиферин.

Рассмотрение результатов сравнительного изучения антирадикальной активности с помощью методов спектроскопии [95] (таблицы 8,9,10 в разделе 3.6) однозначно выявляет тот факт, что фламин превосходит по своей активности как индивидуальный силимарин, так и смесь силимарина с фламином. Показано, что из испытанных флавоноидных соединений наиболее эффективным антирадикальным свойством обладает помиферин, действие которого проявляется быстро и потенцируется примесью осаина, хотя сам осаин не выявил антирадикальную активность .

Наиболее наглядно вышесказанное отражается на графике фиксации антирадикальной активности (Рис. 54). График четко показывает достижение «плато» сразу, в течении минуты, в случае смеси помиферина с осаином (по 3 мг, активность 94,8 %), и на пятой минуте, в случае помиферина (3 мг, активность 75,9 %), а также 1 мг помиферина (активность 69,4%), смеси осаина и помиферина (по 1 мг, активность 69,8 %). Остальные образцы достигают «плато» к 20 минуте, причем смесь силимарина с фламином (по 1 мг, активность 39,1 %) и 3 мг силимарина(активность 31,9 %) проявляют значительно низкую активность.

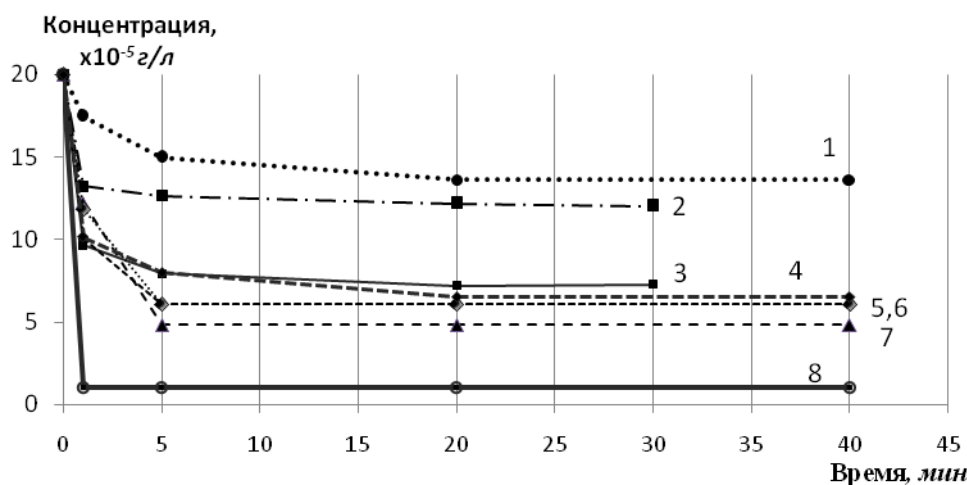


Рис. 54. График фиксации антирадикальной активности: 1- Силимарина (3 мг); 2- смеси Силимарина с Фламином (1 мг); 3- смеси Силимарина с Фламином (3 мг); 4 -Фламина (3 мг); 5- Помиферина (1 мг); 6 – смеси Осаина с Помиферином (1 мг); 7- Помиферина (3 мг); 8- смеси Осаина с Помиферином (3 мг).

На основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Из изученных в данной работе флавоноидных соединений только осаин лишен антирадикальной активности, в то время, как другой пренилированный изофлавоон маклюры (помиферин) является наиболее активным и быстродействующим антирадикальным соединением.
2. Показано, что фламин уступает по активности помиферину и его максимальная активность наступает на 20-ой минуте. Показано также, что фламин проявляет большую активность, чем силимарин и смеси силимарина с фламином.
3. Предполагается, что примесь осаина к помиферину потенцирует антирадикальную активность помиферина.

2.6. Точность определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот в жирных маслах методом

¹H-ЯМР – спектроскопии [96]

Известно, что для нормального функционирования человеческого организма крайне важное значение имеет сбалансированный прием ненасыщенных и насыщенных жиров. Особо это касается содержания в жирах оптимального соотношения омега-3 и омега-6 жирных кислот [97]. Омега-3 кислоты необходимы для роста и развития организма, для предотвращения и лечения ишемической болезни сердца, гипертонии, диабета и ряда других заболеваний[98,99]. Эти данные обосновывают востребованность и актуальность поиска и изучения новых потенциальных сырьевых источников омега-3 кислот, в качестве возможных заменителей таких общеизвестных пищевых и лекарственных жиров, как рыбий жир, льняное, конопляное масла. С этой целью в лаборатории химии лекарственных растений Института тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна было предпринято изучение жирных масел семян (плодов) ряда доступных во флоре Армении растений. Исследованию были подвергнуты семена растений, из которых методом экстракции (гексаном) были выделены жирные масла, изученные затем методом ¹H-ЯМР –спектроскопии (на приборе “Varian Mercury-300VX” в растворе диметилсульфоксид с CCl₄ в соотношении 1:3).

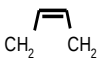
Известно, что ¹H-ЯМР- спектры жиров (жирных масел) однотипны и состоят из восьми групп сигналов, соответствующих определенным структурным фрагментам жирных масел [58 - 61]. Расположение сигналов структурных фрагментов масел в ¹H-ЯМР- спектрах можно представить в виде таблицы 4 [100].

Приведенное в таблице расположение сигналов водородных атомов свойственно только жирам и характеризует общность их химической (триацилглицероловой) структуры. Различие составов разных жиров отражается различием интегральных интенсивностей сигналов всех групп, за

исключением группы 7. В качестве аргумента правомочности такого утверждения может служить таблица 5.

Таблица 4.

Расположение сигналов структурных фрагментов жирных масел в ^1H -ЯМР- спектрах

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6	Группа 7	Группа 8
$-\text{CH}_3$	$-(\text{CH}_2)-$	Бета $-\text{CH}_2-$ к $\text{C}=\text{O}$		альфа- $\text{CH}_2 - \text{к}$ $\text{C}=\text{O}$		2CH_2- глицерина	$(=)$ и $\text{CH}-$ глицерина
0.85-1.05 м.д.	1.22- 1.40 м.д.	1.58-1.70 м.д.	1.98-2.20 м.д.	2.28-2.37 м.д.	2.70- 2.82 м.д.	4.08-4.35 м.д.	5.20- 5.40 м.д.

Одним из самых неизменных и постоянных сигналов в ^1H -ЯМР спектрах жиров является сигналы группы 7 от двух метиленовых групп глицериновой части жиров, проявляющиеся в виде двух симметричных мультиплетов в области 4.10 – 4.20 м.д. (2H) и 4.24 – 4.34 м.д. (2H). Эти сигналы, по нашему мнению, могут быть весьма полезными при изучении и структурном анализе жирных масел методом ^1H -ЯМР спектроскопии. В первую очередь, эти сигналы могут быть использованы для определения содержания в масле омега -3 кислот сравнением интегральной интенсивности сигналов группы 7 с интенсивностью сигнала метильной группы омега-3 кислот, обнаруживаемого (при их наличии) в виде четкого триплета (при 0,95 -1,02 м.д.) отдельно от группы сигналов в области 0,85-0,95 м.д. (Рис. 55). В спектрах масел, очищенных от липофильных примесей (от стероидов и свободных жирных кислот), соотношение интегральных интенсивностей глицериновых 2CH_2 -групп и суммы метильных групп приближается к соотношению 4:9.

Таблица 5

Спектры ^1H -ЯМР жирных масел некоторых растений Армении

Положение сигналов ^1H (м.д.) и их интегральная интенсивность									
№	Растение	0,85-1,05 м.д.	1,22 - 1,4 м.д.	1,58 - 1,7 м.д.	1,98- 2,2 м.д.	2,28- 2,37 м.д.	2,70-2,82 м.д.	4,08-4,35 м.д.	5,20-5,30 м.д.
1	Арбуз, <i>Citrulus lanatus</i>	9,12	54,15	10,26	10,4	6,66	2,66	4,0	9,5
2	Амарант, <i>Amaranthus</i>	10,7	61,27	12,87	12,0	6,7	2,7	4,0	8,8
3	Каштан конский, <i>Aescul. Hipp.</i>	8,57	52,85	6,17	10,2	5,99	1,99	4,0	7,14
4	Подсолнух, <i>Helianthus annuus</i>	9,2	51,4	6,4	10,8	6,2	4,0	4,0	10,2
5	Дыня, <i>Cucumis melo</i>	9,0	50,6	7,8	9,4	6,2	4,0	4,0	9,6
6	Шиповник собач., <i>Rosa canina</i> , плод	10,71	56,4	8,57	8,82	8,32	2,74	4,0	8,6
7	Абрикос, <i>Armeniaca</i>	9,0	56,3	13,92	11,3	6,15	1,83	4,0	8,13
8	Тыква, <i>Cucurbita pepo</i>	9,2	54,2	7,0	10,6	6,4	4,0	4,0	9,6
9	Кориандр, <i>Coriandr.sativ.</i>	9,99	64,3	7,99	12,6	36,6	6,6	4,0	7,99
10	Перец красн., <i>Capsicum annuum</i>	9,4	52,4	8,6	10,8	6,4	4,4	4,0	10
11	Кедр. <i>Pinus</i>	9,2	45,5	6,78	13,8	6,16	4,0	4,0	12,33
12	Гибискус, <i>Hibiscus esculentus</i>	8,57	54,28	6,85	6,57	5,71	2,28	4,0	6,0
13	Бешеный огурец, <i>Ecbalium elaterum</i>	9,23	47,06	7,08	7,5	6,77	2,77	4,0	8,61
14	Айва, <i>Cidonia oblonga</i> Mill.	8,8	53,8	7,0	10,8	6,4	2,4	4,0	8,4
15	Боярышник, <i>Crataegus caucasica</i> C.Koch.	9,4	52,6	7,4	10,2	6,0	2,6	4,0	8,0
16	Петрушка, <i>Pet-selium</i>	10	63,3	7,23	12,0	6,33	1,0	4,0	7,2

В этом случае, по интегральным интенсивностям 2 CH_2 -группы (J_7) и триплета омега-3 кислот ($J_{\text{тр}}$) можно вычислять содержание этих кислот в масле в пределах ошибки, зависящей от расхождения интегральной интенсивности суммы метильных групп (J_1) от интенсивности, соответствующей 9H. В представленном на рис.1 спектре интегральная интенсивность омега-3 триплета $J_{\text{тр}}$ равна 0,9, соотношение $J_7 : J_1$ составляет 2:4,7 (т.е 4:9,4) и, таким образом, содержание омега-3 кислот вычисляется равным $0,9 \times 2 \times 100 / 9,4 = 19,1\%$.

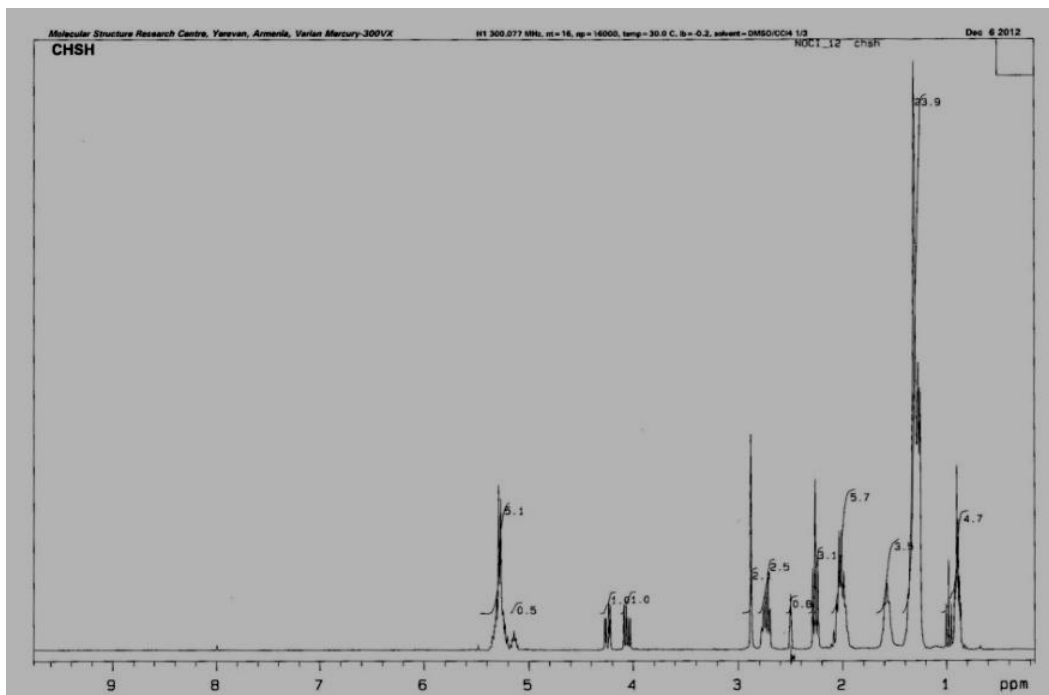


Рис. 55. ^1H -ЯМР- спектр жирного масла семян шиповника (*Rosa canina* L.)

Вместе с этим, учитывая возможность завышенности интегральной интенсивности суммы метильных групп балластными веществами, теоретически возможным содержанием может быть $0,9 \times 2 \times 100 / 9 = 20\%$ и, следовательно, более реальным представляется усредненная величина вычисленных двух значений содержания, а именно: $19,5 \pm 0,5\%$.

Подобным же образом мы определили содержание омега-3 кислот в семенах облепихи (*Hipporhae rhamnoides* L.), равное $27,4 \pm 0,8\%$, в семенах конопли (*Cannabis sativa* L.; $22,4 \pm 0,2\%$), в семенах мелиссы (*Melissa officinalis* L.; $57,4 \pm 0,6\%$).

^1H -ЯМР- спектральные характеристики жирных масел очень хорошо отражают степень чистоты масел. В ряде случаев, как например в случае жирных масел, выделенных нами из семян ряда бобовых (Табл.6) [101], когда наблюдается существенная их загрязненность нежирномаслячными веществами, для вычисления содержания омега-3 ненасыщенных кислот считаем целесообразным принимать триплет, принадлежащим лишь кислотам, связанным с глицерином.

Такой подход даст возможность с приблизительной (1-2%-ной) точностью определять содержание в масле этих кислот.

Приведенные выше результаты подчеркивают целесообразность использования метода ^1H -ЯМР-спектроскопии для относительно оперативного, быстрого обнаружения и количественной оценки содержания в растительном сырье омега-3 ненасыщенных кислот.

Таблица 6.

Спектры ^1H -ЯМР жирных масел плодов некоторых бобовых растений Армении

Положение сигналов ^1H (м.д.), их интенсивность, характер										
№	Растения	0,85- 1,05 М.д	1,22- 1,40 М.д	1,58- 1,70 М.д	1,98- 2,20 М.д	2,28- 2,37 М.д	2,70- 2,82 М.д	4,08- 4,35 М.д	5,20- 5,30 М.д	Выход масла, %. Содержание омега-3- кислот, %
1	Арахис, Arachis hypogaea	9,2	80,59	6,46	9,8	6,46	2,15	4,0	7,68	Масла 29%, омега- 3 нет
2	Фасоль обыкновен. Черная, Phaseolus.	10,4	39,1	1,55	11,0	6,44	6,2	4,0	11,1	Масла 1,5%., Омега-3 около 45%

3	Фасоль обыкновен. белая.	6,4	43,1	7,7	11,7	5,8	7,3	4,0	13	Масла 1,1% Омега-3 – около 43%.
4	Фасоль полосато- коричневая,	7,4	40,8	7,44	11,0	5,9	7,4	4,0	13,6	Масла 6%. Омега-3- около 50%.
5	Нут бараний, <i>Cicer anetium</i>	8,86	50,6	8,3	10,3	5,7	2,6	4,0	8,3	Масла 4,4%. Омега-3- около 1%.
6	Чечевица восточная, (удлиненная), <i>Lens orientalis</i>	9,7	38,2	8,0	8,58	5,72	3,4	4,0	6,86	Масла 1,2% Омега-3- около 10%.
7	Горох посевной,, <i>Pisum sativum</i>	10,6	43,8	7,0	9,2	6,2	3,4	4,0	8,0	Масла 1,4%. Омега-3- около 13 %.
8	Боб обыкновен. серый, <i>Phaseolus</i>	12,0	51,4	6,8	10,4	5,8	3,4	4,0	8,8	Масла 15%. Омега-3- около 9%.
9	Пажитник (шамбала), <i>Trigonella foenum- graecum</i>	11,2	48,4	7,4	10,6	6,2	6,0	4,0	11,4	Масла 5,3% Омега-3 около 27%.
10	Чечевица круглая, мелкая, <i>Lens culinaris</i>	17,2	58,0	8,8	11,0	6,2	4,4	4,0	9,8	Масла 0,75% Омега-3- около 24%.

2.7. Обсуждение результатов изучения гепатопротекторной активности выделенного из соцветий бессмертника красноватого фламина и смеси Фламина с Силимарином

В Приложении 1 представлены акты исследований, проведенных в лаборатории фармакологии и патогистологии Института тонкой органической химии им А.Л. Мнджояна Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии НАН РА под руководством заведующего лабораторией, к.б.н. Г.В. Гаспаряна:

1. “Морфофункциональное состояние печеночной ткани при наличии экспериментального цирроза и на фоне лечения препаратом растительного происхождения – Фламином”
2. “Изучение гепатопротекторных свойств смеси Силимарин-Фламин в условиях токсичного цирроза”

В результате исследований Фламина, выделенного из бессмертника красноватого, показано что под действием растительного препарата Фламин происходит сравнительная нормализация гистоструктуры гепатоцитов ткани печени, что позволяет судить о гепатопротекторной активности исследованного вещества.

Исследования смеси выделенных нами фламина с силимарином показали, ее ярко выраженную гепатопротекторную и антиоксидантную активность в условиях токсического цирроза.

Восстанавливая, в основном, гистоструктуру печени смесь силимарина с фламином активирует пролиферационные процессы стволовых клеток, что в итоге относительно нормализует степень метилирования ДНК крыс в условиях опытного цирроза.

Последующее исследование смеси может сделать возможным внедрение ее в медицинскую практику, в качестве нового препарата для лечения цирроза.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы и методы

Растительное сырье.

Использованный в исследованиях растительный материал подвергался ботаническому определению при участии и консультативной помощи сотрудников Института ботаники НАН РА (г. Ереван) и Ботанического сада г. Севана.

Образцы бессмертника красноватого (*Helichrysum rubicindum*) для изучения любезно предоставил директор Севанского ботанического сада С.М.Мнацаканян. Образцы семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) из Арцаха были получены от местных жителей, а также доставлены при деятельном посредничестве научного советника премьер министра НКР, заведующего отделом гидропоники Института проблем гидропоники НАН РА, профессора М.А.Бабахяна. Кроме того, для сравнительного испытания (анализа) на специально отведенном участке при Институте тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна Научно-технологическо центра органической и фармацевтической химии НАН РА (ИТОХ НТЦОФХ) были выращены (из семян Арцаха) плодоносящие образцы расторопши (23 растения), от которых получили 214 г здоровых семян.

Плоды маклюры оранжевой (*Maclura pomifera*) были собраны с деревьев, посаженных неизвестно когда и кем на северной границе ИТОХ, в качестве колючей и, очевидно, труднопроходимой ограды. Такие же деревья были выращены в ботаническом саду института Ботаники, и в парке Победы г. Еревана. По строению этих деревьев и их плодов авторитетные коллеги-ботаники определили их как несвойственное для Флоры Армении дерево – маклюру оранжевую.

Для выделения и изучения жирных масел анализу подвергали плоды и семена, доступные в розничной продаже или собранные с растений, как дикорастущих, так и культивируемых в Армении.

Растворители и реактивы.

Для экстрагирования растений, очистки экстрактов, перекристаллизации веществ использовали этиловый спирт 96%-ный, «медицинский», метанол, хлороформ, диэтиловый эфир, гексан и другие растворители, приобретенные в магазинах химических реактивов и у специализированных оптовых поставщиков. Перед использованием растворителей, проверялось их соответствие требуемой чистоте и, при необходимости, производилась их очистка и перегонка. В качестве воды была использована водопроводная вода, а в некоторых случаях – дистиллированная и «бидистиллят».

Для тонкослойной и «колоночной» хроматографий использовались системы (смеси), составленные из растворителей марки «хч». Составы элюирующих систем, а также «проявителей» (обнаружителей) приводятся в разделах описания экспериментов.

Для определения антирадикальной активности в качестве свободного радикала использован стабилизированный (кристаллический) радикал – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH, Sigma-Aldrich GmbH).

Приборы и аппараты

Для экстракции растительного сырья кипящим растворителем использовали аппараты «Сокслета» разных объемов, а для экстракции при комнатной температуре (настаиванием) – колбы Эрленмейера. Для упаривания растворов использовали вакуум роторный испаритель ИР-1м.



Аппарат Сокслета



Испаритель ИР-1м



Прибор Voetius PHMK



Поляриметр Polamat

Для определения температур плавления выделенных веществ использовали микронагревательный столик - прибор Voetius PHMK (Dresden). Оптическую активность измеряли поляриметром Polamat (ZEIS JENA).

Спектры ядерного магнитного резонанса регистрировались на приборе Varian Mercury 300 VX в лаборатории ЯМР НТЦОФХ НАН РА (зав. лаб., к.х.н. Паносян Г.А.). Определение оптической плотности проводилось УФ-спектрометром Helios λ (Termo Electron corp.)



Спектрометр ЯМР Varian Mercury 300 VX



УФ спектрометр Helios λ

Взвешивание веществ и растительного сырья производили на электровесах: ВЛП-200 и ВЛ-200. Для расчетов и построения графиков использовался Microsoft excell



Весы ВЛП-200



Весы ВЛ-600

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли в стеклянных закрытых камерах на пластмассовых пластинках с силикагелевым слоем марки Silufol UV254 и на стеклянных пластинках с силикагелевым (КСК) покрытием (“Ляэне Калур”, Эстония). Пластинки предварительно разрезались на части, требуемой величины.



Хроматографические пластинки и ТСХ камера.

Методы использованные для выделения смеси флавоноидных соединений из цветков бессмертника красноватого[65] и для смеси флаволигнанов и жирного масла из семян расторопши пятнистой[81] представлены на схемах 2 и 3, а методы опробированные для выделения смеси пренилированных изофлавонов(осаина и помиферина) из сухих плодов и настойки маклюры оранжевой представлены на схемах 4 и 5.



Схема.2. Метод выделения смеси флавоноидов из цветков бессмертника красноватого.

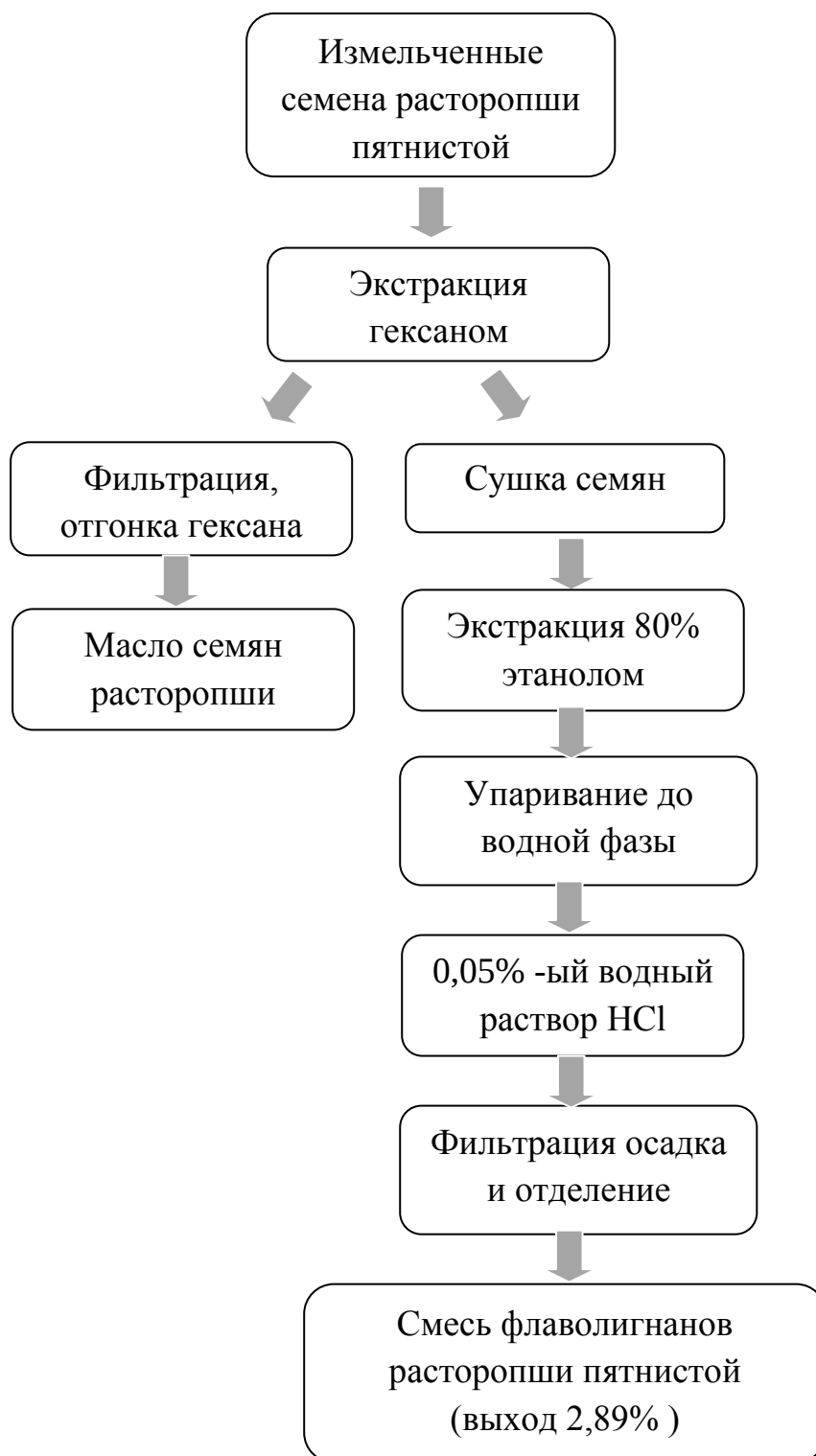


Схема.3.Метод выделения масла и смеси флаволигнанов из семян расторопши пятнистой.



*Схема.4. Метод выделения смеси пренилированных изофлавонов из сухих плодов маклюры
оранжевой.*

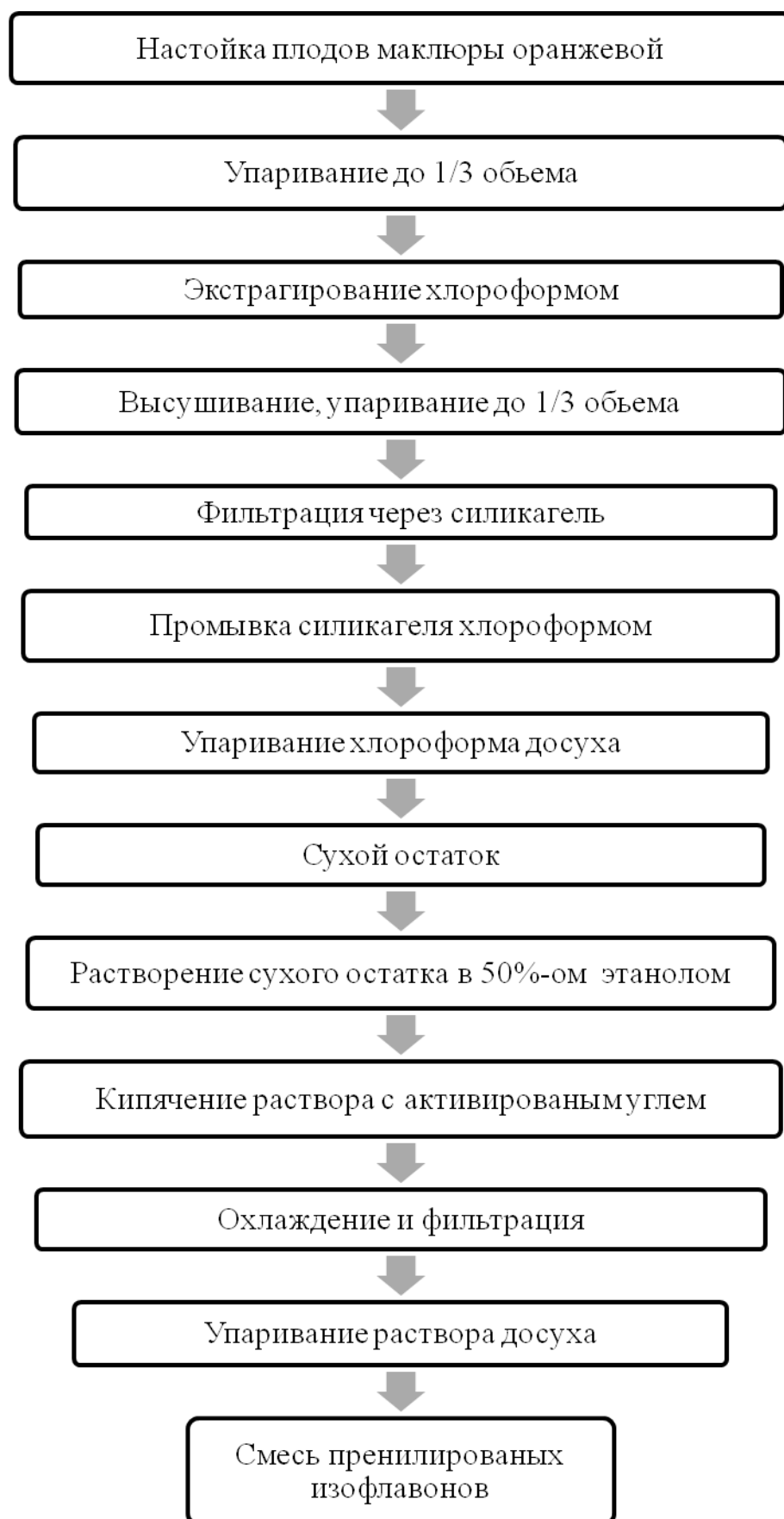


Схема.5. Метод выделения смеси пренилированных изофлавонов из настойки маклюры оранжевой

3.2. Выделение суммы флавоноидов из соцветий бессмертника красноватого (*Helichrysum Rubicundum* L.).

80 г измельченных сухих соцветий бессмертника красноватого экстрагировали в 1 л круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, 4 раза (при нагревании по 3-4 часа при 60 - 70°C, поочередно с 0,5 л, 0,4 л, 0,35 л, 0,35л) 50%-ными водно - этанольными растворами. После каждой порции экстракты сливались декантированием, а после последней порции соцветия отжимались на воронке «Бюхнера» вакуум насосом. Объединенный экстракт отфильтровывали, упаривали вакуум-ротаторным испарителем до остаточного (водного) объема (350-400 мл), отфильтровывали и подвергали экстракции смесью этилацетат-спирт (9:1), исчерпываяюще (до отрицательной качественной реакции на флавоноиды – до отсутствия окрашивания раствором хлорного железа фильтровальной бумаги, смоченной каплей этилацетатноспиртового извлечения). Объединенный этилацетат-спиртовый экстракт обезвоживался добавлением к нему 50-60 г безводного сульфата натрия. После перемешивания экстракта и выдерживания в покое 5-8 часов, фильтрования и упаривания при пониженном давлении досуха, получалось около 5,0г (с выходом около 6,15%) светлокорицевого аморфного порошка – суммы флавоноидов (Ф1).

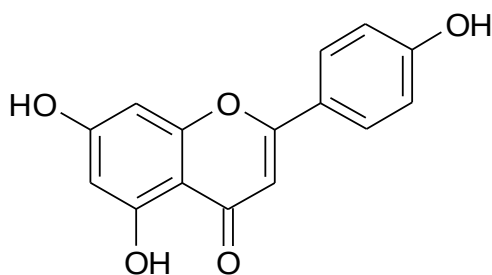
3.2.1. Сравнение суммы флавоноидов соцветий бессмертника красноватого (Ф1) с Фламинем методом тонкослойной хроматографии (ТСХ)

Порошок из двух таблеток препарата Фламин, приобретенного в аптечной сети, экстрагировали при нагревании до кипения в течение получаса 50 мл 50%-ного этанола, смесь охладил, отфильтровывали, упарили до объема 20 мл. Остаток отфильтровывали, экстрагировали 50 мл смеси этилацетат-этанол (9:1). Экстракт отделили, высушили безводным сульфатом натрия, отфильтровывали, сгустили до 5 мл. Сравнение Ф1 с экстрактом, полученным из препарата

Фламин, использованием ТСХ на пластинке Silufol UV254 в системе – этилацетат : этанол : хлороформ : вода (7:2:1:1), проявитель спиртовой раствор хлорного железа, показало (Рис. 36 в разделе 2.1) полное сходство анализируемых образцов.

3.2.2. Разделение суммы флавоноидов Ф1 на колонке с силикагелем.

На колонку (диаметром 2,5 см, высотой 35 см), содержащую 60 г силикагеля Serva (Si60 0,05 – 0,1 мм) в этилацетате, нанесли раствор 2,2 г Ф1 в 5 мл этилацетата и колонку промывали этилацетатом, собирая фракции (по 40 – 50 мл), вытекающие из колонки. Фракции 1-42 элюировались этилацетатом, фракции 43-45 – смесью этилацетат : метанол (20 : 1), фракции 46 – 53 – смесью этилацетат : спирт (10 : 1), фракции 54 - 61 – смесью (1:1), а 62- я фракция была элюирована метанолом. Все фракции подвергались синхронно ТСХ анализу. Фракции со сходной ТСХ объединялись. Фракции 2 – 5 содержали апигенин, в качестве главного компонента, фракции 15-18, в качестве главного – изосалипурпозид (Рис. 37 в главе 2.1). Из объединенной фракции 2 – 5, обработкой диэтиловым эфиром, метанолом, затем ацетоном выделили 100 мг апигенина (1).



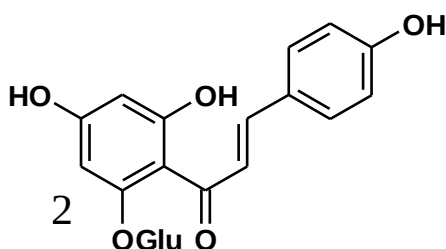
1

¹H-ЯМР-спектр (в DMSO-d₆-CCl₄- 1:3), м.д. 12.8(1H, с. 5-OH), 9.8 -10.4(2H, 2 уш.с., 7-OH, 4-OH), 7.75(2H, д-9Гц, 2¹—H, 6¹-H), 6.87(2H, 9Гц, 3¹-H, 5¹-H), 6.5(1H, с., 3-H), 6.35(1H, у.с., 8-H), 6.12(1H, уш.с., 6-H) – апигенин.

Фракция 15-18 содержала 350 мг флавоноида, проявляющегося в виде одиночного пятна. Часть этой фракции перекристаллизовали из ацетона. Получили кристаллический порошок с т.пл. 168 – 170⁰С.

¹H-ЯМР-спектр (в DMSO-d₆-CCl₄- 1:3): 13.94(1H, с.. 2¹-ОН), 9.67 и 10.15(2 неразрешенных горба от 4- и 4¹-ОН), 8.03(1H, д. 5,5 Гц, Н_β), 7.59 (1H, д. 5.5 Гц, Н_α), 7.58(2H, м., Н-2, Н-6), 6.80(2H, м, Н-3, Н-5), 6.14(1H, д. 2.1 Гц, Н-5¹), 5.91(1H, д. 2,1 Гц, Н-3¹), 5.04(1H, д. 7,5 Гц, Н-1¹¹), 4.97(1H, уш. м., ОН), 4.87(1H, уш. м., ОН), 4.31(1H, уш. м., ОН), 3.76(1H, уш. д. 11,8 Гц., Н-6¹¹), 3.59(1H, кв. д. 11,8; 11,8; 4,1) – изосалипурпозид(2).

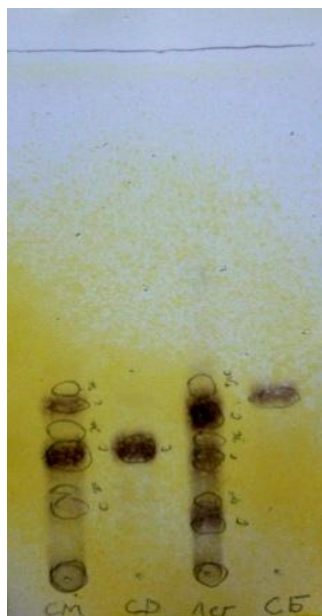
¹³C-ЯМР-спектр изосалипурпозида (75,5 МГц. в DMSO-d₆-CCl₄- 1:3): 60.6(CH₂), 69,3; 73.3; 76.677; 77.0(C-2¹¹, C-3¹¹, C-4¹¹, C-5¹¹), 94.1(C-5¹, 96.8(C-3¹). 100.3(C-1¹¹), 105.3(C-1¹), 115.6(C-3, C-5), 124.2(C_β), 126.2(C-1), 130.2(C-2, C-6), 142.2(C_α), 159.5, 160.0, 164.2, 166.5(C-2¹, C-4¹, C-6¹, C-4), 191.8(C=O).



3.3. Выделение силимарина.

Измельченные семена цветочных корзинок лиловоцветковой расторопши, собранных в сентябре 2013 г в окрестностях села Ннги Арцах (480 г) обезжирили экстракцией гексаном (три раза по 0,7 л) и после отделения экстракта выдержали 0.3-0.5 см слоем в вытяжном шкафу 20 ч, затем 5-кратно экстрагировали 80% этанолом (по 2 ч по 0,5 л) при перемешивании и нагревании с обратным холодильником (до 50 - 60 °С). Соединенные этанольные вытяжки фильтровали, сгустили вакуум – роторным испарителем до 0,5 л и при перемешивании разбавили 2 л 0,05% раствора HCl. Выпавший хлопьевидный осадок отфильтровали, промыли на фильтре водой (до нейтральной реакции фильтрата) и высушили вакуум – сушкой при 50-60 °С. Получили 13.87г (289%) желтовато-белого порошка силимарина.

Сравнительная ТСХ выделенного силимарина и экстракта, полученного из капсул препарата «Легалон» (на пластинках “Silufol UV254” в системе: хлороформ – ацетон – муравьиная кислота - 9:2:1: пятна веществ выявляли УФ облучением и опрыскиванием 1%-ным спиртовым раствором FeCl_3), приведена на Рис. 56 .



1 2 3 4

Рис. 56. Сравнительный ТСХ анализ (1-силимарин, 2-силидианин, 3-легалон, 4-силибин)

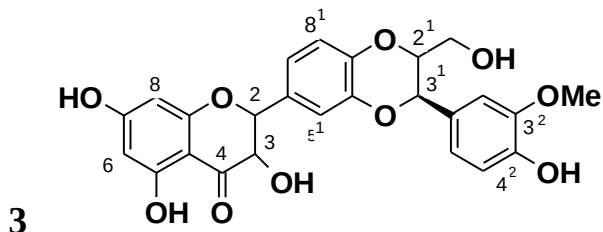
Фракционирование силимарина. 13,85 г выделенного силимарина растворили при нагревании в 100 мл 96% этанола, смешали с 30 г силикагеля, смесь упарили роторным испарителем до однородной сыпучей массы и поместили в верхнюю часть хроматографической стеклянной колонки (33 x 3,3 см), заполненной 111 г силикагеля КСК (0,05-0,1 мм) в хлороформе. Колонку промывали хлороформом (фракции 1 – 7), затем смесью хлороформ – этанол (98:2, фракции 8 – 49), (9:1, до фракции 67). Объемы фракций (100 – 250 мл) определяли по интенсивности окраски растворов и проведением синхронной ТСХ. Фракции с идентичной картиной ТСХ соединяли, упаривали досуха, взвешивали. Таким образом были отделены две фракции: с преимущественным содержанием силибина (3) (фр.16-19 с массой 2,9 г) и силидианина (4) (фр.20-22 с массой 3,3 г). Соотношение силибиновой и силидианиновой фракций составило 0,88:1,0.

Выделение силибина (3). 2,9 г фракции **16-19** обработали растиранием с последующим фильтрованием поочередно 20 мл хлороформа, 10 мл метанола, 10 мл ацетона и оставшийся на фильтре белый порошок растворили при нагревании в 50 мл этанола. Раствор охладили, прибавили к нему 33 мл воды и после 3-дневного стояния при комнатной температуре отфильтровали выпавший белый осадок (0,431 г после сушки в вакуум – эксикаторе) – очищенный силибин (**3**).

Силибин:

3,5,7-тригидрокси-2-[2¹-гидроксиметил-3¹-(4²-гидрокси-3²-этоксифенил)-2¹,3¹-дигидробензо-[1¹,4¹]-диоксин-6¹]-хроман-4-он. $[\alpha]_D^{28} = +25^0$ (ацетон), т.пл. 224-227 °C; R_f 0.33. **Спектр ЯМР ¹H**, δ , м.д, Гц: 11.75 (1H, уш.с, C-5-OH); 10.4 (1H, уш.с, C-7-OH); 8.6 (1H, уш.с, C-4²-OH); 7.07- 7.04 (1H, м, C-2² -H); 6.97-6.82 (4H, м, арил.); 6.78 (1H, д, J=8, арил.); 5.87-5.84 (2H, м, арил.); 4.98(1H, д, J=11.2 C-2-H); 4.93 (1H, д, J=8.1, C-3¹ -H); 4.66 (1H, уш.т, J₁ =5.7, C—3H изомера); 4.37 (1H, д.т, J₁ =11.2, J₂ =5.7, C-3-H); 4.05 – 3.98 (1H, м, C-2¹ -H); 3.85 (3H, с, OCH₃); 3.67 – 3.58 и 3.42 – 3.33 (по 1H, м, C-2¹ – CH₂ OH).

Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 196.751 (C-4); 166.797 (C-7); 163.416 (C-5); 162.146 (C-9); 147.270 (C-3²); 147.238 (C-4²); 146.890 (C-4² изомера); 143.736 (C-10¹); 143.695 (C-9¹); 142.773 (C-9¹ изомера); 129.952 (C-6¹); 129.911 (C-6¹ изомера); 127.153 (C-1²); 120.237 (C-6²); 120.067 (C-6¹); 119.994 (C-6¹ изомера); 116.055 (C-5¹); 116.022 (C-2¹); 115.942 (C-2¹ изомера); 115.019 (C-5²); 111.242 (C-2²); 100.144 (C-10); 96.051 (C-8); 95.541 (C-6); 82.469 (C-2); 82.404 (C-2 изомера); 78.109 (C-8¹); 75.537 (C-7¹); 71.775 (C-3); 71.703 (C-3 изомера); 60.038 (C-2¹а); 55.419 (OCH₃).



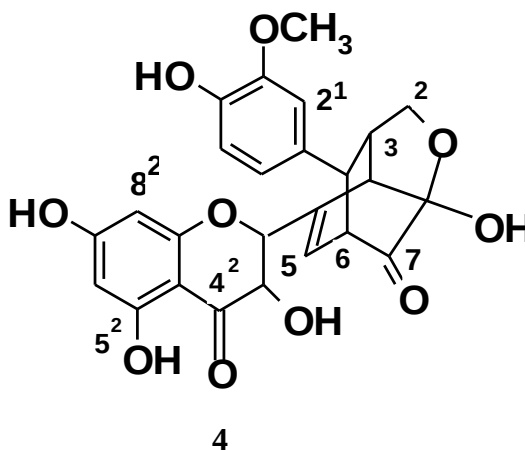
Выделение силидианина (4). 3,3 г фракции **20-22** промыли последовательно 25 мл хлороформа, 10 мл метанола, 3 мл ацетона, отфильтровали, высушили. Получили 0,98 г очищенного силидианина (**4**).

Силидианин (4):

: **2,3,3а,6,7,7а-гексагидро-7а-гидрокси-6а-(4¹-гидрокси-3¹-метоксифенил)-4-[3²,5²,7²-тригидрокси-3²,4²-дигидро-4²-оксо-(2Н)-1²-бензопиран-2²-ил]-3,6-метанобензофуран-7-он.** $[\alpha]_D^{20} = +230.4^0$ (пиридин), т.пл. 188-190⁰ C; R_f 0.24.

Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д., Гц: 11.72 (1H, с, C-5²-OH); 10.49 (1H, с, C-7²-OH); 8.24 (1H, с, C-4¹-OH); 6.93 (1H, с, C-3²-OH); 6.69 (1H, д, J=1.8, C-2¹-H); 6.63 (1H, д, J=8.1, C-6¹-H); 5.56 (1H, дд, J= 8.1 и 1.8, C-5¹-H); 6.06 (1H, уш.д, J=6.8, C-5-H), 5.86 (1H, уш.с, C-6²-H); 5.58 (1H, д, J=5.7, C-3²-OH); 4.78 (1H, уш.д, J=11.1, C-2²-H); 4.78 (1H, уш.д, J=11.1, C-2²-H); 4.38 (1H, дд, J=11.1 и 5.7, C-3²-H); 3.81 (1H, дд, J= 10.1 и 4,1, C-2¹-H); 3.79(3H, с, OCH₃); 3.77 (1H, д, J= 10.1, C-3¹-H); 3.28 (1H, м, C-6а-H); 3.17 (1H, дд, J=6.8 и 2.9, C-6-H); 2.82 (1H, м, C-3а).

Спектр ЯМР ¹³C, δ, м.д.: 81.56 (C-2²); 71.096 (C-3²); 196.01 (C-4²); 163.45 (C-5²); 96.25 (C-6²); 165.83 (C-7²); 94.88 (C-8²); 161.79 (C-9²); 100,02 (C-10²); 132.41 (C-7а); 48.49 (C-3а); 96.42 (C-4); 201.05 (C-7); 43.86 (C-6); 123.81 (C-5); 56.42 (C-6а); 46.45 (C-3); 72.73 (C-2); 139.5 (C-1¹); 111.97(C-2¹); 146.92 (C-3¹); 145.15 (C-4¹); 114.81 (C-5¹); 120.24 (C-6¹); 55.33 (OCH₃).



3.4. Испытание гидропонического метода выращивания расторопши

Семена от образцов лиловоцветковой расторопши пятнистой, собранные осенью 2012 года в окрестности с. Ннги (Арцах), высевались (в середине марта 2013 г.) на глубину 2-3 см в открытые (вне помещения) гидропонные деланки с красным вулканическим шлаком (вместо почвы) в отделе гидропоники Института агрохимических проблем и гидропоники им. Г.С.Давтяна НАН РА. В соответствии с технологией, разработанной и установленной в институте, научным сотрудником отдела (к.б.н. Л.Э.Оганесян) производилась периодически подпитка семян, всходов и развивающихся растений специальным питательным раствором (раствором Давтяна). В сентябре – октябре 2013 г. с выросших (до 175 см высотой) и полностью оформившихся растений собирались отцветшие корзинки расторопши, из которых методом вылущивания отделили зрелые семена (см. Рис. 46 и Рис. 47 в разделе 2.3) в количестве 10,65 г.

Летом 2014 г. (с начала июля) с растений этих деланок (уже с двулетних растений) стали также собирать отцветшие корзинки, из которых получили 75 г семян.

Полученные семена подвергли обработке (экстракции) описанным в разделе 4.2. методом. Такой же обработке подвергли также семена расторопши, растущей в разных районах Арцаха (Агдаме, Храморде, Гюлиджане, по 50 г), а также выращенных в ИТОХ (45 г). Результаты сравнительного изучения образцов семян представлены в разделе 2.3 диссертации.

3. 5. Выделение осайна и помиферина из плодов маклюры оранжевой

Для выявления осайна и помиферина в растворах использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на стеклянных пластинках, покрытых силикагелем КСКГ (Эстония), подвижную фазу – хлороформ : этанол (30:1),

проявители : пары йода и 1% раствор хлорного железа в этаноле. Выделение осаина и помиферина из их смеси осуществили методом препаративной ТСХ на пластинках той же марки размером 9,5см × 9,5 см. Идентификацию осаина и помиферина в растворах выявляли по их хроматографической подвижности (R_f), а для выделенных препаративной ТСХ – также по их т.пл. (см. раздел 2.4 диссертации).

3.5.1. Препаративная тонкослойная хроматография смеси осаина с помиферином

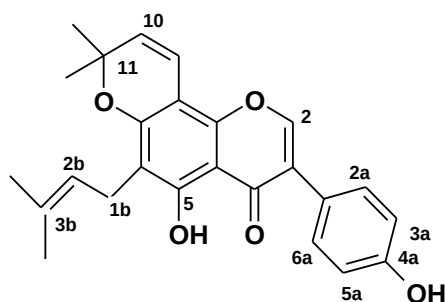
100 мг полученного порошка (смеси осаина с помиферином, см. раздел 3.4) растворили в 2 мл метанола и раствор нанесли в виде полос шириной 1,5 – 2.0 мм) с помощью стеклянного капилляра (на стартовые линии десяти силикагелевых пластинок. После завершения хроматографирования и сушки пластинок в токе теплого воздуха, с пластинок соскребли и собрали отдельно полосы слоев силикагеля (шириной 3-4 мм), соответствующих зонам с R_f 0,73 и 0,23. Силикагелевые порошки одинаковых зон объединили, обработали 20 мл горячего метанола, метанольные растворы фильтровали и упарили досуха. Сухие остатки каждой зоны растворили при нагревании в минимальных количествах (1-1,5мл) 96% этанола. Из охлажденных растворов отделили выпавшие в осадок 30 мг осаина (**5**) (т.пл. 191-193⁰С; R_f 0,73) и 33 мг помиферина (**6**) (т.пл.198-199⁰С; R_f 0,23).

Ниже приведены фиксированные нами характеристики ¹H-ЯМР спектров осаина (**5**) и помиферина (**6**) в растворе DMSO-d₆:

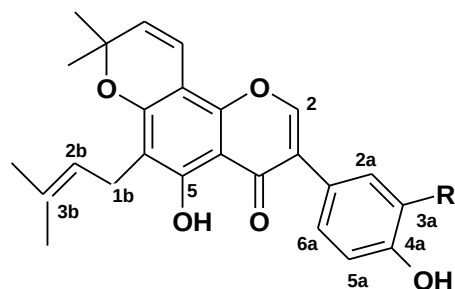
Осаин(5) , δ ,м.д.: 13,17(1H,с, C5-OH); 8,95(1H,с, C4a-OH); 7,85(1H,с,C2-H); 7,27 (2H,д,C2a-H и C6a-H); 6,80(2H,д,C3a-H и C5a-H); 6,60(1H,д,C9-H); 5,50(1H,д, C10-H); 5,16(1H,тр,C2b-H); 3,18(2H,д,C1b-2H); 1,75(6H,с,C3b-2CH₃); 1,40(6H,с,C11-2CH₃).

Помиферин(6) , δ ,м.д.: 13,19(1H,с, C5-OH); 8,23(1H,с, C4a-OH); 8,05(1H,с,C3a-OH); 7,85(1H,с,C2-H); 6,85(1H,с,C2a-H); 6,80 -6,70(2H, м,C5a-H и C6a-H);

6,62(1H,д,C9-H); 5,46 (1H,д, C10-H); 5,15 (1H,тр, C2b-H); 3,20 (2H, д, C1b-2H); 1,70 ,1,60 (по 3H,с,C3b-2CH₂); 1,4 (6H,с,C11-2CH₃).



5



6 R=OH

Эти данные хорошо согласуются со структурными особенностями этих изофлавонов, а также с описанными ранее ¹H-ЯМР характеристиками, зафиксированными в дейтероацетоновом растворе [102].

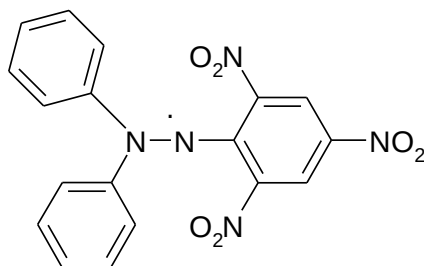
3.5.2. Изучение спиртовой настойки плодов маклюры, полученной по методу народной медицины

Образцы настойки (по 100 мл светлокорицневой жидкости со спиртовым запахом) упаривали втрое при пониженном давлении, остатки экстрагировали хлороформом (4 раза по 50 мл). Хлороформные экстракты, после высушивания безводным сульфатом натрия, упаривали втрое, фильтровали через слой силикагеля SERVA Si60; 0,05-0,1мм (высотой 3 см, диаметром 2 см). Силикагель промывали 20 мл хлороформа и соединенный хлороформный раствор упаривали досуха. Остаток растворяли в 50 мл 50% этанола, прибавляли к раствору 30 мг порошка активированного угля, перемешивали, нагревали до кипения, охлаждали, отфильтровывали и фильтрат упаривали досуха. С выходом 120±15 мг получали чистую смесь осаина и помиферина, идентифицированную (по ТСХ) (см. раздел 2.4.).

3.6. Изучение антирадикальной активности выделенных флавоноидов

Исследование антирадикальной активности проводилось с использованием в качестве испытуемых веществ фламина, полученного из цветков бессмертника красноватого, растущего в Армении, силимарина, выделенного из семян расторопши пятнистой, собранных в Арцахе, помиферина и смеси осаина и помиферина, полученных из плодов дерева маклюры оранжевой, интродуцированной в Ереване, кроме того исследовалась и смесь силимарина с фламином.

Антирадикальная активность определялась следуя ранее описанному методу основанному на спектрофотометрии [95]. В качестве свободного радикала в измерениях использовался 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ, DPPH $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Sigma Aldrich GmbH, $M=394$).



ДФПГ

Суть метода заключается в измерении оптической плотности растворов испытуемых веществ с ДФПГ и на ее основе определении соответствующей концентрации ДФПГ в растворе. Для правильности измерений использовался дважды перегнанный, высушенный молекулярными ситами, абсолютный метанол в качестве растворителя (поскольку, во-первых, в нем хорошо растворимы вещества флавоноидного характера и, во-вторых, при 515 нм этот растворитель не поглощает свет, то есть определяется только концентрация ДФПГ). Определения проводились спектрофотометром “Helios (Termo Electron corp.)”.

Испытуемые вещества изучались тремя группами, в разные дни.

Известно, что между концентрацией и оптической плотностью вещества существует линейная зависимость [103], поэтому для корреляционных расчетов было использовано два метанольных раствора с известными концентрациями ДФПГ (20×10^{-5} г/л и 2×10^{-5} г/л), а так же для расчетов уравнений корреляционных прямых использовалось уравнение прямой по координатам двух точек [104]. Так как для корреляции использовалась зависимость концентрации (C, Ось Y) от оптической плотности (D, Ось X), то в нашем случае уравнение выглядит так:

$$\frac{D - D_1}{D_2 - D_1} = \frac{C - C_1}{C_2 - C_1},$$

где D_1 - оптическая плотность раствора ДФПГ с концентрацией 2×10^{-5} г/л (C_1), D_2 - оптическая плотность раствора ДФПГ с концентрацией 20×10^{-5} г/л (C_2), D - измеренная оптическая плотность метанольного раствора смеси ДФПГ с испытуемыми образцами, C - рассчитанная величина концентрации соответствующей оптической плотности D . Определив оптические плотности для метанольных растворов 20×10^{-5} г/л и 2×10^{-5} г/л и вставив их в уравнение получено упрощенное уравнение калибровочной прямой:

$$C = \left(\frac{18 \cdot D}{D_2 - D_1} - \frac{18 \cdot D_1}{D_2 - D_1} + 2 \right) \cdot 10^{-5}, \quad (1)$$

Исходя из данного уравнения рассчитывались корреляционные уравнения для каждой группы веществ, определялись концентрации остаточного количества ДФПГ в смесях(C), на основе которых рассчитывались соответствующие активности испытуемых веществ в процентах(A).

$$A = 100 - \frac{C \cdot 100}{20 \cdot 10^{-5}}, \quad (2)$$

Определение антирадикальных активностей. Для приготовления раствора ДФПГ концентрации 20×10^{-5} г/л было растворено 2 мг ДФПГ в 100 мл абсолютного метанола и, следуя методике [95], на каждый исследуемый образец взяли по 2 мл полученного раствора.

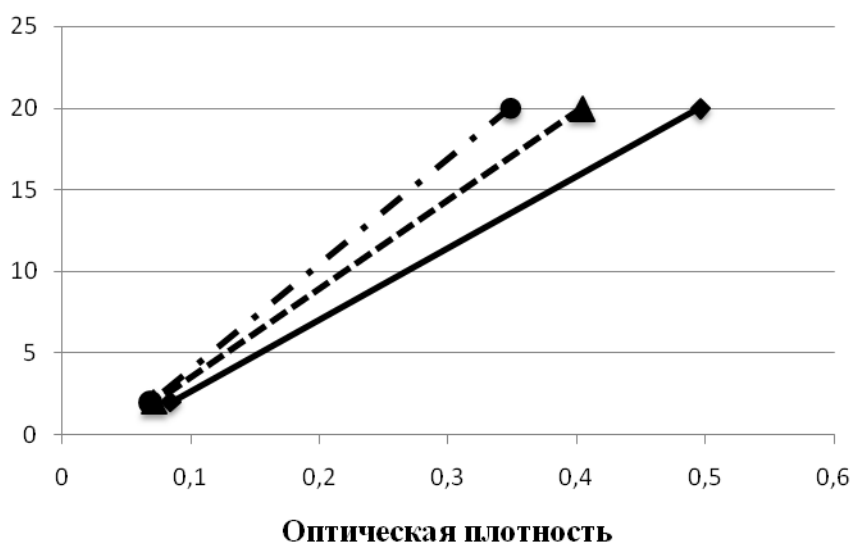
Для корреляционного перерасчета к 1 мл раствора ДФПГ концентрации 20×10^{-5} г/л было добавлено 9 мл метанола, приготовлено 10 мл раствора с концентрацией ДФПГ 2×10^{-5} г/л и затем измерена оптическая плотность исходного и разбавленного растворов при 515 нм (табл. 7).

Таблица 7

Данные для расчетов корреляций

Смесь силимарина и фламина		Помиферин, смесь осаина и помиферина		фламин и силимарин	
Концентрация ДФПГ ($\times 10^{-5}$ г/л)	Оптическая Плотность	Концентрация ДФПГ ($\times 10^{-5}$ г/л)	Оптическая Плотность	Концентрация ДФПГ ($\times 10^{-5}$ г/л)	Оптическая Плотность
20	0,496	20	0,348	20	0,404
2	0,084	2	0,068	2	0,071

Концентрация
ДФПГ
($\times 10^{-5}$ г/л)



- ◆— Смесь Силимарина с Фламином
- Смесь Осаин с помиферин и чистый помиферин
- .-▲-.- Фламин и Силимарин чистые

Рис. 57. Корреляционные прямые

Данные табл. 7 представлены также в виде графика корреляционных прямых (Рис. 57), используя эти данные и (1) были рассчитаны корреляционные уравнения прямых, то есть зависимости концентраций ДФПГ от оптической плотности.

Для исследования было взвешено (с точностью до 0,1 мг) 1 мг и 3 мг помиферина, 1 мг, 3 мг осаина, смеси осаина и помиферина (по 1 мг и по 3 мг), 3 мг силимарина, 3 мг фламина, а также смеси силимарина с фламином (по 1 мг и по 3 мг).

Навески образцов были растворены, каждый в 10 мл метанола, из растворов взято по 0,1 мл, смешаны с 2 мл раствора ДФПГ с концентрацией 20×10^{-5} г/л и измерялась оптическая плотность каждой полученной смеси через 1, 5, 20 мин до наступления неизменности величины плотности (до “плато”).

С помощью рассчитанных корреляций, исходя из полученных данных оптической плотности по корреляционным уравнениям высчитывались соответственные концентрации ДФПГ и антирадикальная активность образцов выраженная в процентах по (2).

На основе данных таблицы 3 рассчитанные уравнения корреляционных прямых имеют следующий вид:

$$C = (43,6893204 \cdot D - 1,66990291) \cdot 10^{-5} \text{ (для смесей силимарина с фламином)}$$

$$C = (54,0540541 \cdot D - 1,83783784) \cdot 10^{-5} \text{ (для фламина и силимарина)}$$

$$C = (64,2857143 \cdot D - 2,37142857) \cdot 10^{-5} \text{ (для помиф. и смесей осаина с помиферином)}$$

Испытания осаина как в дозе 1 мг, так и 3 мг не выявило уменьшения концентрации ДФПГ.

Результаты измерений оптической плотности смесей испытуемых образцов с ДФПГ в зависимости от времени, концентрации, рассчитанные с помощью соответствующих корреляционных уравнений, а так же соответствующие проценты активности образцов представлены в таблицах 8, 9 и 10.

Таблица 8.

Результаты исследования фламина и силимарина (Силим.)

Образец	Величина	Время, мин		
		1	5	20
3 мг Фламин	D	0,222	0,182	0,155
	C x10 ⁻⁵ г/л	10,162	8	6,541
	АРА, %	49,189	60	67,297
3 мг Силим.	D	0,357	0,311	0,286
	C x10 ⁻⁵ г/л	17,459	14,973	13,622
	АРА, %	12,703	25,135	31,892

Таблица 9.

Результаты исследования фламина и силимарина

Образец	Величина	Время, мин		
		1	5	20
1 мг + 1 мг	D	0,341	0,328	0,317
	C x10 ⁻⁵ г/л	13,228	12,660	12,180
	АРА, %	33,859	36,699	39,102
3 мг + 3 мг	D	0,259	0,22	0,203
	C x10 ⁻⁵ г/л	9,646	7,942	7,199
	АРА, %	51,772	60,291	64,005

Результаты исследования помиферина (Пом.) и смесей осаина с помиферином

Образец	Величина	Время, мин			Образец	Величина	Время, мин		
		1	5	20			1	5	20
1 мг Пом.	D	0,193	0,132	0,132	1 мг + 1 мг	D	0,221	0,131	0,131
	Cx10 ⁻⁵ г/л	10,036	6,114	6,114		C x10 ⁻⁵ г/л	11,836	6,05	6,05
	АРА, %	49,821	69,429	69,429		АРА, %	40,821	69,75	69,75
3 мг Пом.	D	0,227	0,112	0,112	3 мг + 3 мг	D	0,053	0,053	0,053
	C x10 ⁻⁵ г/л	12,221	4,829	4,829		C x10 ⁻⁵ г/л	1,036	1,036	1,036
	АРА, %	38,893	75,857	75,857		АРА, %	94,82	94,82	94,82

Таблица 10.

3.7. Выделение жирных масел семян для анализа методом ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Для получения жирных масел семена, предназначенные переработке, в качестве сырья, предварительно высушивали при комнатной температуре, разложенными тонким слоем на бумаге до воздушно сухого состояния в течение 3 – 4-х дней (в случае косточковых плодов, например, растений семейства розоцветных, семена сначала освобождались от твердой оболочки). Затем семена измельчались до размера частиц в 0,5 – 1 мм, взвешивались и экстрагировались гексаном в аппарате Сокслета в течение 8 – 10 часов (30-40 автоматических сливов раствора из патрона). Гексановый раствор отделяли, отфильтровывали, сгущали отгонкой гексана и из маслянистого остатка, подогреванием при пониженном давлении, удаляли гексан, практически полностью. Полученное масло взвешивали и анализировали методом ^1H -ЯМР-спектроскопии в растворе дейтерохлороформа (или DMSO-d_6). Полученные спектры ^1H -ЯМР жирных масел и кислот семян разных растений сгруппировали в виде таблиц (например таблиц 5 и 6 в главе 2.6. диссертации); в виде рисунков частей спектров (областей метильных групп при 0,85 – 1,05 м.д; Рис. 58-63) для подсчета содержания омега-3 ненасыщенных кислот, а также приведены в виде полных спектров шестнадцати жирных масел семян, содержащих омега-3 ненасыщенные кислоты (Рис. 64 -Рис. 79).

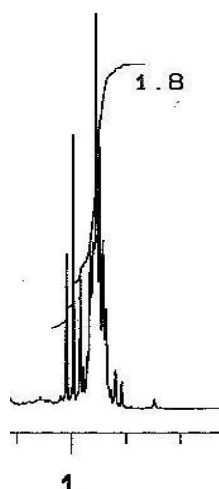


Рис. 58. Часть спектра масла семян шиповника

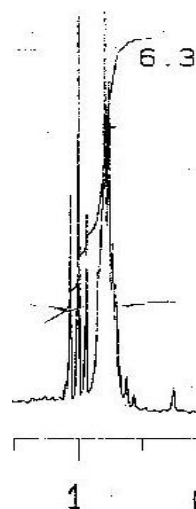


Рис. 59. Часть спектра масла семян облепихи

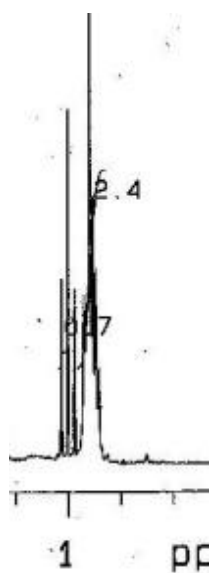


Рис. 60. Часть спектра масла
семян конопли



Рис. 61. Часть спектра масла
семян мелиссы

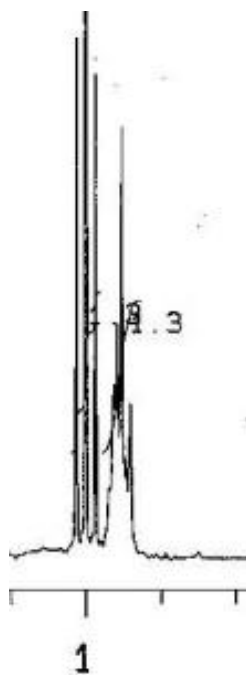


Рис. 62. Часть спектра кислот
масла семян льна

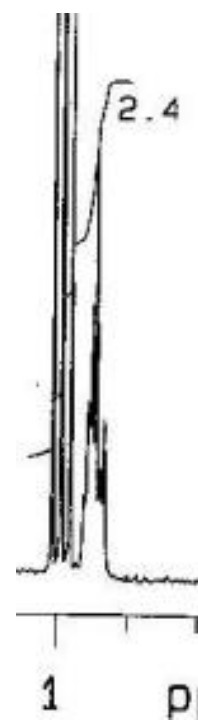


Рис. 63. Часть спектра масла
семян льна

3.7.1. ^1H -ЯМР-спектры шестнадцати масел, содержащих омега-3 ненасыщенные жирные кислоты

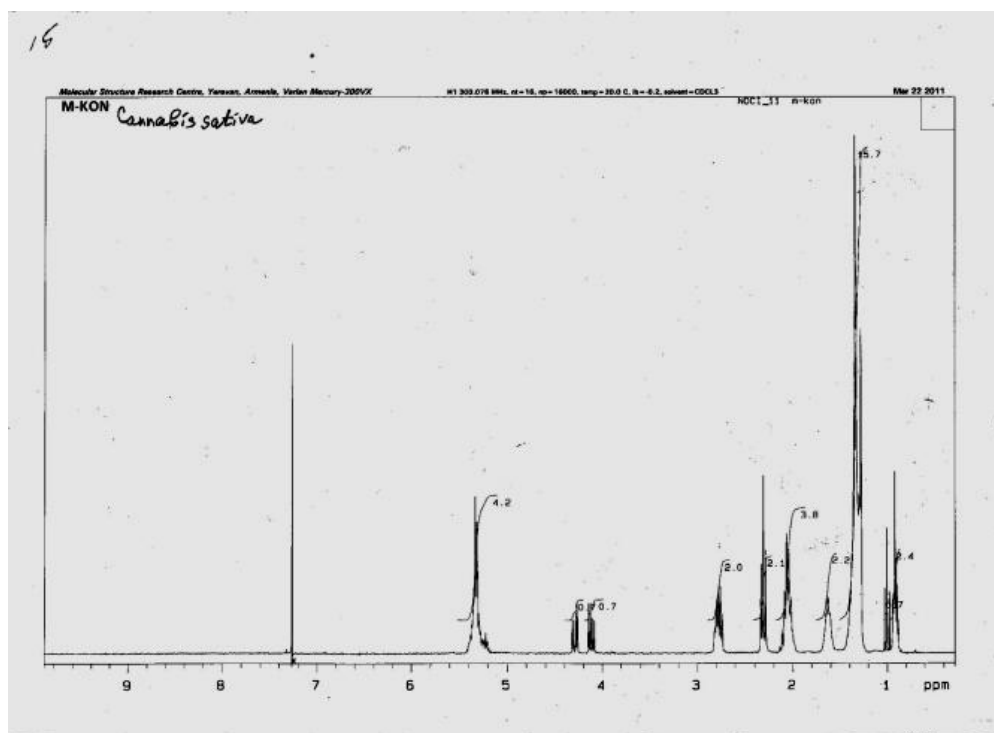


Рис. 64: ^1H -ЯМР-спектр масла семян конопли (*Cannabis sativa* L.).

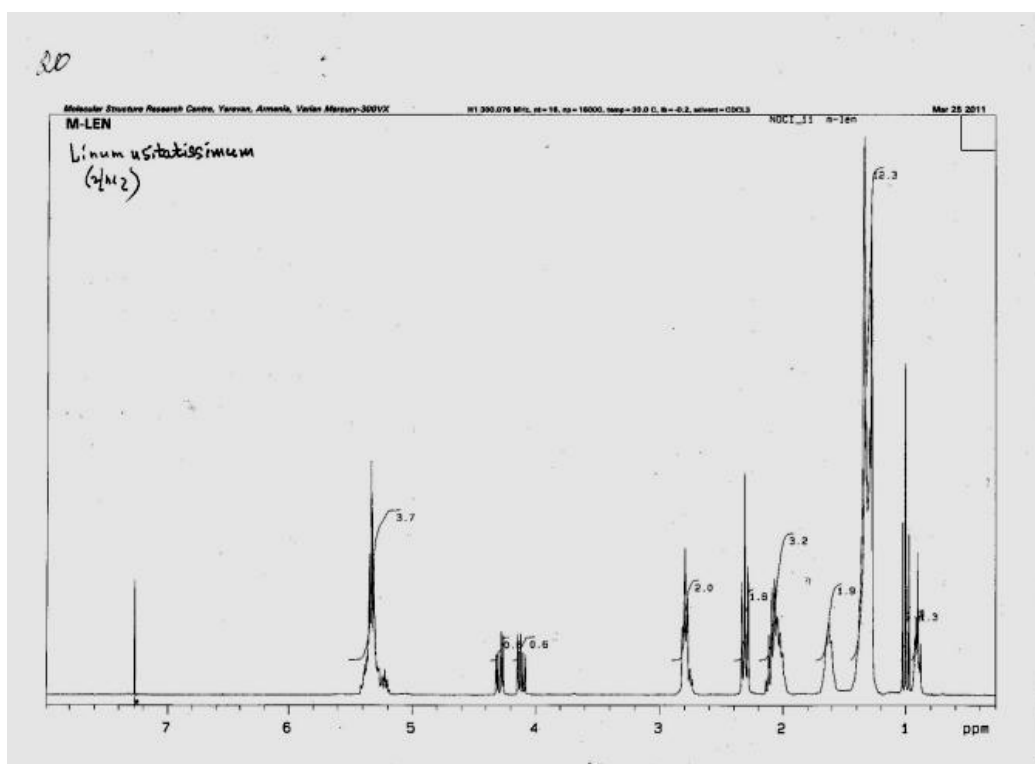


Рис. 65. ^1H -ЯМР-спектр масла семян льна (*Linum usitatissimum* L.).

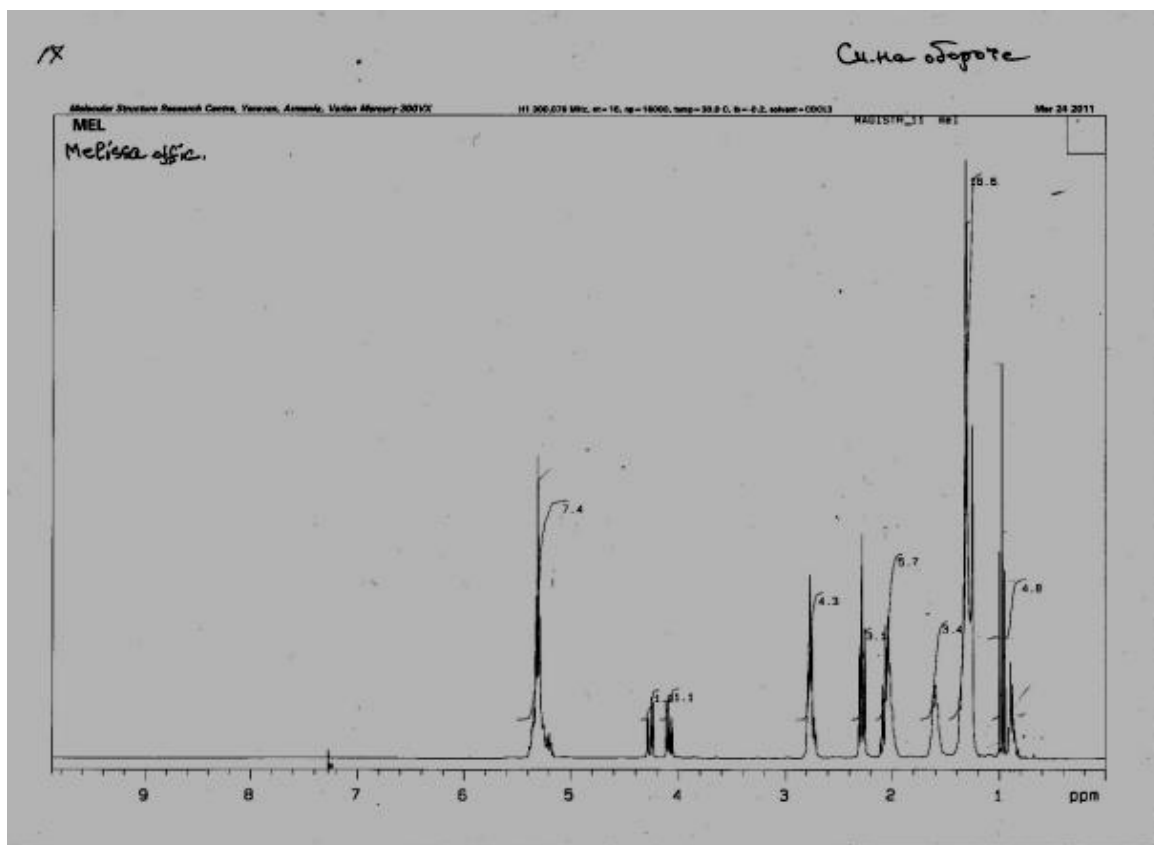


Рис. 66. ^1H -ЯМР-спектр масла семян мелиссы (*Melissa officinalis* L.).

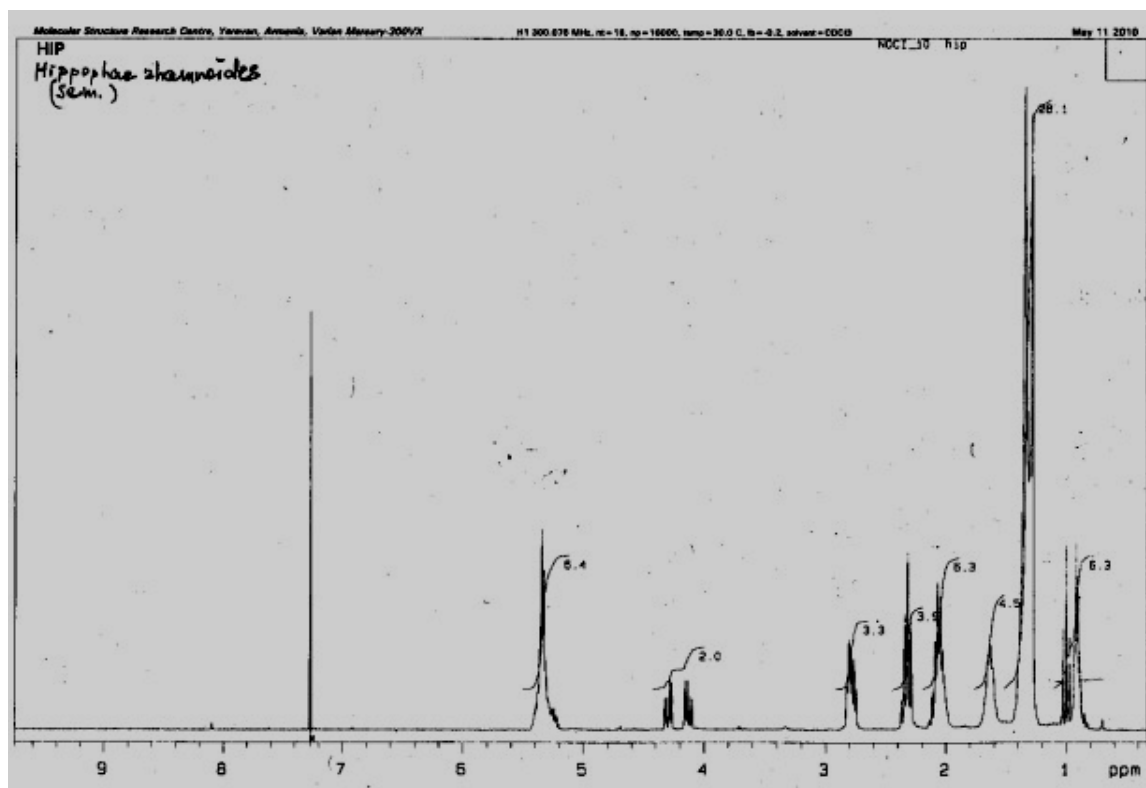


Рис. 67 ^1H -ЯМР-спектр масла семян облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.).

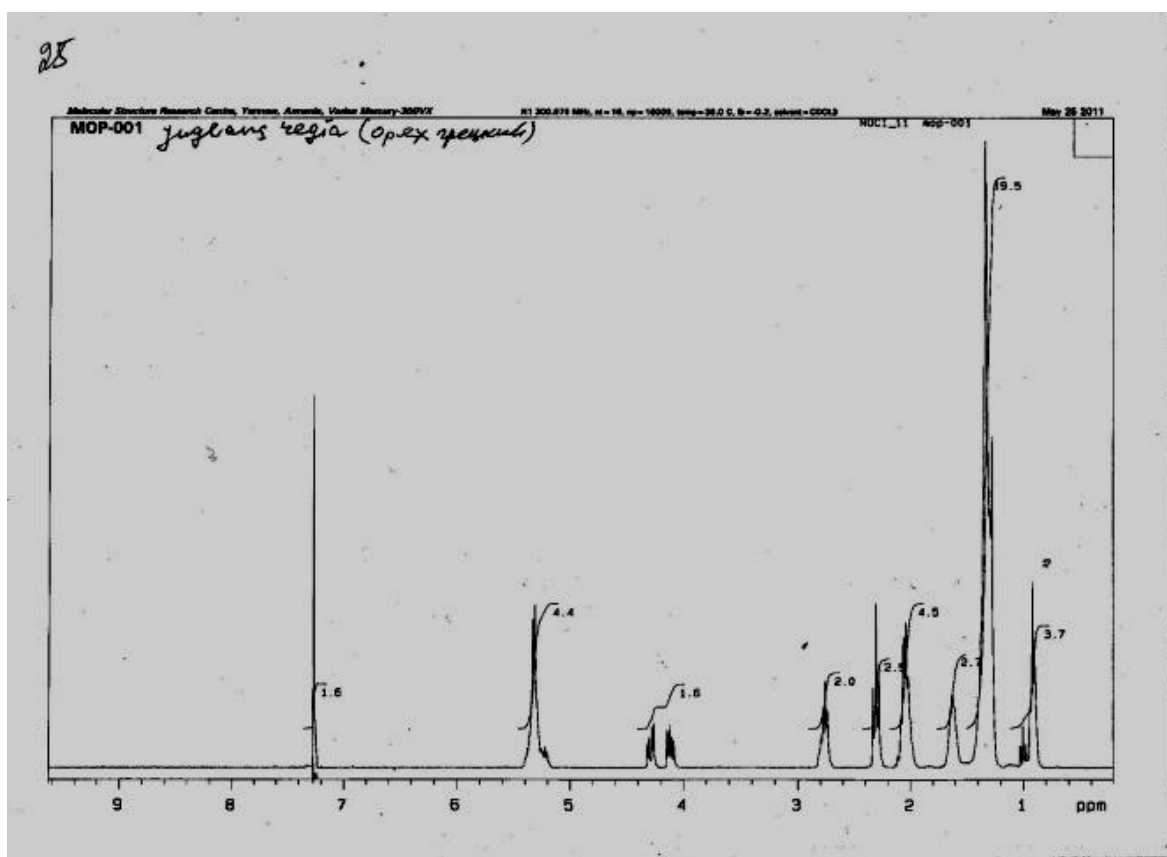


Рис. 68. ^1H -ЯМР-спектр масла плодов грецкого ореха (*Juglans regia* L.).

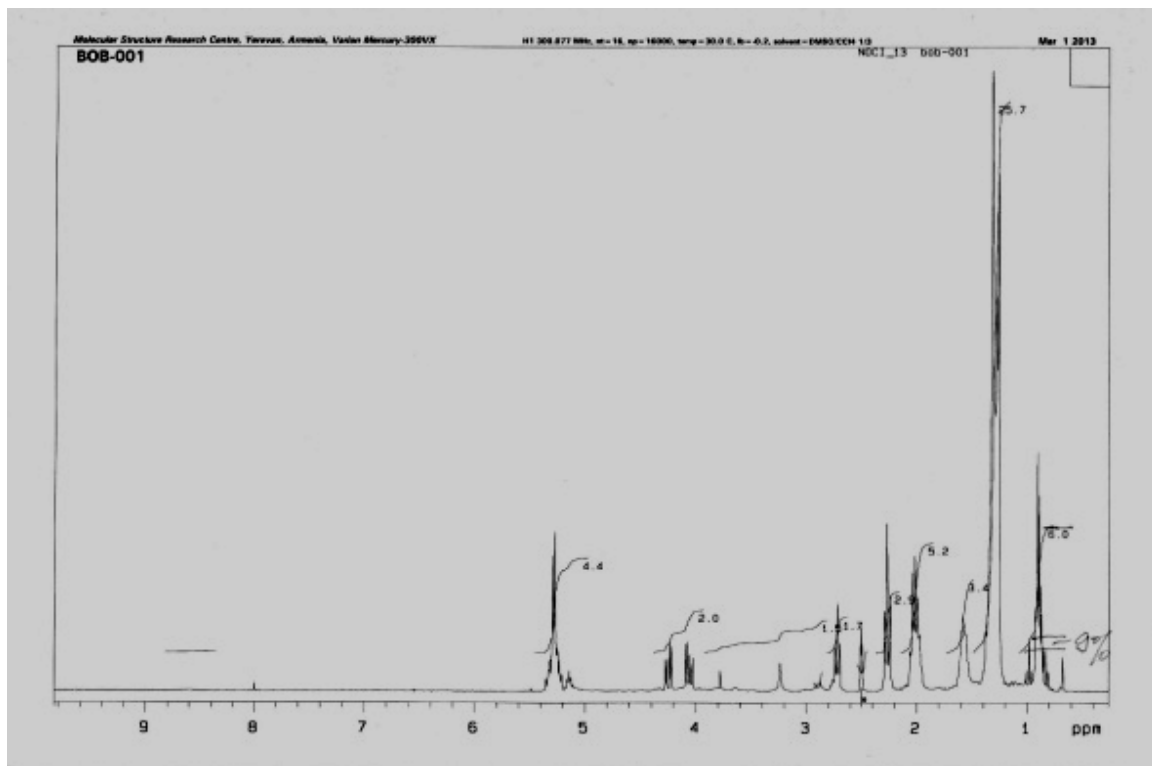


Рис. 69 ^1H -ЯМР-спектр масла плодов боба (*Phaseolus vulgaris* L.).

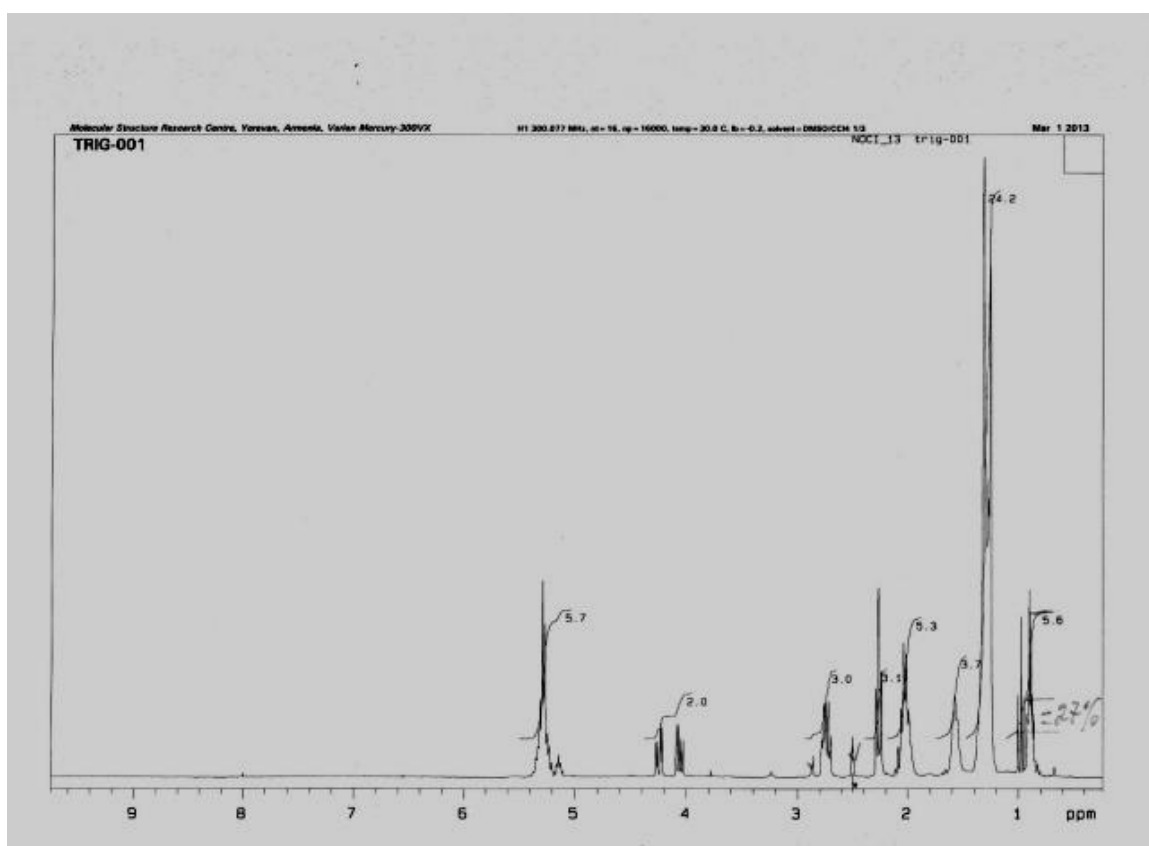


Рис. 70. ^1H -ЯМР-спектр масла семян пажитника (*Trigonella foen.-graecum* L.).

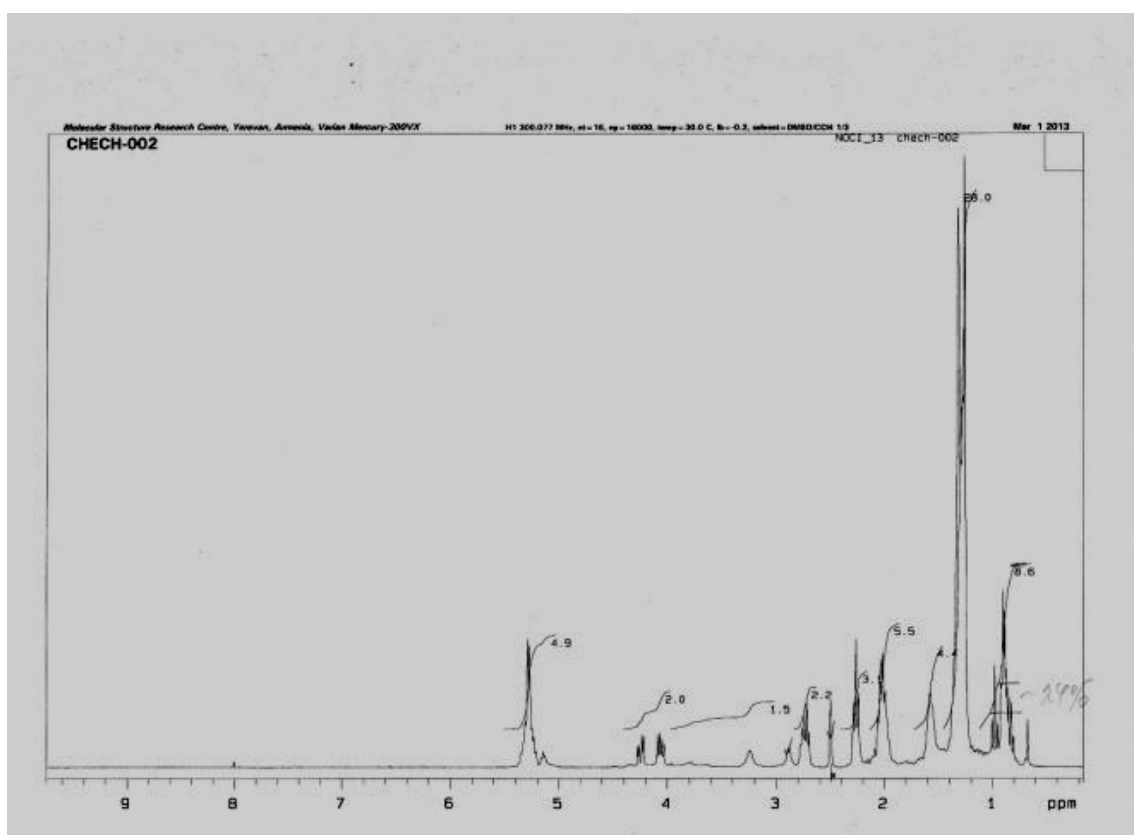


Рис. 71. ^1H -ЯМР-спектр масла семян чечевицы круглой (*Lens culinaris*).

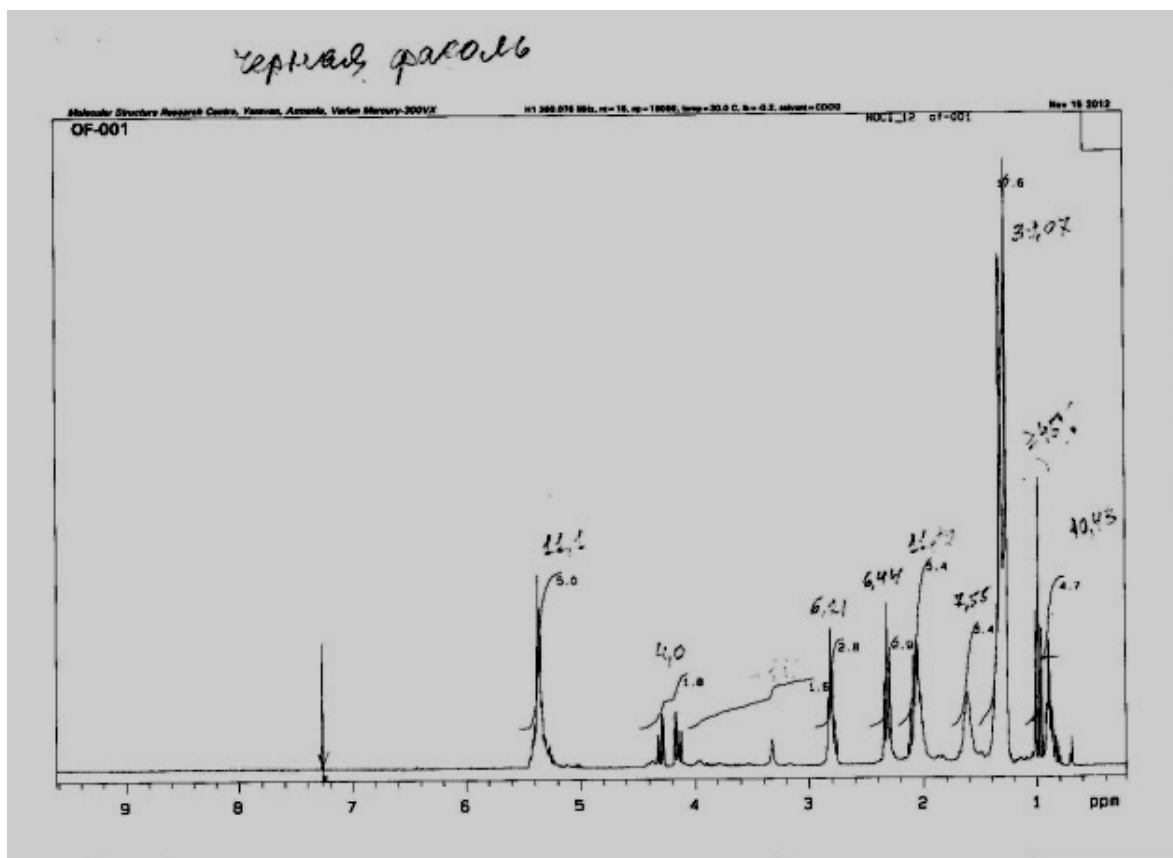


Рис. 72. ^1H -ЯМР-спектр масла семян фасоли черной (*Phaseolus nanus* L. /nigr.).

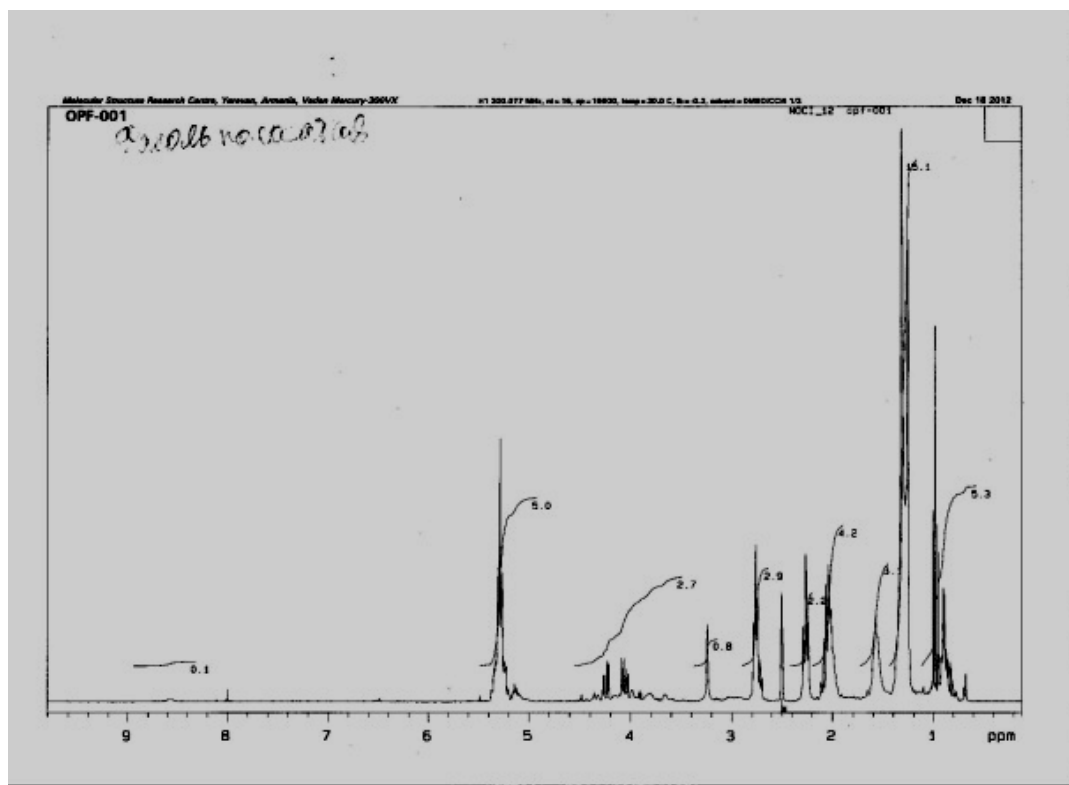


Рис. 73 ^1H -ЯМР-спектр масла семян фасоли полосатой (*Phaseolus nanus* L.).

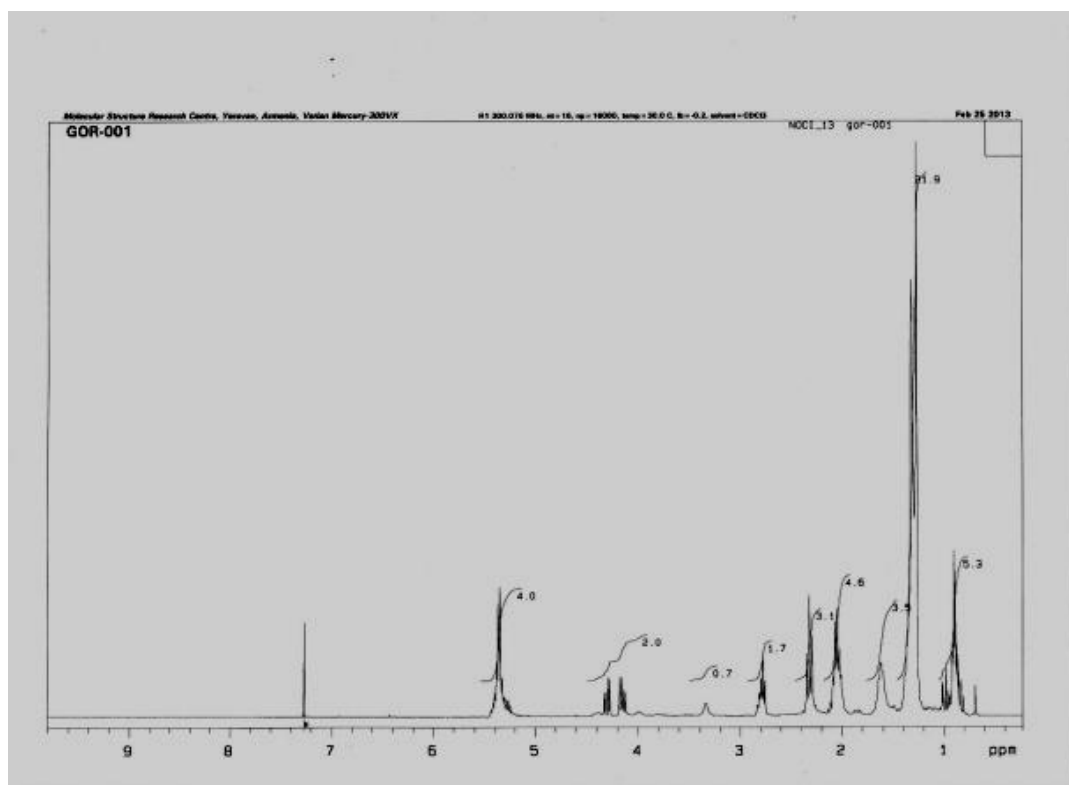


Рис. 74. ^1H -ЯМР-спектр масла семян гороха (*Pisum sativum* L.).

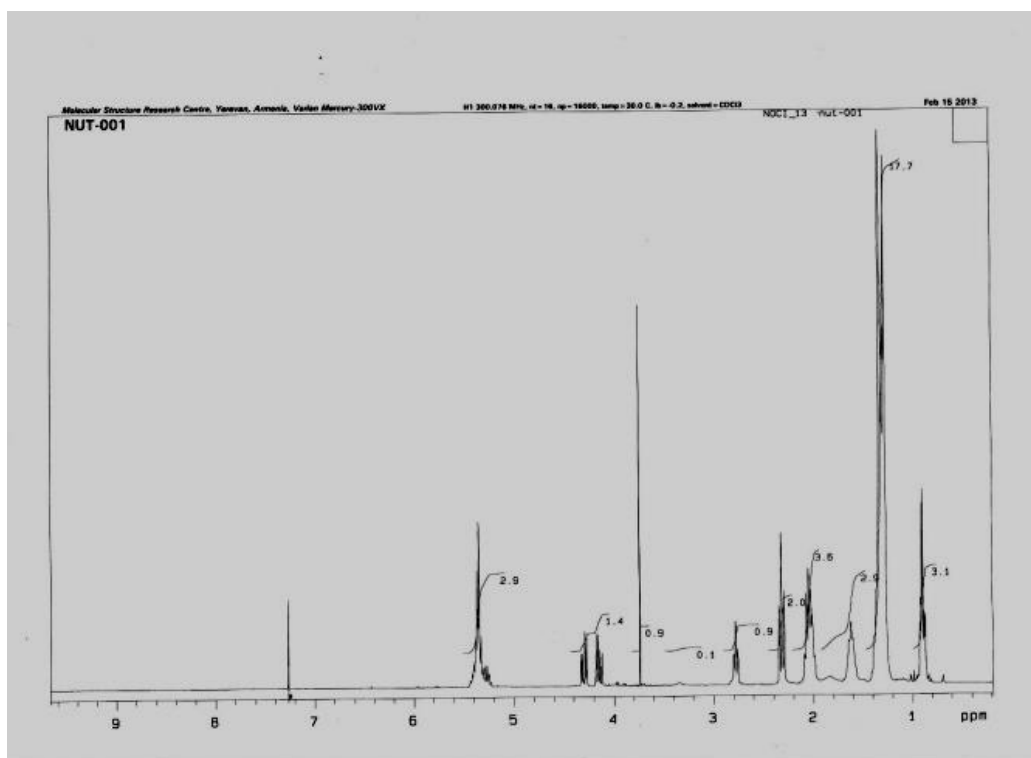


Рис. 75. ^1H -ЯМР-спектр масла семян нута (*Cicer arietinum* L.).

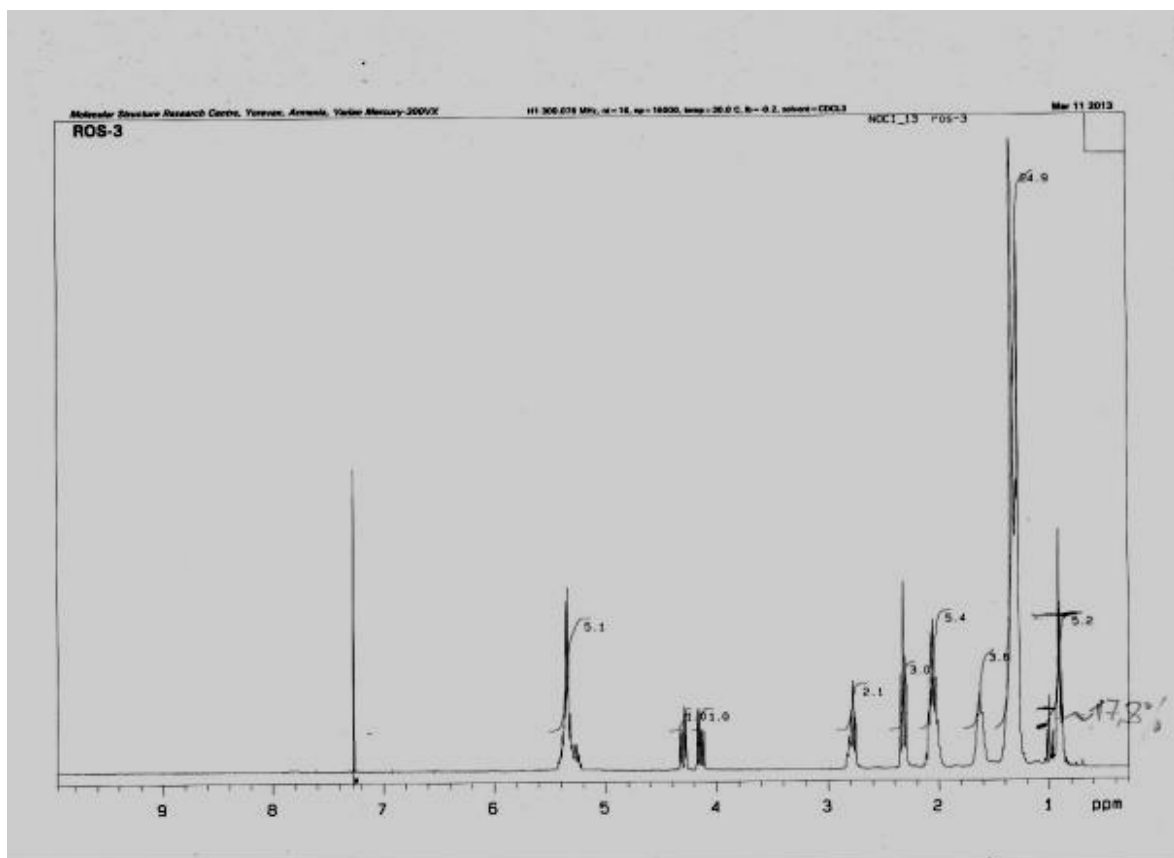


Рис. 76. ^1H -ЯМР-спектр масла семян розы (*Rosa L.*).

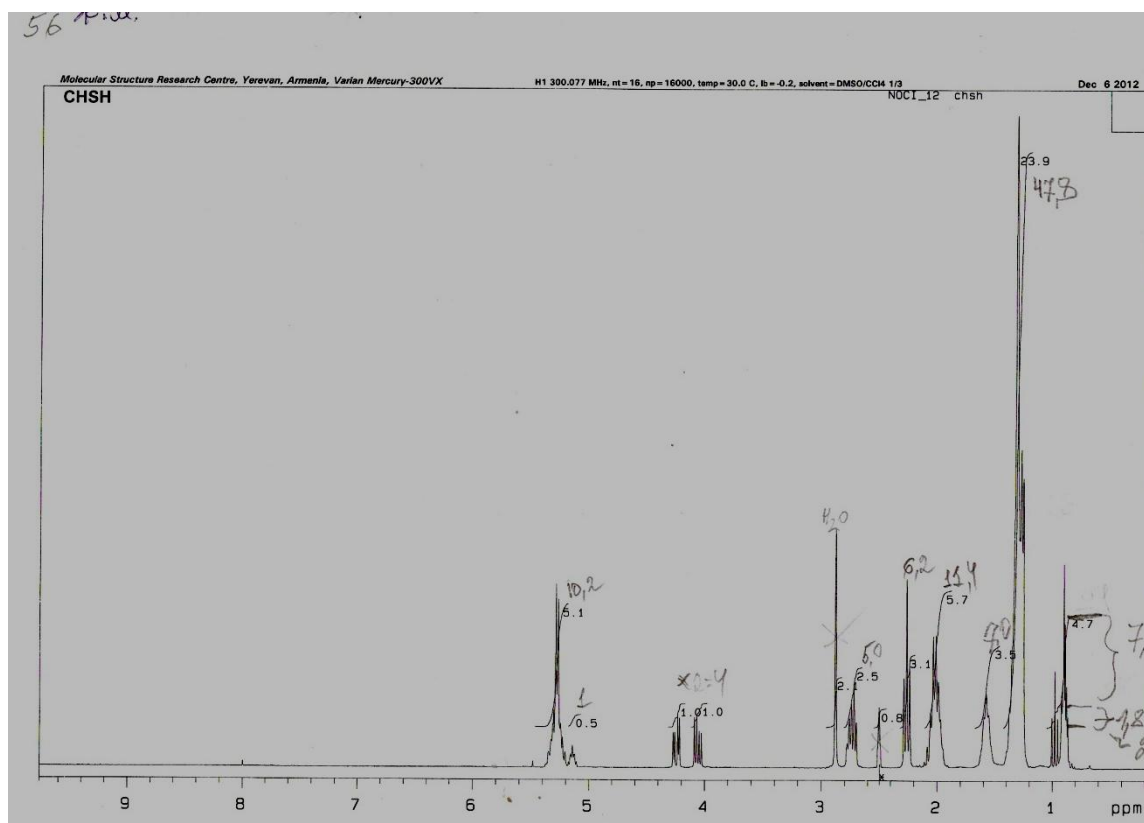


Рис. 77. ^1H -ЯМР-спектр масла семян белой фасоли *Phaseolus nanus L./alb.*).

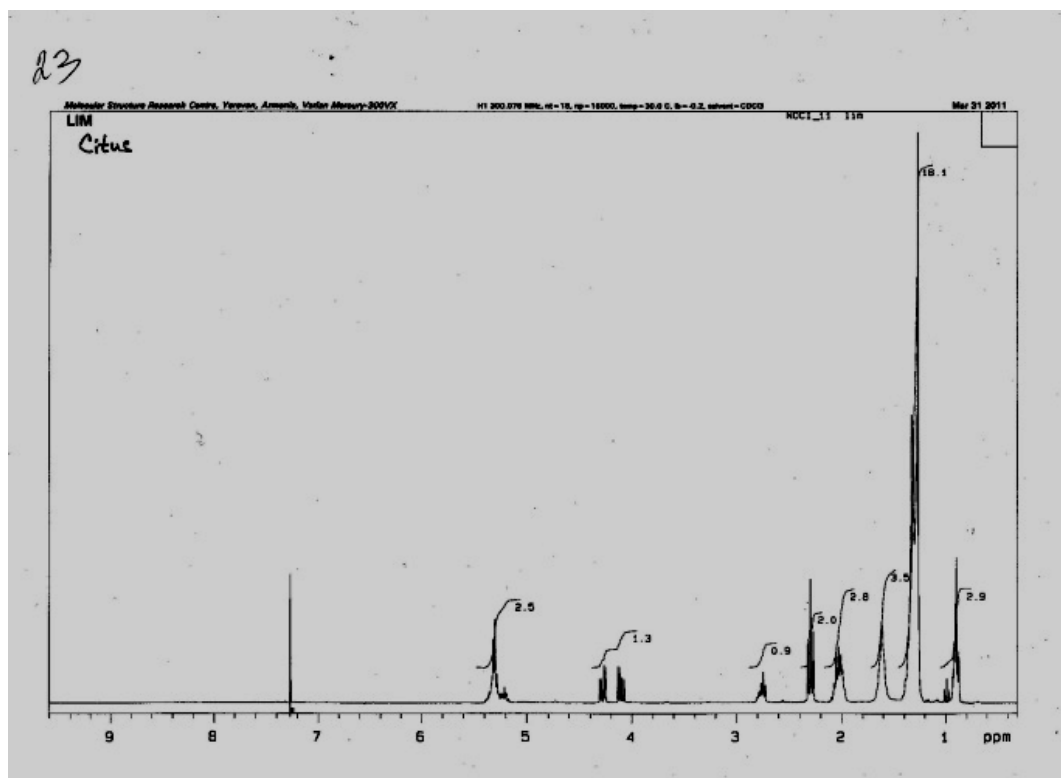


Рис. 78. ^1H -ЯМР-спектр масла семян лимона (*Citrus limon* L.).

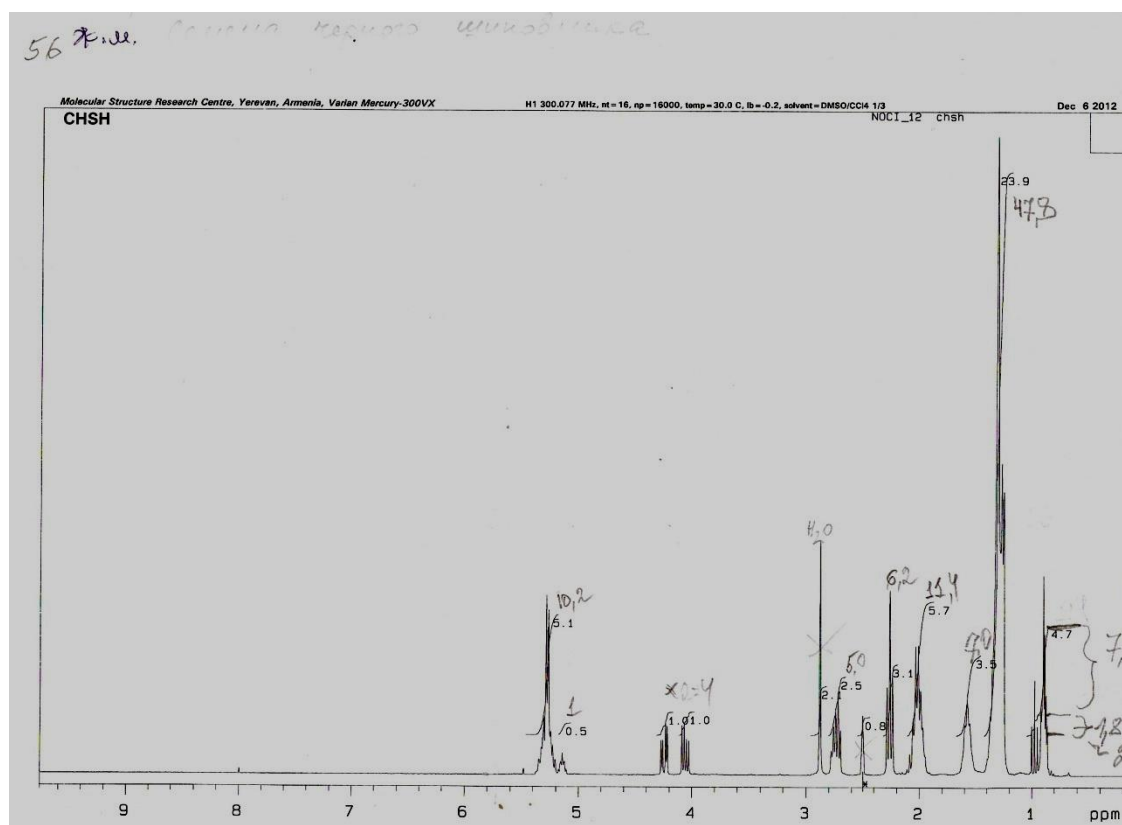


Рис. 79. ^1H -ЯМР-спектр масла семян черного шиповника (*Rosa* L./ *nigr.*).

3.7.2. Щелочной гидролиз масел.

Выделенные образцы масел подвергли щелочному гидролизу следующим образом: к образцу масла приливали смесь 25% водного едкого калия и этанола в соотношении образец/смесь 1/8. Полученную смесь нагревали на кипящей водяной бане около 4-5 часов (до образования гомогенного раствора, не расслаивающегося при охлаждении). Раствор упаривали до 1/10 объема. Прибавляли к нему 10% водный раствор серной кислоты до достижения pH 2 -1 и смесь исчерпывающе экстрагировали диэтиловым эфиром. Эфирный экстракт отделяли, промывали 10% водным раствором КОН. Воднощелочной раствор отделяли, подкисляли 10% серной кислотой до кислой реакции и исчерпывающе экстрагировали диэтиловым эфиром. Эфирный экстракт высушивали добавлением к нему безводного сульфата натрия, отделяли от сульфата, упаривали и досушивали в вакууме. Остаток подвергали ЯМР анализу (Рис. 80-Рис. 82).

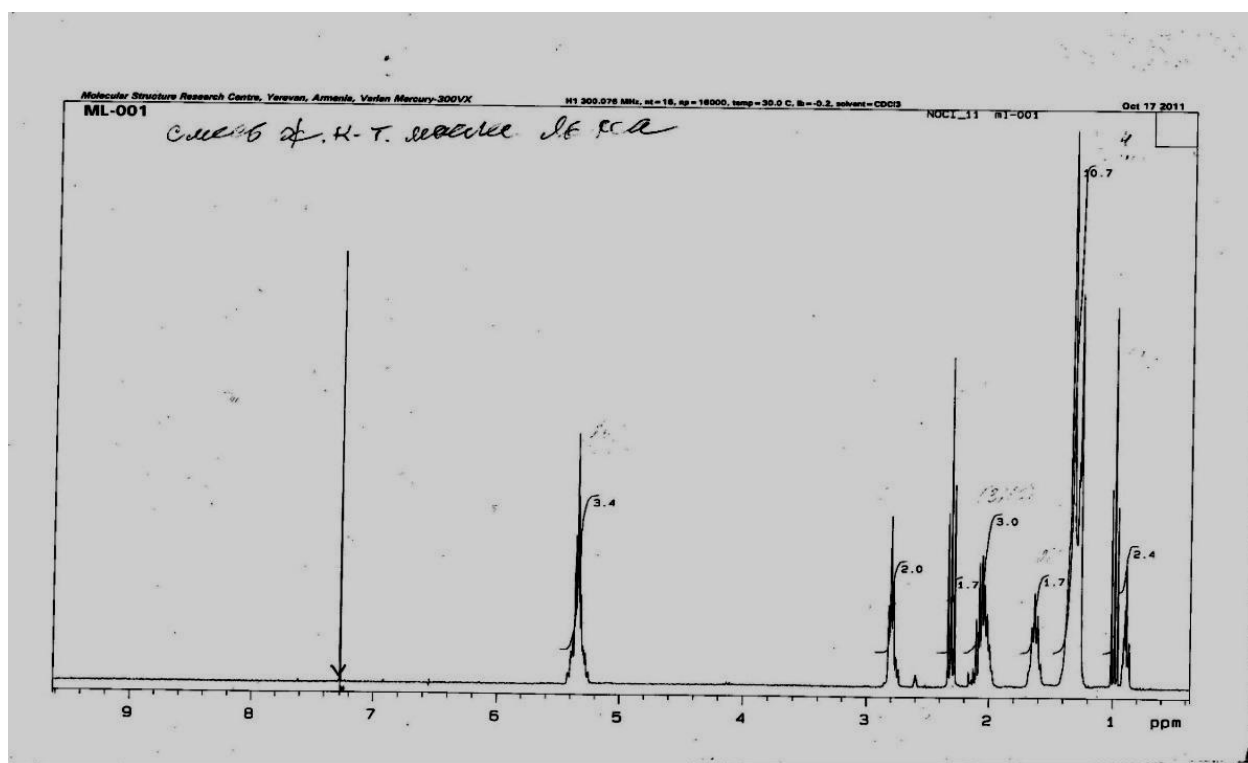


Рис. 80. ¹H-ЯМР спектр смеси кислот масла семян льна.

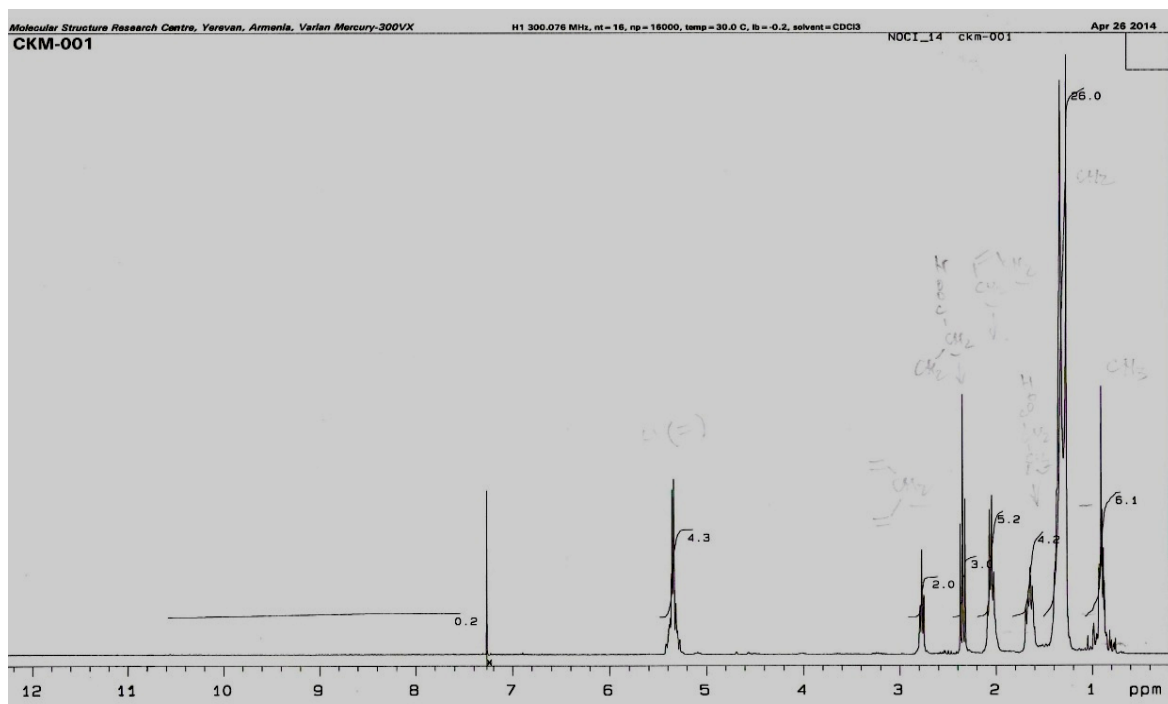


Рис. 81. ^1H -ЯМР спектр смеси кислот масла плодов маклюры.

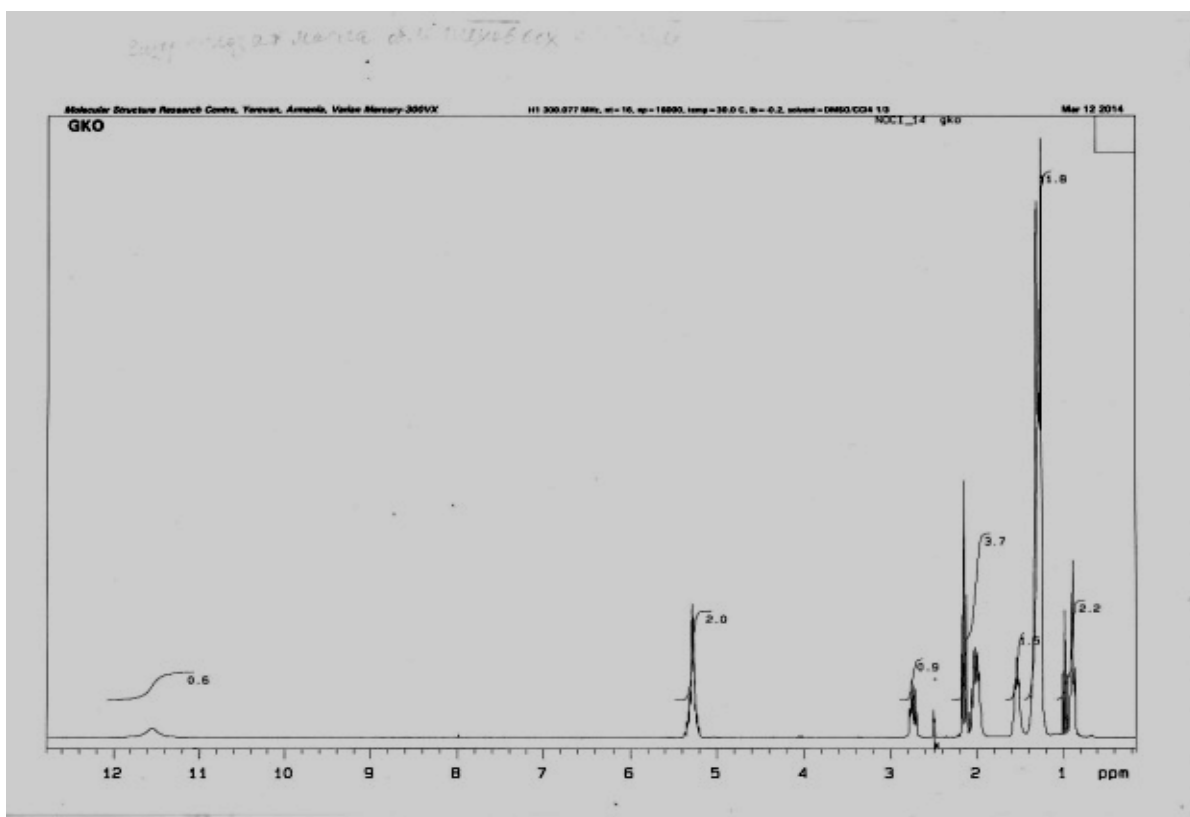


Рис. 82. ^1H -ЯМР спектр смеси кислот масла семян облепихи.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что соцветия бессмертника красноватого содержат смесь флавоноидов составом, подобным (по ТСХ анализу), “составу препарата Фламин”. Выделены и структурно идентифицированы два компонента смеси – флавоноиды апигенин и изосалипурпозид.
2. Установлено, что семена расторопши пятнистой, произрастающей в Армении и распространенной в Арцахе принадлежат к силидианиновой хеморасе лиловоцветковой расторопши, содержат смесь флаволигнанов, близкой по составу смеси флаволигнанов препарата Легалон. Выделены и идентифицированы два главных компонента смеси – флаволигнаны силибин и силидианин.
3. Осуществлено сравнительное изучение содержания жирного масла и флаволигнанов в семенах расторопши пятнистой почвенного и гидропонического происхождения и показано, что гидропонический метод возделывания расторопши пятнистой и производства семян расторопши имеет преимущество перед почвенным, благодаря как его управляемости (за счет применяемых схем водно-минерального питания, регулирования состава, концентрации и соотношения питательных элементов и рН питательного раствора), так и более высоким количественным и качественным показателям получаемых семян.
4. Показано, что в настойке плодов маклюры оранжевой, приготавливаемой по рецепту народной медицины, содержание смеси главных активных компонентов – пренилизофлавонов (осаина и помиферина) составляет около 0,1%. Предложен и апробирован рациональный метод выделения из высушенных плодов маклюры оранжевой очищенной смеси осаина и помиферина, пригодной для приготовления ее спиртового раствора любой концентрации
5. Сравнительным изучением антирадикальной (ДФПГ) активности флавоноидных соединений бессмертника, расторопши и маклюры

показано, что наибольшей антирадикальной активностью (94,8%) обладает пренилизифлавон помиферин, осаин неактивен, а Фламин активнее Силимарина и оба действуют медленно.

6. Установлена целесообразность использования метода ^1H -ЯМР – спектроскопии для относительно оперативного, быстрого обнаружения и количественной оценки (с точностью 0,5 – 2,0%) содержания в растительном сырье (маслах) омега-3 ненасыщенных кислот, без необходимости щелочного гидролиза и анализа продуктов методами хроматографии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г. А. Природные флавоноиды. РАН. Сиб. Отд. Новосибирский институт органической химии. Новосибирск. Академиздат. "Тео", 2007, 232 с.
2. Амосов А.С, Литвиненко В.И. Фенольные соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey.//Раст. ресурсы. 1995. Т. 31, № 3. с. 116-145
3. de la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E., González-Aguilar G.A. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability. 1th Edition. Ames. Wiley J. & Sons, Inc., Publication, 2010, 384 p.
4. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., and Jime'nez L. Polyphenols: food sources and bioavailability.// Am. J. Clin. Nutr., 2004. V. 79, №5, p.727-747.
5. Folium Ginkgo//WHO monographs on selected medical plants, World Health Organization, Geneva. V.1, 1999, p.154-167.
6. Botta B, Vitali A., Menendez P., Misiti D., Delle Monache G. Prenylated Flavonoids: Pharmacology and Biotechnology.// Current Medicinal Chemistry, 2005, v. 12, Is.6, p 713-739.
7. Ботиров Э.Х, Тожибоев М.М., Боначева В.М., Дренин А.А. Флавоноиды надземной части и корней *Pseudosophora alopecuroides* (L.) Sweet.// Химия растительного сырья. 2011, №3, с. 137–142.
8. Халилов Р.М., Маматханов А.У., Сотимов Г.Б., Маматханова М.А. Разработка технологии получения флавоноидов из *Pseudosophora alopecuroides* // Химия растительного сырья. 2009. №2. С. 93–96..
9. M.Amzad Hossain, Zhari Ismail. New Prenylated Flavonoids of *Orthosiphon stamineus* Grown in Malaysia. //Asian Journal of Biotechnology 2011 V.3 №2, p. 200-205.

10. Mohamed-Elamir F. Hegazy, Mohamed H. Abd El-Razek, Fumihiro Nagashima, Yoshinori Asakawa, Paul W. Pare. Rare prenylated flavonoids from *Tephrosia purpurea* // *Phytochemistry*, 2009, v.70, p. 1474-1477.
11. Pranorm Khaomek et al. In vitro antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. // *J. Nat. Med.*, 2008, v.62, is. 2, p. 217-220.
12. Jan Hubert Donfak and all. In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of prenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis* (Fabaceae). // *Asian Journal Traditional Medicines*. 2008. v. 3. is.5, p.172-178.
13. Sayuri de Olivera Oyama, Luiz Antonio de Souza, Debora Cristina Baldoqui, Mari Helena Sarragiotto, Adriano Antoni Silva. Prenylated Flavonoids from *Maclura tinctorum* fruits. // *Phytochemistry*. 1999, v.52 is.1, p.141-145.
14. Elsohly H.N, Joshi A.S., Nimrod A.C., Walker L.A, Clark A.M. Antifungal Chalcones from *Maclura tinctoria*. // *Planta Med.* 2001. v.67, p.87-89.
15. Collie J.N. Derivatives of the multiple keten group. // *J. Chem. Soc.*, 1907. v.91 p. 1806-1813.
16. Robinson. R. The structural relations of natural products Clarendon Press, Oxford, 1955, 150 p.
17. Birch A. J. Biosynthetic relations of some natural phenolic and enolic compounds. // *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe*. 1957, v. 14, p. 186-216.
18. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. 1239 с.
19. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П., Фармакогнозия. 4-е изд. медицина. 2002, 656 с.
20. Ververidis Filippou, ; Trantas Emmanouil; Douglas Carl; Vollmer Guenter; Kretschmar Georg; Panopoulos Nickolas *Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health.* // *Biotechnology Journal*. 2007, v.2 is.10, p.1214-1234.

21. Science of Flavonoids, Erich Grotewold ed., 2006, Springer New York , 247p.
22. Koes R. E., Quattrocchio Francesca and Mol Joseph N. M. The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution// EioEssays, 1994 Vol. 16, No.2 p.p 123-132.
23. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. 1983, Москва , Высшая школа,, 179 с
24. А.А. Лобанова, В.В.Будаева, Г.В.Сакович. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья.// Химия Растительного сырья. №1. 2004. с. 47-52.
25. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Новая волна, 2007, 1206 с.
26. Rewald A., Meier B., Sticher O. Qualitative and quantitative reversed-phase highperform liquid chromatography of flavonoids in Crataegus leaves and flowers//Journal of Chromatography A. 1994,v. 677 is.1, p.25-33.
27. Folium cum Flore Crataegi//WHO monographs selected medicinal plants. Geneva. V.2, 2002, p.66-82.
28. Васякина К.А., Куркина А.В. Репешок аптечный - перспективный сырьевой растительный источник гепатопротекторов.//Известия Самарского НЦ РАН, 2012, т.14, №1(7), с.2184-2186.
29. Корсун, В.Ф. Фитотерапия: традиции российского травничества / В.Ф. Корсун, Е.В. Корсун. 2010 ,М., Эксмо, 880 с.
30. Пассет Т.В. Варабьева В.Я. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков. Москва, Медицина, 1977, 430 с.
31. Пустырник сердечный //Ботанико-фармакогностический словарь. под ред. Блиновой К.Ф. и Яковлева Г.П. 1990, Москва, «Высшая школа». с. 180.
32. Herba hyperici //WHO selected medicinal plants. Geneva, 2002, v.2, p.149-172.

33. Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. // *Pharmacopsychiatry*, 1997, v.30, p.129-134.
34. Bombardelli E., Morazzoni P. *Hypericum perforatum*. // *Fitoterapia*. 1995, v.66, p.43-68.
35. Травы горца птичьего // Монография ВОЗ о лекарственных растениях, широкоиспользуемых в ННГ (на русском языке) . Франция. 2010, с.337-349.
36. Горец перечный // Ботанико-фармакогностический словарь под ред. Блиновой К.Ф. и Яковлева Г.П. Москва. Высшая школа. 1990, с.180.
37. Trivedi R., Kumar S. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008, v.289, p.85-89.
38. Йорданов Д., Николов П., Бойчинов АСП., Фитотерапия Лечение лекарственными травами. 2-е изд., 1970, София, Медицина и физкультура, 342 с.
39. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск, Наука, 1990, 333 с.
40. Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. 4-е изд. стереотип. М. Медицина, 1984, 304 с.
41. Ревазова Л.В., Мусаелян М.С. // Латино-русско-армянский словарь названий лекарственных растений. Ереван, 1997, с.115.
42. Cortex *Viburni Prunifoli* // WHO monographs on selected medical plants, World Health Organization, Itali, 2005, v.4, p.364-372.
43. Head K. Natural therapies for ocular disorders part two: cataracts and glaucoma. // *Alternative Medicine Review*, 2001, v.6, p.141-166.

44. Van de Weijer P., Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensie) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. // *Maturitas*, 2002, v.42, p.187-200.
45. Куркин, В.А. // Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. 963 с.
46. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. М, 1976, стр.31, 205 с.
47. Путьрский И.Н, Прохоров В.Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений, М, 2000г., 656 с.
48. Тютюнников Б. Н., Бухштаб З.И., Гладкий Ф. Ф. Химия жиров, 3-е изд., перераб. и доп. М. “Колос”. 1992, 448с.
49. Bates P.D., Stymne S. , Ohlrogge J. Biochemical pathways in seed oil synthesis // *Current Opinion in Plant Biology*. 2013, v. 16. p.358–364
50. Chapman K.D, Ohlrogge J.B: Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. // *J. Biol Chem* 2012, v.287 p.2288-2294.
51. Chapman K.D., Dyer J.M., Mullen R.T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. // *J. Lipid Res.* 2012, v.53, p.215-226.
52. Liu Q., Siloto R.M., Lehner R., Stone S.J., Weselake R.J. Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. // *Prog Lipid Res*. 2012, v.51 p. 350-377.
53. О’Брайен Р. Жиры и масла. Производство, состав, свойства, применение. Перевод с англ. 2-го изд. В.Д. Пирокова, Д.А.Бабейкиной, Н.С.Селивановой, Н.В.Магды. 2007, СПб, Прогресс., 752 с.
54. Evans D.M., McConnell D.G., List G.R., Scholfield C.R. Structure of unsaturated vegetable oil glycerides: Direct calculation from fatty acid composition. // *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 1959, v.46 , p.421-424.
55. Таганович А. Д. Биологическая химия Минск. БИНОМ, 2008., 688 с.

56. Муравьева Д.А. Тропические и субтропические лекарственные растения. Издание 2-е, переработанное и дополненное. М, “Медицина” 1983, 336 с.
57. Михеева С.А., Коухова И.Е. “Беленое масло” Химия и технология фитопрепаратов. 2004, Москва, “Термед” с.252.
58. Shiao Tai Yow, Shiao Ming Shi. Determination of fatty acid compositions of triacylglycerols by resolution NMR spectroscopy//Bot.Bull. Academia Sinica, 1989, v.30, p.191-199.
59. Sacchi R., Addeo F., Paolillo L. ^1H and ^{13}C NMR of Virgin Olive Oil. //Magn. Reson. Chem. 1997, v. 35, p.133–145.
60. Vlahov G. Application of NMR to the study of olive oils, // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 1999, v.35 is.4, p.341–357.
61. Скаковский Е.Д., Тычинская Л.Ю., Ламоткин С.А., Кулакова А.Н. Шпак С.И. Применение спектроскопии ЯМР для анализа растительных масел. // Структура и динамика молекулярных систем. Яльчик. Сборник статей. Часть 2. 2006. с.128-131.
62. Мнацаканян В.А. Ерибемян М.И., Ананикян В.В. ^1H -ЯМР- спектры растительных жирных масел и возможность их использования для теста подлинности. // Научно-практический журнал ФАРМА, 2012, №05, с.48-450.
63. Անանիկյան Հ.Ս., Հովհաննիսյան Գ.Պ, Մնացականյան Վ.Հ. Անթառամ կարմրավունը որպես ֆլամինի հնարավոր հումք: Հայաստանի Պետական Ճարտարագիտական Համալսարանի «Լրաբեր» գիտական հոդվածների ժողովածու, 2013թ, մաս II, էջ 663- 669,:
64. H.S. Ananikyan H.S, V.A. Mnatsakanyan V.A. Helichrysum rubicundum a raw material for the Flamin drug. Poster number 200 in conference “ArmChemFront” , Armenia, august 25-29, 2013.
65. Заболотный В.А. Емельянова В.И., Супрун О.В., Бренина Е.А, Зубченко Т.Н., Комиссаренко Е.П Способ получения фламина,. Патент Российской Федерации номер: 2071341. Оpubл. 10.01.1997.

66. Флора Армении. Т.9, Complanulaceae, Asteraceae. Под ред. Тахтаджяна А.Л.. Koeltz Scientific Books, 1995, 515с.
67. Пронченко Г.Е., Вандышев В.В.. Растения- Доноры БАД: за и против, 2013, М., ГЭОТАР-медия, 216 с.
68. Szadowska A. Pharmacology of galenic preparations and flavonoids isolated from *Helichrysum arenarium*. //Acta Polonica Pharm. 1962, v.19, p.465-479.
69. Г.С.Ананикян, С.А.Саргисян, В.А.Мнацаканян. 'Силимарин' расторопши из Арцаха. IV научная конференция Армянского химического общества (с международным участием). "Достижения и Проблемы" 7-11 октября 2014г., Ереван-Ванадзор. Материалы конференции, Армянская химическая ассоциация, Ереван, 2014, с.155.
70. Ананикян Г.С., Мнацаканян В.А., Паносян Г.А., Саргисян С.А. Флаволигнаны Расторопши Арцаха// Хим.ж.Армении. 2015, т.68, . № 1, с.51-56.
71. Чекман И.С. Горчакова Н.А., Казак Л.И. Фармакология: Учебник для студентов высших учебных заведений. Под редакцией члена-корреспондента НАН и НАМН Украины, профессора И. С. Чекмана, Винница, Нова Книга, 2013. 792 с.
72. Fructus Silybi Mariae//World Health Organization. Who monographs on selected medical plants, Geneva, 2002, v.2, p.p. 300-316.
73. Куркин В.А. Расторопша пятнистая — источник лекарственных средств.// Хим.фарм.ж., 2003, т.37, н.4, с.27.
74. Самородин А.В. Автореферат дисс. канд. с/х наук «Продуктивность расторопши пятнистой в зависимости от норм посева, способов посева и доз внесения минеральных удобрений на черноземных почвах Саратовского правобережья», Саратов, 2006, 164 с.
75. Szilagi I., Tetenyi P., Antus S., Seligmann O., Chan V.M., Seitz M., Wagner H. Struktur von Silandrin und Silymonin, zwei neuen Flavanolignanen aus

- einer weißblühenden *Silybum marianum* Varietät. //Planta med., 1981,v. 43, p. 121-127.
76. Курченко В.П., Щекотихина А.С., Стасевич О.В., Спиридович Е.В. Получение и характеристика фенилпропаноидных соединений из расторопши пятнистой и льна масличного. //Труды Белорусского государственного университета. 2010, т.5, ч. 2, с. 139-170.
77. Серeda А.В., Серeda Л.А., Билык В.В. Состав флаволигнанов коллекционных образцов расторопши // В матер. докл. Международного симпозиума. “Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты”, РАН, Москва, 2012, с.154.
78. Շաքարյան Ա.Կ., Ռևազովա Լ.Կ., Մնացականյան Վ.Յ. Արցախում աճող կաթնափուշ բժականորոշող դեղատարատու կենսական արտադրանքների և կաթնափուշի սկզբնաղբյուր // Глобус Науки, 2006, т.6, с. 58-61.
79. Чубарова А.С., Капустин М.А., Спиридович Е.В., Курченко В.П. Содержание флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой (*silybum marianum* l.) различных хеморас.// Вестник фармации, 2012, н.4, с.28.
80. Lee David Y.W., Liu Yanze. Molecular Structure and Stereochemistry of Silybin A, Silybin B, Isosilybin A, and Isosilybin B, Isolated from *Silybum marianum* (Milk Thistle)// J.Nat.Prod. 2003, v.66, № 9, p.1171-1174.
81. Сокольская Т.А. Комплексная переработка плодов расторопши пятнистой и создание на ее основе препарата “Силимар”.// Хим.фарм.ж., 2000, т.34, н.9, с.27-30.
82. Мнацаканян В.А., Ананикян Г.С., Бабаханян М.А., Оганесян Л.Э., Овсепян Г.Ю., Саргисян С.А. Сравнительное изучение содержания жирного масла и флаволигнанов в Семенах расторопши пятнистой /

- Silybum marianum* (L.) Gaertn./ почвенного и гидропонического происхождения. //Международ. журн. прикладных и фундаментальных исследований, 2015, №12, ч.8 . с. 1445-1447.
83. Shakaryan A., Mnatsakanyan V., Revazova L., Khursshudyan K. Comparative analyses of oil of Milk thistle, wich grows in Artsakh// Bulletin of Medicinal Institute after Mehrabyan, 2007, v.3, p.126-127.
84. Давтян Г.С. Справочная книга по химизации сельского хозяйства. Москва, Колос, 1980, с. 382-385.
85. Бабахаян М.А., Оганесян Л.Э. Гидропоническая фитотехнология и ее преимущества.// Материал Международной научной конференции "Наука, техника и инновационные технологии в счастливой эпохе могучего государства", (12-14.06.2012, Ашхабад).Изд.Ылым, 2012, с.135.
86. Հովհաննիսյան Լ., Հովսեփյան Հ., Բարսիսյան Ս., Նահապետյան Խ., ՉավոՆՉՅԱՆ-Պապյան Վ., Սիմոնյան Կ., Ադամյան Ծ., ՀարոՆՔՅՈՆՆՅԱՆ Ռ. *Stevia rebaudiana* Bertoni աճեցման եղանակ.Գյուղի արտոնագիր N 2779 А, գրանցված պետական գրանցամատյանով 25.11.2013, հայտի N AM20130091:.
87. Ананикян Г.С, Ананикян В.В., Ерибекян М.И., Мнацаканян В.А., Паносян Г.А.Осаин и помиферин - биологически активные вещества настойки плодов Маклюры оранжевой. //Международ. Журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015, №9, ч.4 с.673- 675.
88. Wolfrom M. L., Harris W. D., Johnson J. F., Mahan J. E., Moffet S. M. and Wildi B. Osage Orange Pigments. XI. Complete Structures of Osajin and Pomiferin //J.Am. Chem. Soc. 1946.Vol. 68.p.406-418.
89. Mahmoud Z.F. Antimicrobial Components from Maclura Fruit// Planta Medica 1981. Vol.42. p.299-301.

90. Vesela D., Kubínova R., Muselík J., Zemlicka M., Suchy V. Antioxidative and EROD activities of osajin and pomiferin. // *Fitoterapia*, 2004.v. 7, is.5, p.209–211.
91. Florian T. Necas J, Bartosikova L, Klusakova J, Suchy V, Naggara EB, Janostikova E, Bartosik T. Effects of prenylated isoflavones osajin and pomiferin in premedication on heart ischemia-perfusion. // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 2006, v.150, is.1, p.93-100.
92. Hong S. Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of *Maclura Pomifera* // *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007, v. 17, p. 4753-4755.
93. Gruber J.V., Holtz R., Sikkink S.K., Tobin D.J. In vitro and ex vivo examination of topical Pomiferin treatments. // *Fitoterapia*, 2014, v.94. p.164-171
94. Ананикян Г.С. Сравнительный анализ антирадикальной активности флавоноидных соединений соцветий бессмертника красноватого, плодов расторопши пятнистой и маклюры оранжевой. // *Хим. ж. Армении*, 2016, т.69, №1-2, с.143-150.
95. Sánchez-Moreno C., Larrauri J., Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. // *J. Sci. Food. Agric.*, 1998, v.76, is.2 p.270-276.
96. Ананикян Г.С. Целесообразность определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот в жирных маслах методом ^1H -ЯМР – спектроскопии. // *Хим. ж. Армении*, 2016, т.69, №.1-2, с.177-180
97. Назаров П.Е., Мягкова Г.И., Гроза Н.В. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы. // *Вестник МИТХТ*, 2009, т. 4, № 5, с.3- 19.
98. Connor W.E. et al. The hypotriglyceridemic effect of fish oil in adult-onset diabetes without adverse glucose control. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993. Vol. 683, p. 337–340.

99. Simopoulos A.P. The traditional diet of Greece and cancer // Eur. J. Cancer Prev. 2004. Vol. 13, № 3, p. 219–230.
100. Мнацаканян В.А., Ерибемян М.И., Ананикян В.В., Ананикян Г.С. Некоторые результаты изучения химии растительного сырья.// Сборник трудов “Некоторые успехи органической и фармацевтической химии” Выпуск 2, 2015, с.113-125.
101. Ananikyan H.S., Mnatsakanyan V.A., Avetisyan M.V. Comparative investigation of fatty oils some Fabaceae species///International Conference of Young Scientists “Chemistry Today - 2014”, Abstracts, August 18-22, 2014.- Yerevan: YCA, p.138-140.
102. Monache G.D., Scurria R., Vitali A., Botta B., Monacelli B., Pasqua Palocci C., Cernia E. Two isoflavones and a flavone from the fruits of *Maclura pomifera*. //Phytochemistry. 1994. Vol.37, №3, p.893-898.
103. Гордон А., Форд Р. Спутник химика, М, Мир, 1976, 541 с.
104. Привалов И. Аналитическая геометрия, М., Наука, 1966, 272 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение

1

1



“Утверждаю”

Директор НТЦ ОФХ НАН РА

Топузян В.О.

“03” май 2016г.

АКТ

Морфофункциональное состояние печеночной ткани при наличии экспериментального цирроза и на фоне лечения препаратом растительного происхождения - ФЛАМИНОМ.

В соответствии с задачами эксперимента биопсионные материалы были взяты у следующих групп.

1. интактная группа
2. группа получавшая CCl_4 -экспериментальный цирроз печени (контрольная группа).
3. группа получавшая CCl_4 с веществом растительного происхождения – Фламина.

После вскрытия и визуального обзора внутренних органов, биопсионный материал взятый из печени фиксировали в спирте и формалине для проведения дальнейших гистологических исследований.

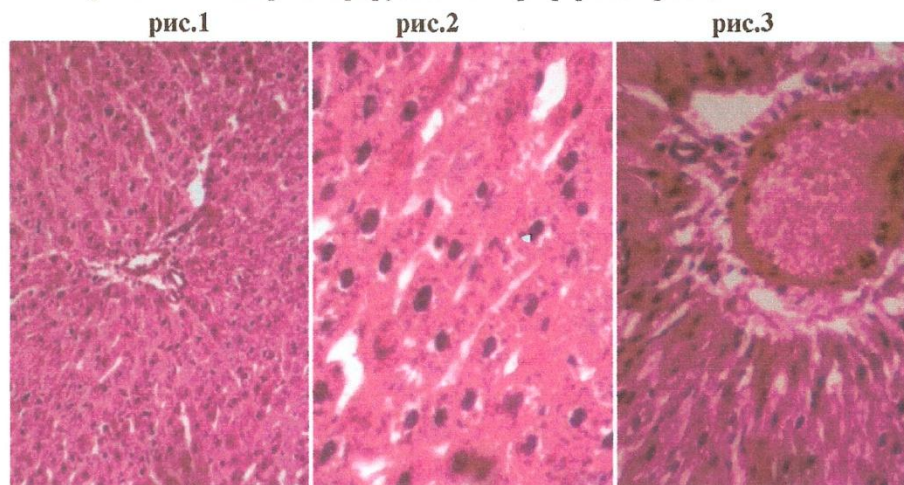
Для оценки общеморфологических изменений печеночной ткани, полученные санномикротомные срезы окрашивали гематоксиллином – эозином [1].

Гистоморфологические исследования печени проведены с помощью микроскопа фирмы "JENEVAL", который оснастили цифровым фотоаппаратом CANON 400 D соединенным с микроскопом и компьютером системой адаптеров той же фирмы.

Выбор четыреххлористого углерода (CCl_4) в качестве агента, действующего на печень, объясняется тем фактом, что это вещество является прямым печеночным ядом, широко используемым в экспериментальной медицине и биологии [2]. Выбор продолжительности токсического и гепатопротективного воздействия определяется тем, что применение четыреххлористого углерода по данной схеме обеспечивает возникновение и развитие обратимых изменений в печени на тканевом и органном уровне [3].

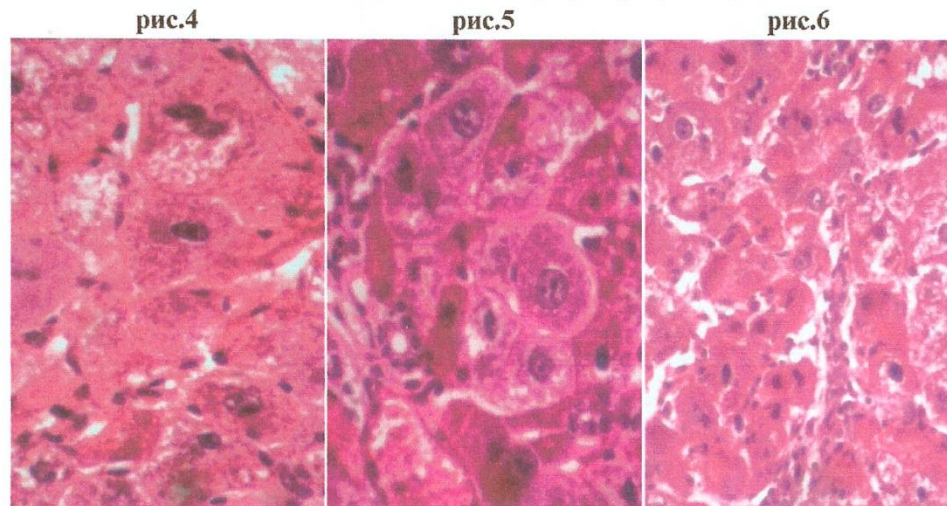
1. Семченко В.В., Баришников С.А., Ноздрин В.И., Артемьев В.Н. – Гистологическая техника. Омск. 2006, 279 стр.
2. Подымова С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей / Д.С. Подымова. – М.: Медицина, 1993. – 544 с.
3. Калинская Н.С. Особенности физиологической и репаративной регенерации печени крыс в репродуктивном периоде онтогенеза под влиянием биопрепаратов на основе Каллизии душистой. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Н.С. Калинская. – Ставрополь, 2009. – 22 с.

Макроскопические (визуальные) исследования печени выявили, что по сравнению с интактными животными печень у 2-ой группы (CCl_4) увеличена, на ощупь рыхлая, поверхность зернистая и неоднородная, печень имеет бледноватый цвет. На фоне влияния Фламина макроскопически печень почти не отличается от печени интактной группы, хотя аналогичная картина местами регистрируется по перифериям органа.



Печень интакт. группы. Окраска гематоксилин- эозин. ок.10, об.12,5,25.

При гистологическом исследовании паренхимы печени у крыс отмечается четко выраженная дискомплексация печеночных балок. Гепатоциты набухшие, границы клеток не четкие, ядра также набухшие, светлые, контуры неотмечаются (рисунки 5,6). Отдельные гепатоциты в состоянии зернистой дистрофии (рисунки 4).



Печень (CCl_4), окр. гем.- эозин. Ок. 10, об.40,40,25

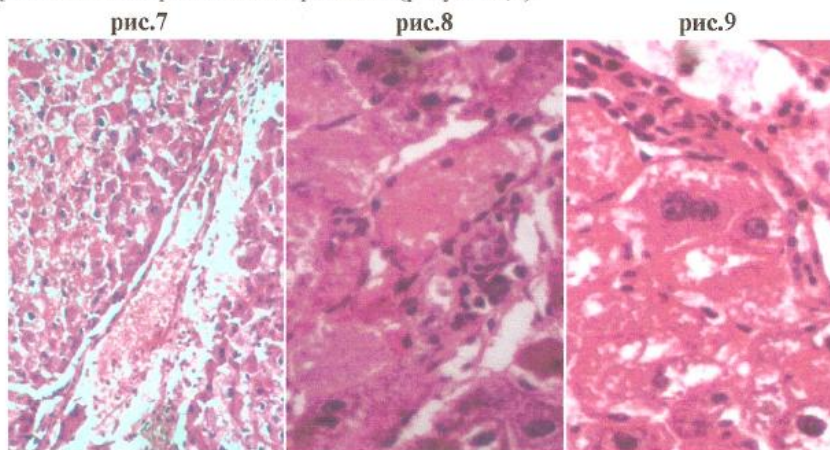
Сосуды печени в различных участках среза неравномерно расширены и кровенаполнены (рисунки 4), в области триады периваскулярно — очаги

лимфогистиоцитарных инфильтраций. Часто встречаются группы гепатоцитов, окруженные фиброзными элементами (рисунк6).

Балочное строение нарушено, встречаются участки жировых дистрофий и некроза гепатоцитов. Иногда вокруг некротизированных гепатоцитов располагаются небольшое количество клеточных элементов, которые по всей вероятности являются сегментоядерные лейкоциты. Местами обнаруживаются узкие прослойки соединительной ткани.

В центральной части долек выявляются многочисленные гепатоциты окруженные участками фиброза, где формируются псевдодоли с нарушением балочной структуры органа. В паренхиме органа наблюдается очаги эозино-клеточных гранулем/8/. Часто встречаются тельца Каунсильмена/8/, которые свидетельствуют о апоптических процессах, происходящих в гепатоцитах. Ядра гепатоцитов в основном гипертрофированы, иногда в печеночной ткани этой группы встречаются двухядерные гепатоциты с фигурами митозов (рисунк5,9).

По всей поверхности среза в паренхиме печеночных тканей белых крыс получавших четыреххлористый углерод (CCl_4) встречаются различные очаги деструктивных, дистрофических и некротических процессов (рисунк7,9).



Печень (CCl_4), окр. гем.-эозин. Ок. 10, об. 25,40,40

Обнаруженные изменения свидетельствуют о развитии у животных типичных токсических процессов печени, что в свою очередь свидетельствует о возникновении цирроза печени этой группы.

Указанные гистопатологические отклонения печени белых крыс заметно уменьшаются на фоне влияния растительного препарата Фламина.

По сравнению с предыдущей группой (CCl_4), под влиянием фламина в печеночной ткани белых крыс гистологическая картина сравнительно нормализуется.

В большинстве, структура печеночной ткани сохранена. По сравнению с контролем в гистоструктуре печени деструктивные и дистрофические процессы заметно уменьшаются.

Псевдодольки почти не выявляются. Балочная структура органа в основном сохранена. В периферических и центральных областях органа сравнительно уменьшаются количества кариолизисов и кариопикнозов гепатоцитов, а также очаги инфильтративных процессов лимфоидного характера (рисунки 10, 11).

Но вместе с тем под влиянием Фламина наблюдаются процессы кариорексиса и плазмолизиса, но по количеству и качеству они намного уступают показателям контрольной группы (рисунок 12).

рис.7

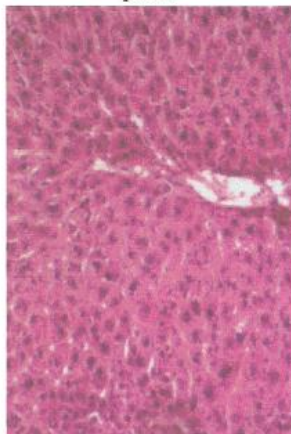


рис.8

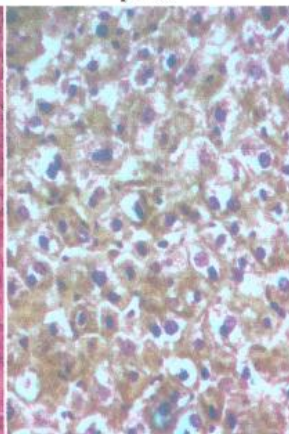
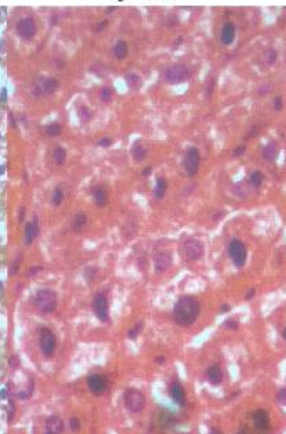


рис.9



Печень (фламин), окр. гем.-эозин. Ок. 10, об. 40, 40, 25

Таким образом полученные гистологические данные позволяют нам судить, что под действием растительного препарата Фламина происходит сравнительная нормализация гистоструктуры гепатоцитов ткани печени, что позволяет нам судить о гепатопротекторной активности апробируемого соединения.

Заведующий лабораторией
фармакологии и патогистологии
НТЦ ОФХ НАН РА к.б.н.

Г.В. Гаспарян

М.н.с. лабораторией
фармакологии и патогистологии
НТЦ ОФХ НАН РА

С.А. Булоян

Подписи подтверждаю
науч. секретарь
НТЦ ОФХ НАН РА д.х.н.

А.Х. Гюльназарян



ԱԿՏ

Միլիմարին- ֆլամին խառնուրդի լյարդապաշտպանիչ հատկությունների ուսումնասիրումը տոքսիկ ցիտոգի պայմաններում

Հետազոտությունները կատարվել են 120-140 գ. լյարդատու ոչ զծային սպիտակ առնետների վրա: Փորձարարական կենդանիների հետ վարվելու ձևերը համապատասխանել են Եվրոխորհրդի կողմից հաստատված Directive 2001/20/EC պահանջներին:

Պատրաստվել է բույսերից անջատված սիլիմարին-ֆլամին խառնուրդը, որը լուծվել է ձիթայուղում: Կենդանիները խառնուրդը ստացել են 300 մգ/կգ դոզաչափով: Միլիմարին-ֆլամին խառնուրդին զուգահեռ առնետներին տրվել է բժշկության մեջ ընդունված հայտնի հակացիտոտիկ Ուրդոքսա դեղամիջոցը՝ համեմատելու համար էքստրակտի թերապևտիկ հատկությունները: Դեղանյութը նույնպես լուծվել է ձիթայուղի մեջ և կենդանիներին տրվել է 90մգ/կգ դոզաչափով [1]:

Լյարդի ցիտոգի մոդելները առաջացվել են CCl₄-ի 10%-անոց լուծույթի ներդրովայնային ներակումներով (1մլ/կգ քաշով, շաբաթը 3 անգամ, 12 շաբաթ տևողությամբ) [2]:

Փորձարարական կենդանիները բաժանվել են 4 խմբերի, յուրաքանչյուր խումբ պարունակել է 10 կենդանի:

Ստուգիչ	Խումբ 1	Բնական կենդանիներ
	Խումբ 2	Թունավորում CCl ₄ -ով 12 շաբաթ տևողությամբ, հերձում 8 շաբաթյա վերականգնողական շրջանից հետո
Թերապիա	Խումբ 3	CCl ₄ -ով 12 շաբաթ թունավորելուց հետո բուժում ուրդոքսայով (8 շաբաթ)
	Խումբ 4	CCl ₄ -ով 12 շաբաթ թունավորելուց հետո բուժում Միլիմարին-ֆլամինով (8 շաբաթ)

Փորձերի ավարտից հետո կենդանիները էֆտանագիայի են ենթարկվել նեմբուտալային նարկոզի օգնությամբ (40 մգ/կգ դոզաչափով) և հերձվել են: Ներքին օրգանների մակրոսկոպիական ուսումնասիրություններից հետո, անջատվել են բոլոր կենդանիների լյարդային հյուսվածքները և կշռվել:

Հյուսվածքաբանական հետազոտությունների համար կենդանիներից վերցվել են լյարդի բիոպսիոն նմուշներ և համապատասխան մշակումից հետո ներկվել են հեմատոքսիլին եոզինով՝ ըստ վան Գիզոնի [3]: Հիստոլոգիական ուսումնասիրությունները իրականացվել են GENEVAL լույսային ժամանակակից մանրադիտակի միջոցով, որը միացված է համակարգչին:

Նմանատիպ պայմաններում ուսումնասիրվել են նաև կենդանիների ոսկրածուծից վերցրված ցողունային բջիջները ֆունկցիոնալ վիճակը: ԳԳՄ պայմանավորված գաղութների ներկումը կատարվել է Գիմզայի եղանակով՝ նախ 30 ր-ի ընթացքում ֆիքսվել է 5% ֆորմալինի օգնությամբ, ապա ներկվել 5 ր: Հաշվարկը կատարվել է MBI -6 մանրադիտակի օգնությամբ [5]:

Իրականացվել է նաև լյարդի հեպատոցիտների ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանի ուսումնասիրություններ: Այդ նպատակով կենդանիների հեպատոցիտներից ԴՆԹ-ն էքսրակցելու համար օգտագործվել է UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MoBio) ռեագենտը, որը թույլ է տալիս փոքր քանակությամբ կենսաբանական նմուշներից անջատել ԴՆԹ-ն (1-25 մգ հյուսվածք կամ մինչև 5×10^6 բջիջ): Բջիջների տարալուծման համար թարմ կամ սառեցված նմուշները հոմոգենիզացվել են “bead beating technology” համակարգով, իսկ ԴՆԹ-ի անջատումը իրականացվել է ռեագենտով նշված համապատասխան մեթոդով [6]:

ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանի որոշումը իրականացվել է ELISA իմունֆերմենտային անալիզի մեթոդով՝ օգտագործելով սպիտակուցային մեթիլ-կապող դոմեններ և մեթիլացված ԴՆԹ-ի հակամարմիններ [7]:

1. S. Saksena, R.K. Tandon “Ursodeoxycholic acid in treatment of liver diseases” Postgrad Med J. Feb 1997; 73(856): 75–80.
2. Gi-Ppeum Lee, Won-Il Jeong, Da-Hee Jong, Sun-Hee Do, Tae-Hwan Kim and Kyu-shik Jeong, “Diagnostic evaluation of carbon tetrachloride-induced rat hepatic cirrhosis model” Anticancer Research 25, p. 1029-1038, (2005).
3. Меркулов Г.А., 1969, 406 стр.
4. Botz-Nitulescu G., Wiltshcke C., Holzinger C., Fellingner A., Scheiner O., Gessi A., Forstner O. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. Journal of Leukocyte Biology. 1987; 41:83-91.
5. Khoruzhenko A. I. Optimization of tumor cell culture conditions in soft agar for subsequent immunohistochemical analysis. Biopolymers and Cell. 2012;28: 302–305.
6. <http://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12334-S.pdf>
7. <https://www.thermofisher.com/am/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/general-elisa-protocol.html>

Հյուսվածքաբանական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ կենդանիների ինտակտ խմբում լյարդի հիստոստրուկտուրան գտնվում է նորմալ վիճակում, նկատելի պաթոլոգիական պրոցեսներ չեն նկատվում:

Հեպատոցիտները ունեն սյունաձև դասավորվածություն: Պիկնոզի և նեկրոզի ենթարկված բջիջները բացակայում են: Բլթակները ունեն նորմալ կառուցվածք, շարակցական հյուսվածքի գերաճ չի նկատվում (նկ. 1a):

CCl₄-ով թունավորված կենդանիների խմբի լյարդի պարենխիմայում նկատվում են լավ արտահայտված պաթոլոգիական փոփոխություններ, որոնք բնորոշ են ցիռոզին: Առկա են բորբոքային ինֆիլտրատներ, որոնք ընդգրկում են ինչպես լյարդի տրիադաների շրջակայքի հարանոթային տեղամասերը, այնպես էլ ամբողջ պարենխիման: Ակտիվորեն ձևավորվել են պսևդոլոբուլներ և հաստ ֆիբրինային խրճեր, ինչը վկայում է շարակցական հյուսվածքի գերաճի մասին:

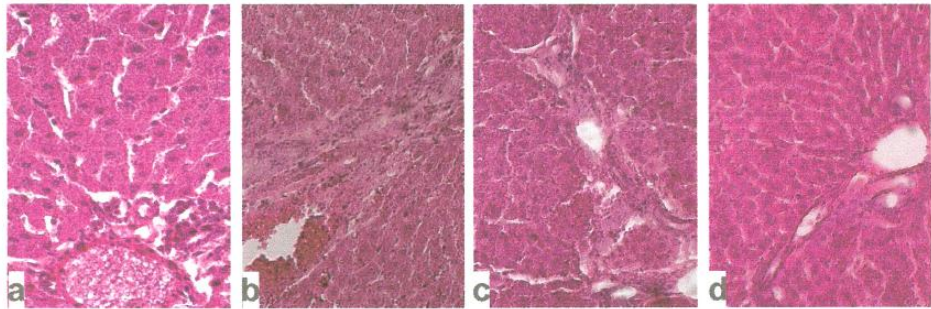
Լյարդի պարենխիմայում առկա են նեկրոզի ենթարկված հեպատոցիտներ՝ պիկնոզի և կարիոլիզիսի ենթարկված կորիզներով: Լեղածորանների դեստրուկցիայի հետևանքով նկատվում է պարենխիմայի անբողջ հատույթում լեղու պիգմենտների առկայություն (նկ. 1b):

CCl₄-ով թունավորելուց հետո ութ շաբաթ «Ուրդոքսայով» բուժված կենդանիների խմբի լյարդում հայտնաբերվել են օջախային նեկրոզներ և հարանոթային ինֆիլտրացիա լյարդի տրիադաների շրջակայքում: Առկա են ստազավորված երակներ: Լյարդը ենթարկվել է լավ արտահայտված ճարպային դիստրոֆիայի:

Հեպատոցիտներում նկատվում են լիպիդների կուտակումներ, կարիոլիզիսի և կարիոպիկնոզի պրոցեսներ, նախանշվում է ֆիբրոզ խրճերի և պսևդոլոբուլների ձևավորումը: Պետք է նշել, որ այս խմբի կենդանիների մոտ լյարդի պարենխիմայում դեստրուկտիվ և դիստրոֆիկ պրոցեսները որոշ չափով զիջում են CCl₄-ով թունավորված կենդանիների լյարդի փոփոխություններին (նկ. 1c):

CCl₄-ով թունավորելուց հետո Սիլիմարին-Ֆլամին խառնուրդով բուժված կենդանիների խմբում լյարդի տրիադաները պաշտպանել են իրենց բնորոշ կառուցվածքը և ֆիբրոզի երևույթներ չեն դիտարկվում: Որոշ հատվածներում նկատվում են թույլ արտահայտված ինֆիլտրացիոն օջախներ և ստազավորված անոթներ:

Թեև հեպատոցիտների ցիտոպլազմայում նկատվում են չափավոր ճարպային դիստրոֆիայի երևույթներ մանր կաթիլների տեսքով, սակայն հեպատոցիտները պահպանել են իրենց ամբողջական կառուցվածքը: Հեպատոցիտներում բացակայում են պիկնոտիկ պրոցեսները: Պահպանվում է լյարդի սյունաձև կառուցվածքը (նկ. 1d):



Նկար 1. Լյարդի միկրոսկոպիկ նկար: a) Ինտակտ b) Թունավորում CCl₄-ով
c) բուժում «Ուրոքսալով» d) բուժում Սիլիմարին-Ֆլամին խառնուրդով
օկ. 10 օք. 25

Ցողունային բջիջների կոնավորման հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ բնային բջիջների պրոլիֆերացիոն հատկությունները ստուգիչ կենդանիների խմբում (խ.2) CCl₄-ով թունավորման հետևանքով նվազել են՝ համեմատած ինտակտ կենդանիների ցուցանիշների: Կենդանիների այն խումբը, որտեղ, որպես բուժում ստացել են պրակտիկայում կիրառվող ուրոքսա հայտնի դեղամիջոցը (խ.3), գաղութների ձևավորման միավորի ցուցանիշը (ԳՁՄ) ցածր է համեմատած ինտակտ խմբի ցուցանիշների (խ.1.), սակայն գերազանցում է ստուգիչ խմբի կենդանիների տվյալներին (խ.2): Իսկ այն խումբը, որը CCl₄-թունավորումից հետո ստացել է Սիլիմարին-Ֆլամինի խառնուրդ (խ.4) (աղյուսակ 2)՝ ԳՁՄ-ի ցուցանիշները գերազանցում են նորմային, ինչը հաստատում է նրանց հակաօքսիդանտային բարձր ակտիվության և պրոլիֆերացիայի բարձր աստիճանի առկայության մասին (Գրաֆիկ 1):

ԽՍԲԵՐ	ԳՁՄ-ի ՀԱՇՎԱՐԿ 10 ⁵ ԲՁԻՋՆԵՐ
1. Ինտակտ	274.7 ± 33.2
2. Ստուգիչ CCl ₄ 12շաբաթ + 8շաբաթ	205.6 ± 20.6
3. CCl ₄ 12շաբաթ + 8շաբաթ Ուրոքսա	250.9 ± 14.4
4. CCl ₄ 12շաբաթ + 8շաբաթ սիլիմարին ֆլամին	301.1 ± 19.3

Աղյուսակ 2. Գաղութների ձևավորման միավոր (ԳՁՄ)

Հեպատոցիտների ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանի ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ ստացված փորձարարական տվյալները վիճակագրորեն չեն ցուցաբերել նշանակալի փոփոխություններ, ինչպես ցիռոզի, այնպես էլ օգտագործած թերապևտիկ դեղանյութերի կիրառման ժամանակ: Չնայած որ, համեմատած ինտակտ խմբի կենդանիների հետ, 12 շաբաթ CCl4-ով թունավորելուց և 8 շաբաթյա վերականգնումից հետո տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանի նվազում: Դա վկայում լրարդում պաթոլոգիկ պրոցեսների առաջացման մասին (աղյուս. 2):

Փորձարարական կենդանիների հետ համեմատած՝ հեպատոցիտների ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանի ցուցանիշները աննշան բարձրանում են ուրոդոքսայի և ֆլամին-սիլիմարինի կիրառման ժամանակ (խ.3, խ.4): Կարելի է ենթադրել, որ այդ տարբերությունները պայմանավորված են տվյալ նյութերի լրարդապաշտպանիչ և հակաօքսիդիչ հատկություններով, որոնք կարող են կանխարգելել հեպատոցիտների ԴՆԹ-ի կառուցվածքային վնասվածքները (գրաֆիկ 2):



Գրաֆիկ 2: Մեթիլացման աստիճանի փոփոխությունները փորձարարական ցիռոզի պայմաններում :

Եզրակացություն

Այսպիսով ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ սիլիմարին-ֆլամին խառնուրդը ցուցաբերում է ցայտուն արտահայտված լյարդապաշտպանիչ և հակաօքսիդանտային ակտիվություններ՝ տոքսիկ ցիտոզի պայմաններում:

Հիմնականում վերականգնելով լյարդի հիստոստրուկտուրան, սիլիմարին-ֆլամին խառնուրդի ազդեցության պայմաններում ակտիվանում են ցողունային բջիջների պրոլիֆերացիոն պրոցեսները, ինչի արդյունքում համեմատաբար կարգավորվում է ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանը փորձարարական ցիտոզի պայմաններում:

Կարելի է ենթադրել, որ նշված խառնուրդի հետագա ուսումնասիրությունները թույլ կտան նրանց ներդնել բժշկական պրակտիկա, որպես նոր դեղամիջոց՝ լյարդի ցեոզի բուժման համար:

ՀՀ ԳԱԱ ՕՐԲԳՏԿ

Ֆարմակոլոգիայի և պաթոհիստոլոգիայի
լաբորատորիայի վարիչ, կ.գ.թ.

Հ.Վ. Գասպարյան

ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի ինստիտուտի
ադենիլային միացությունների
լաբորատորիայի ա.գ.ա, ա.գ.թ.,

Հ.Ա. Հարությունյան

ՀՀ ԳԱԱ ՕՐԲԳՏԿ

Ֆարմակոլոգիայի և պաթոհիստոլոգիայի
լաբորատորիայի կ.գ.ա

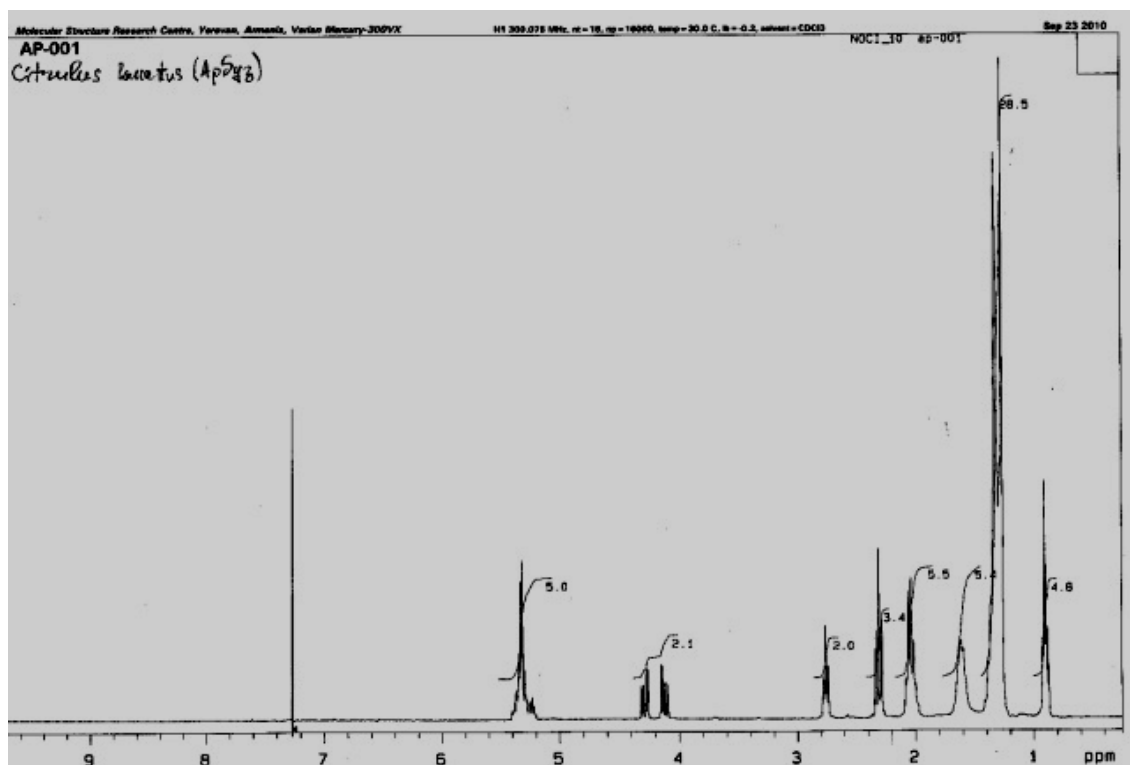
Ս.Ա. Բուլյան

Ստորագրությունները հաստատում եմ

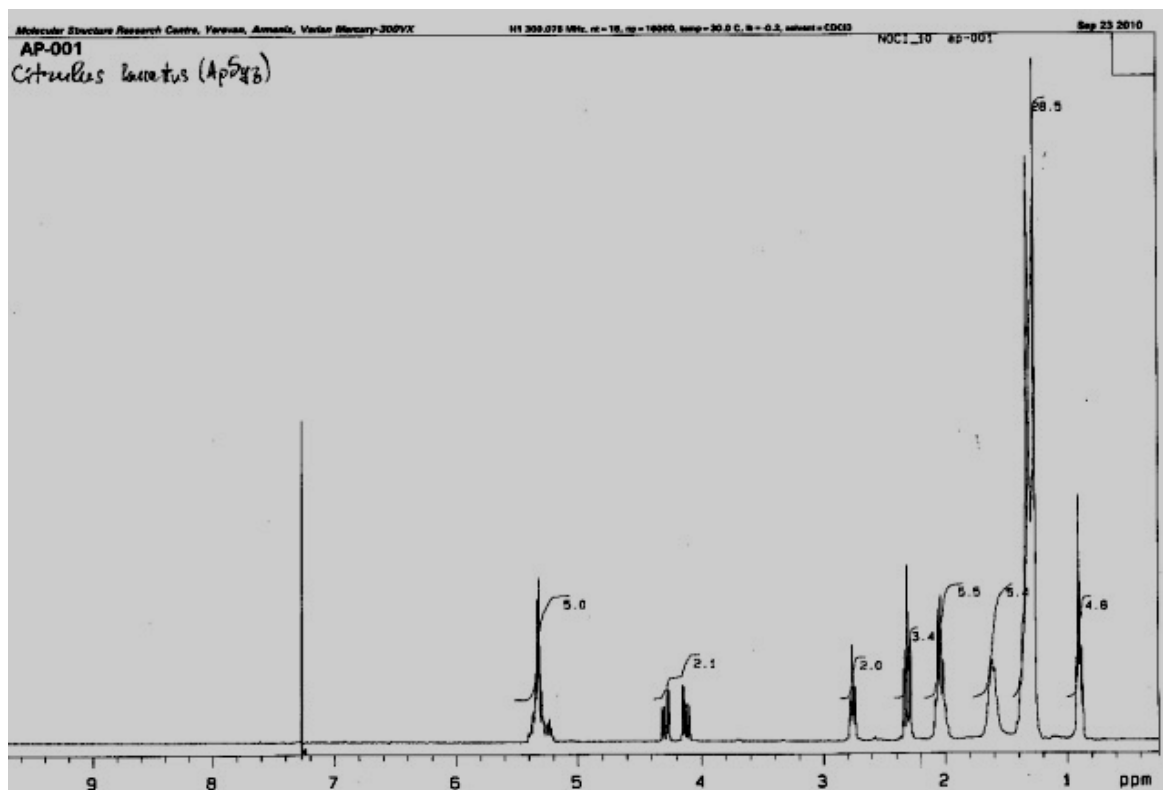
ՀՀ ԳԱԱ ՕՐԲԳՏԿ գլխ. քարտուղար, ք.դ.թ.

Ա.Ն. Գյուլնազարյան

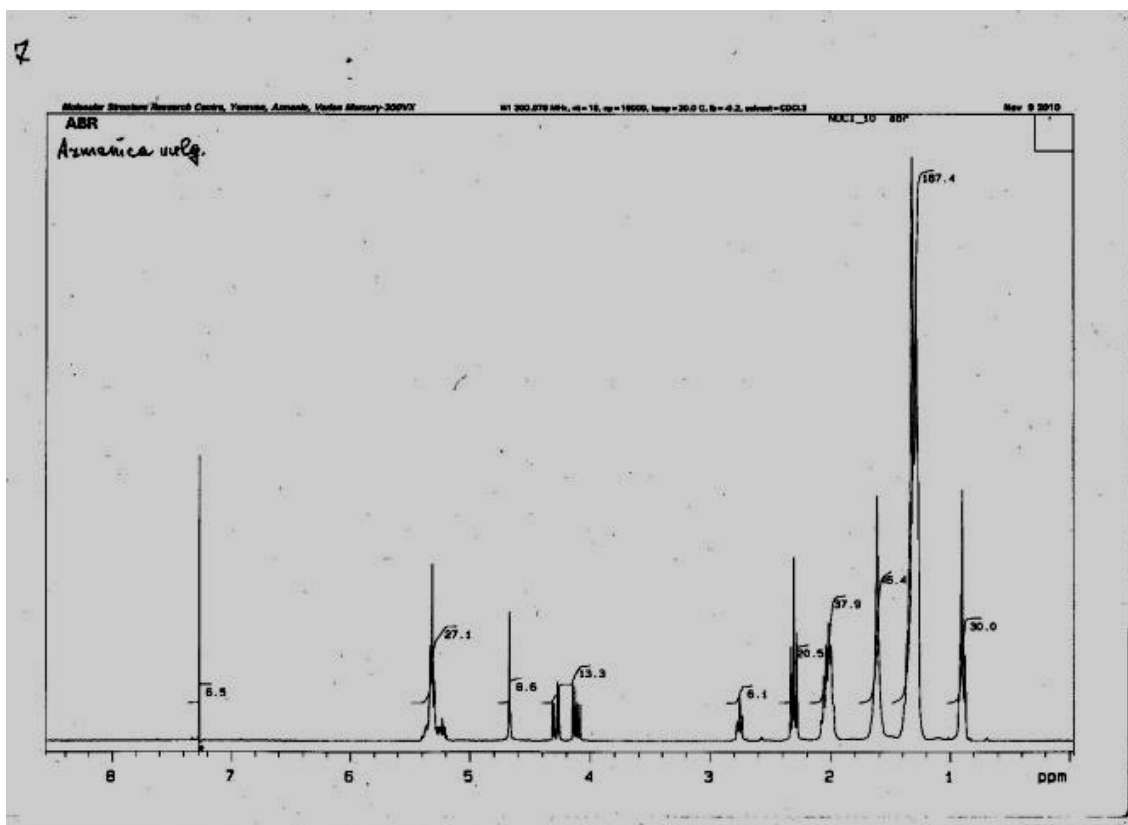
Приложение 2. ^1H -ЯМР –спектры жирных масел семян и плодов 38 растений



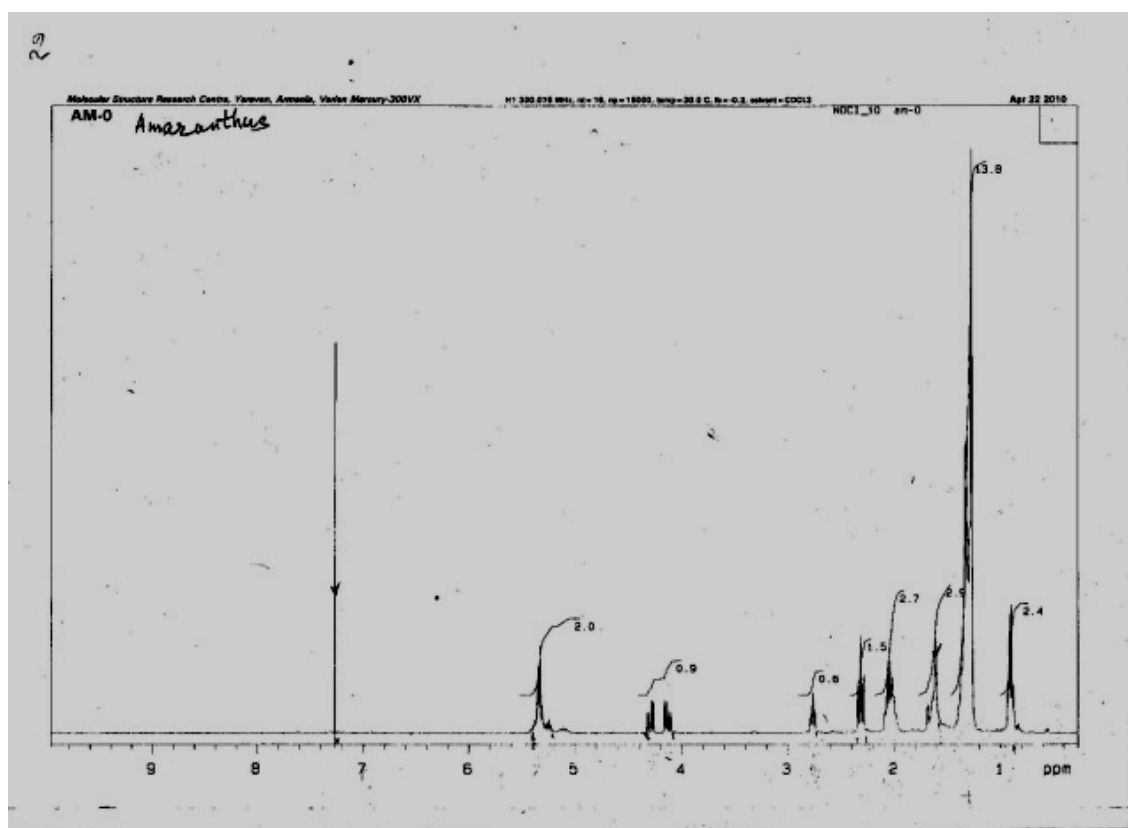
Арбуза



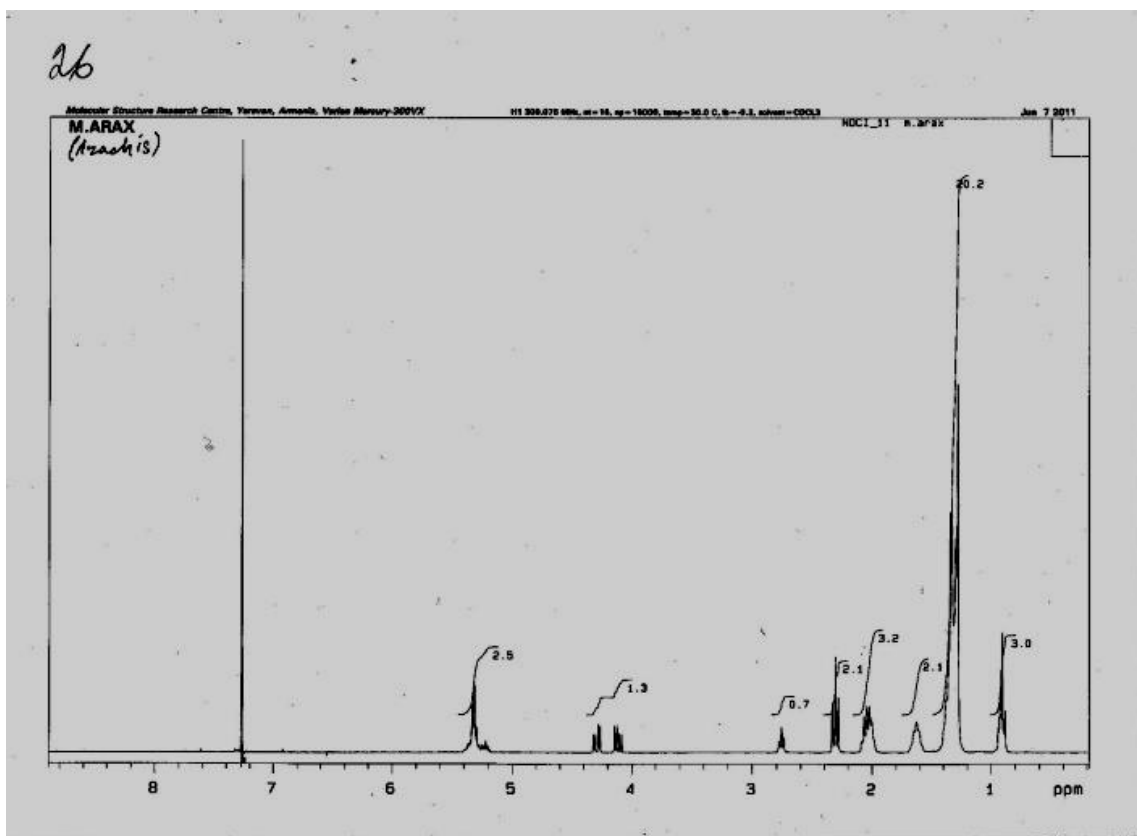
Тыквы



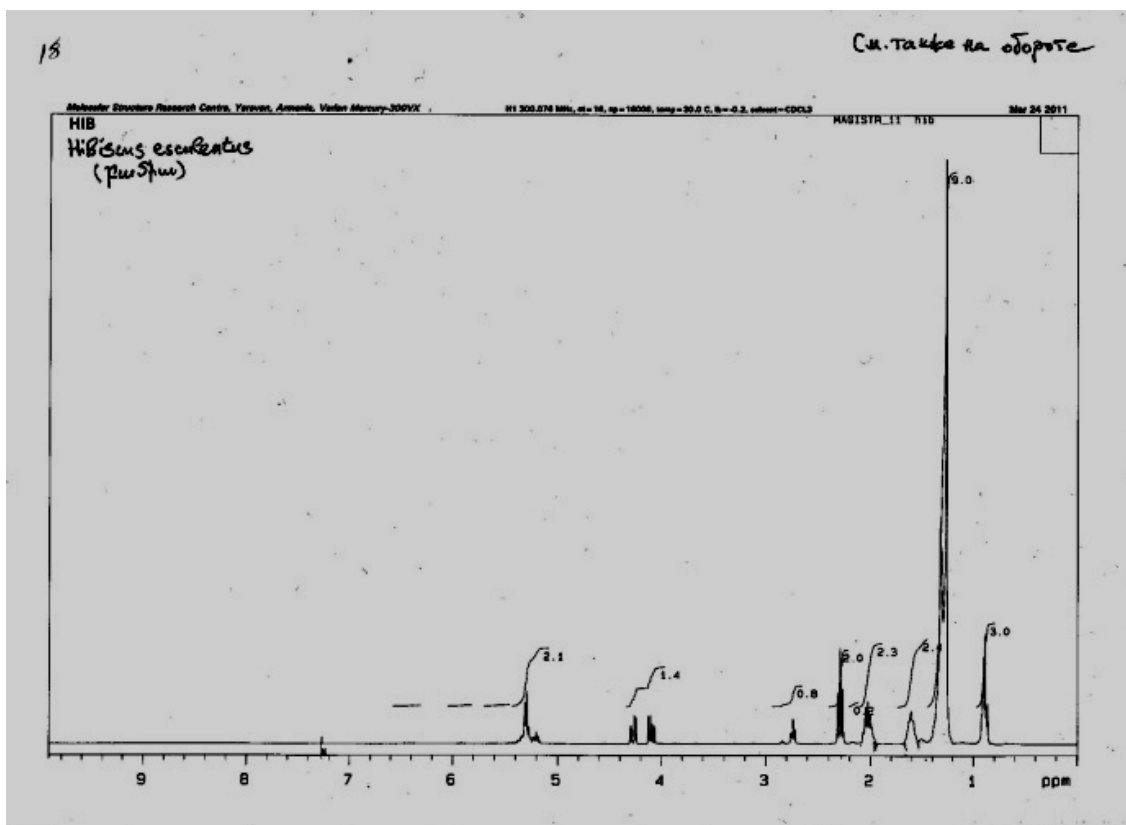
Абрикоса



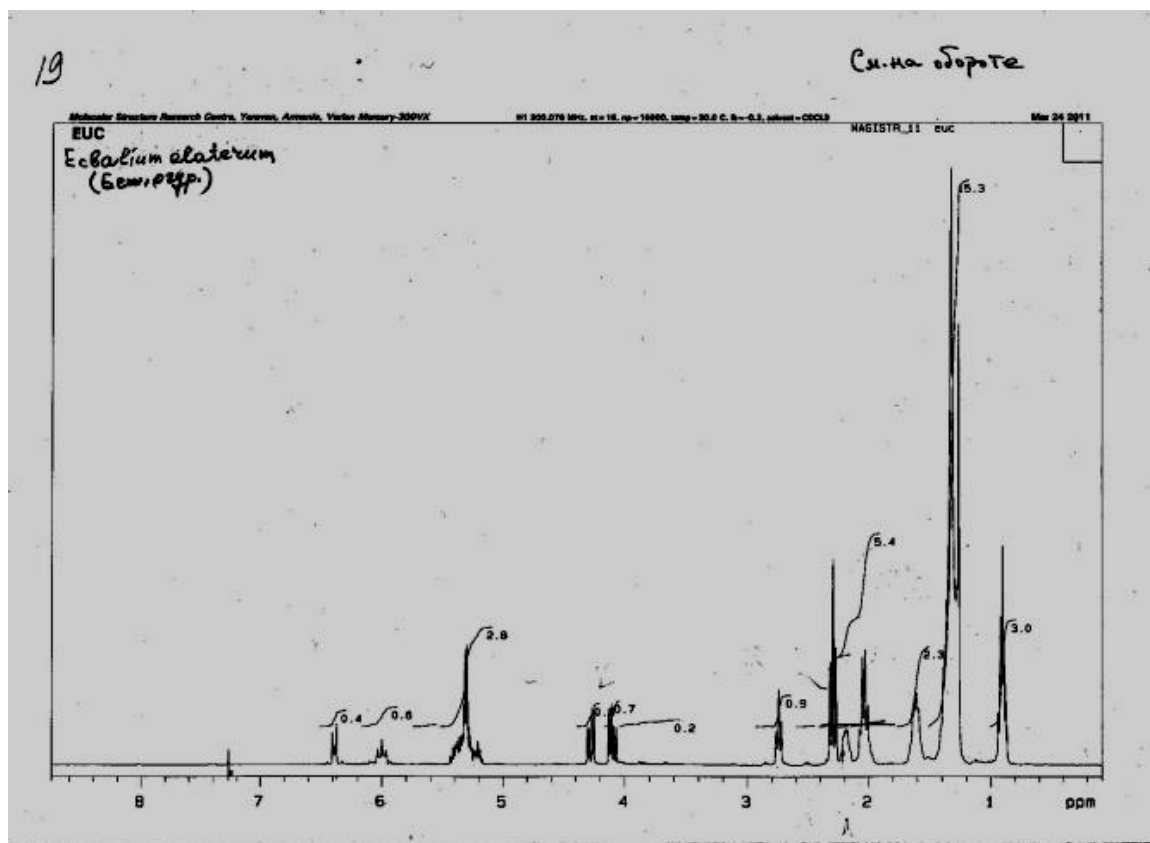
Амаранта



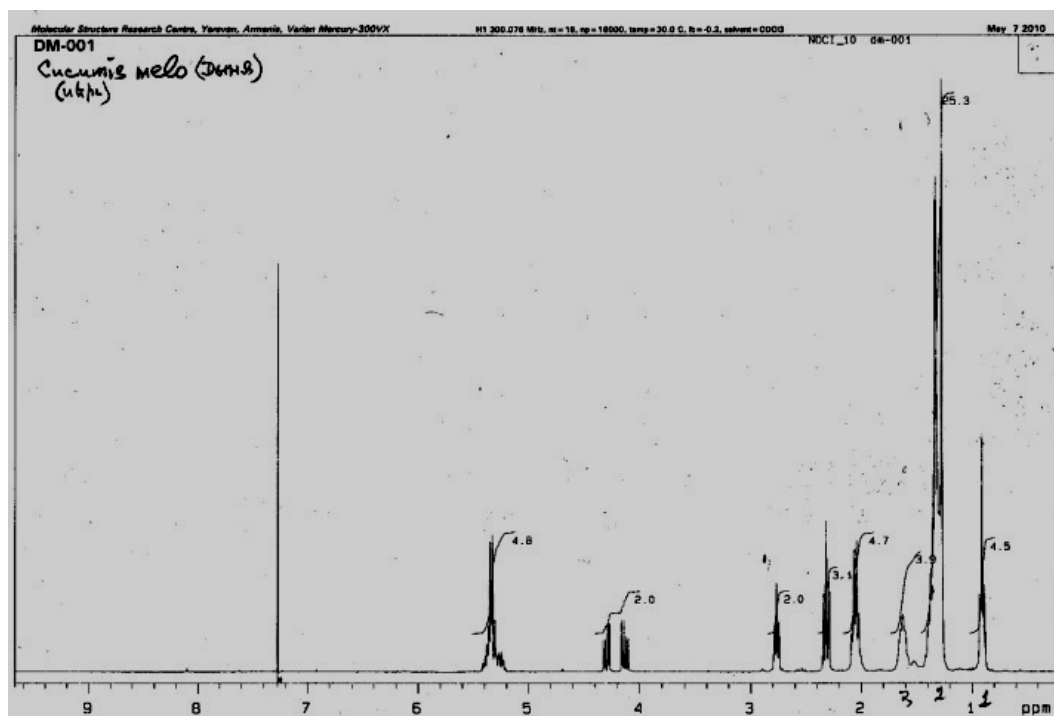
Арахиса



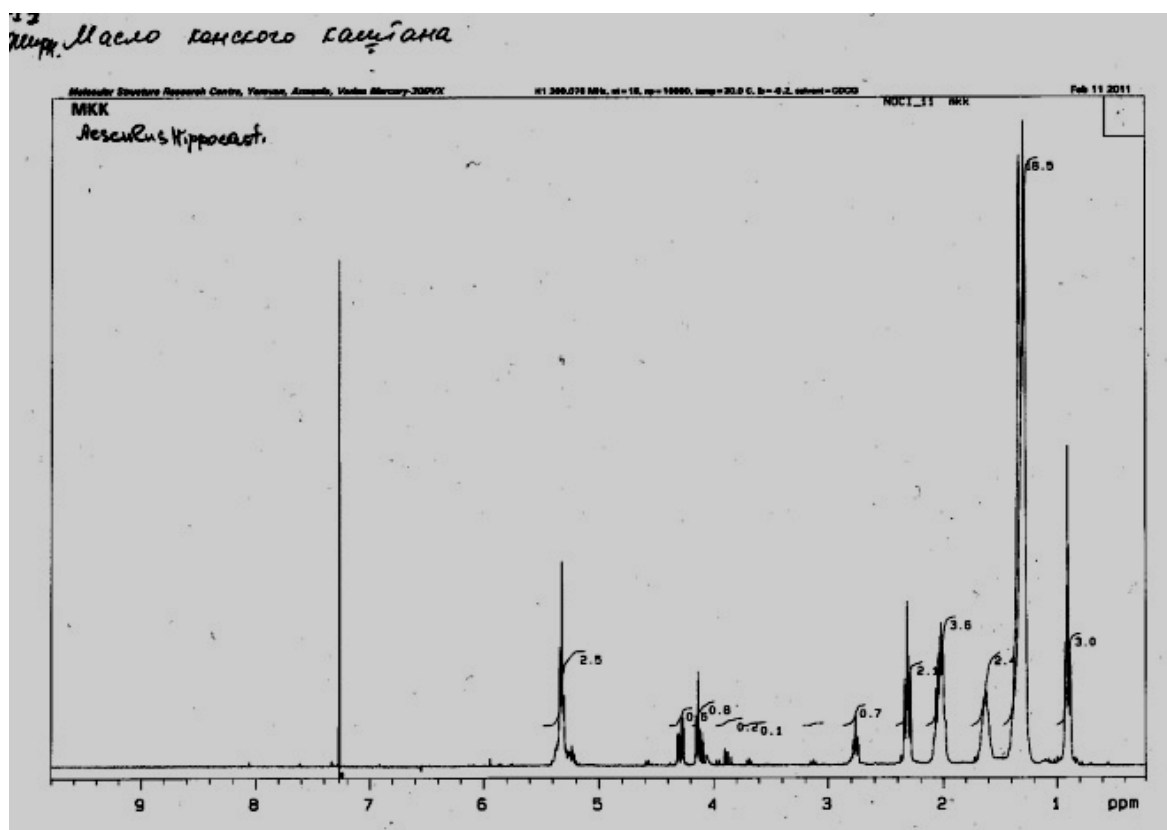
Бамии



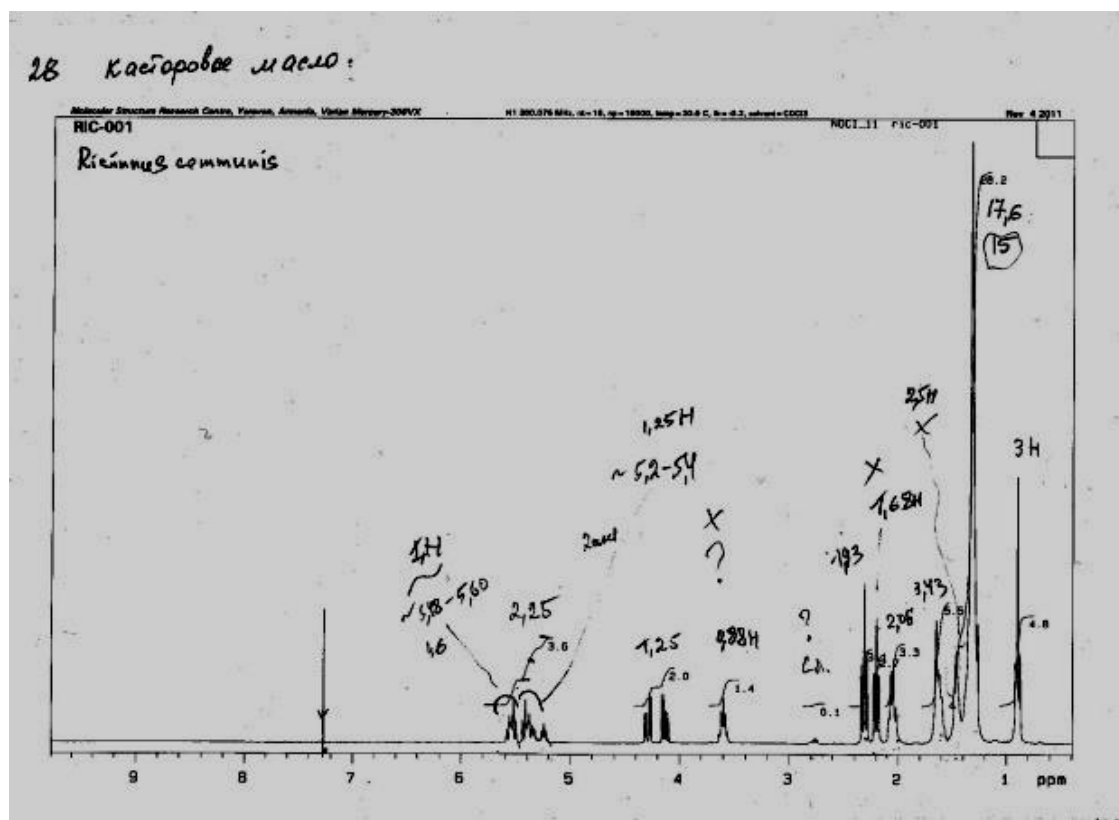
Бешеного огурца



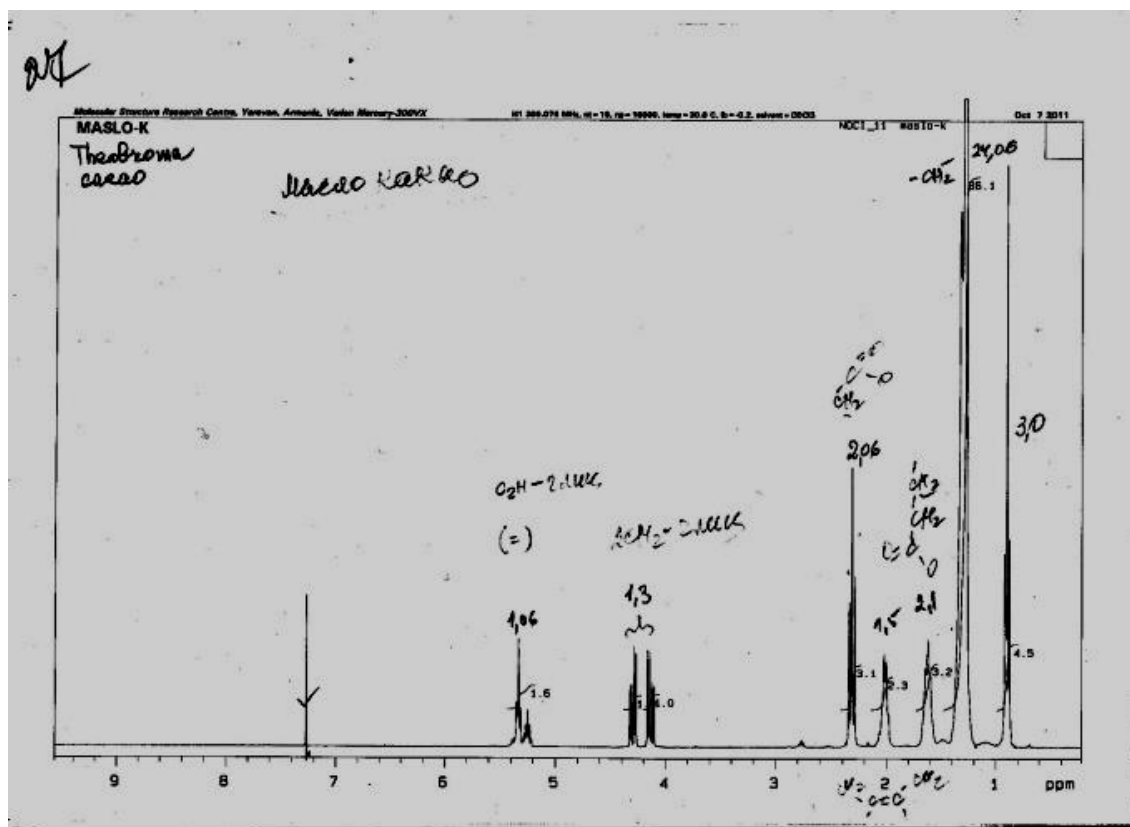
Дыни



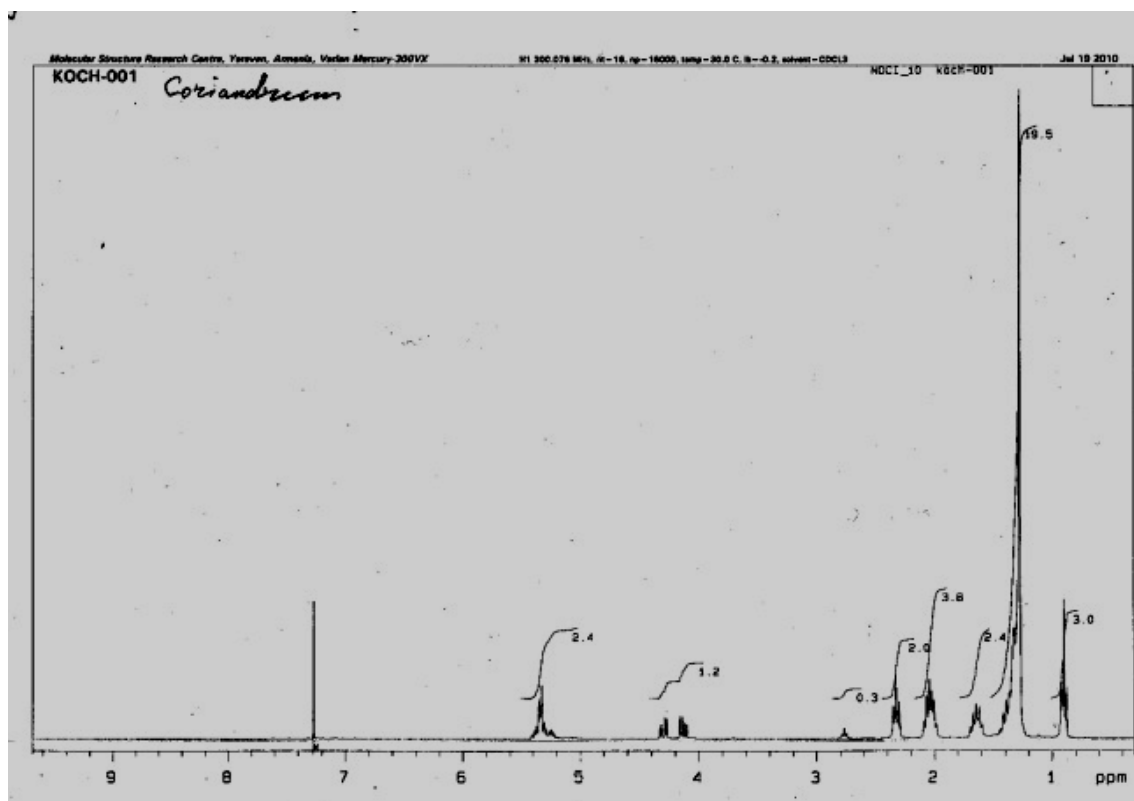
Каштана конского



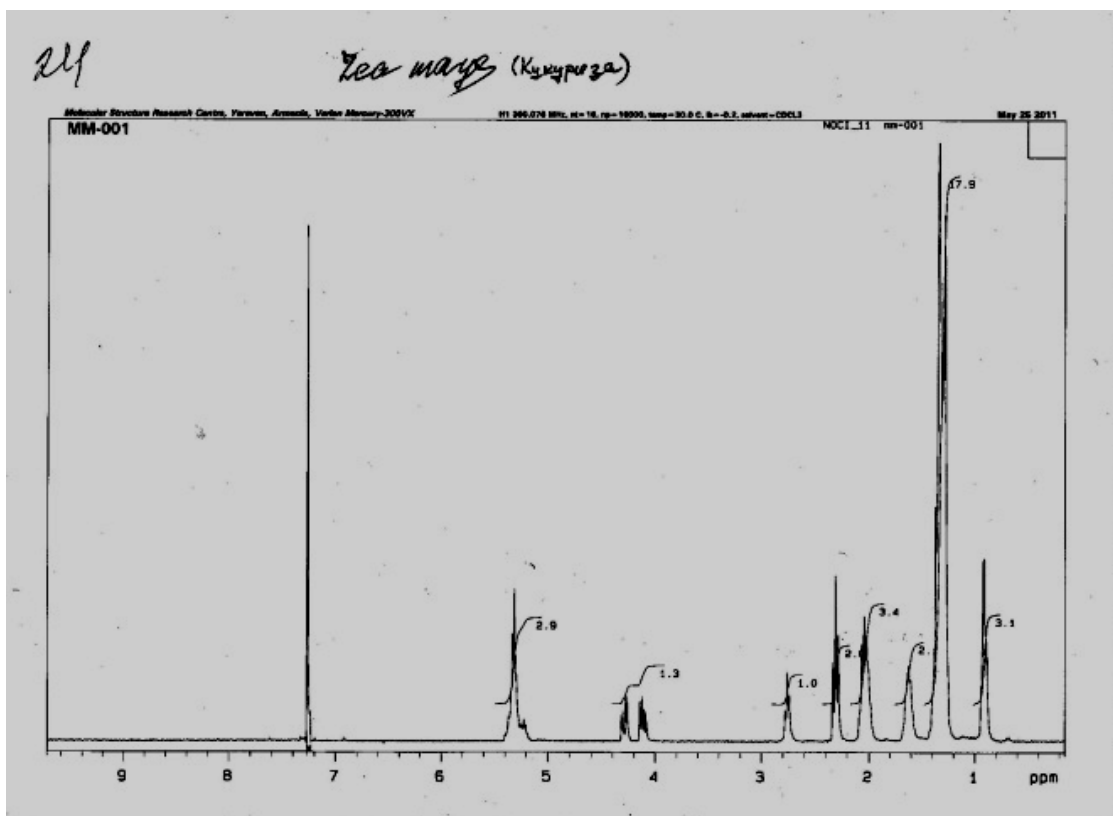
Клещевины



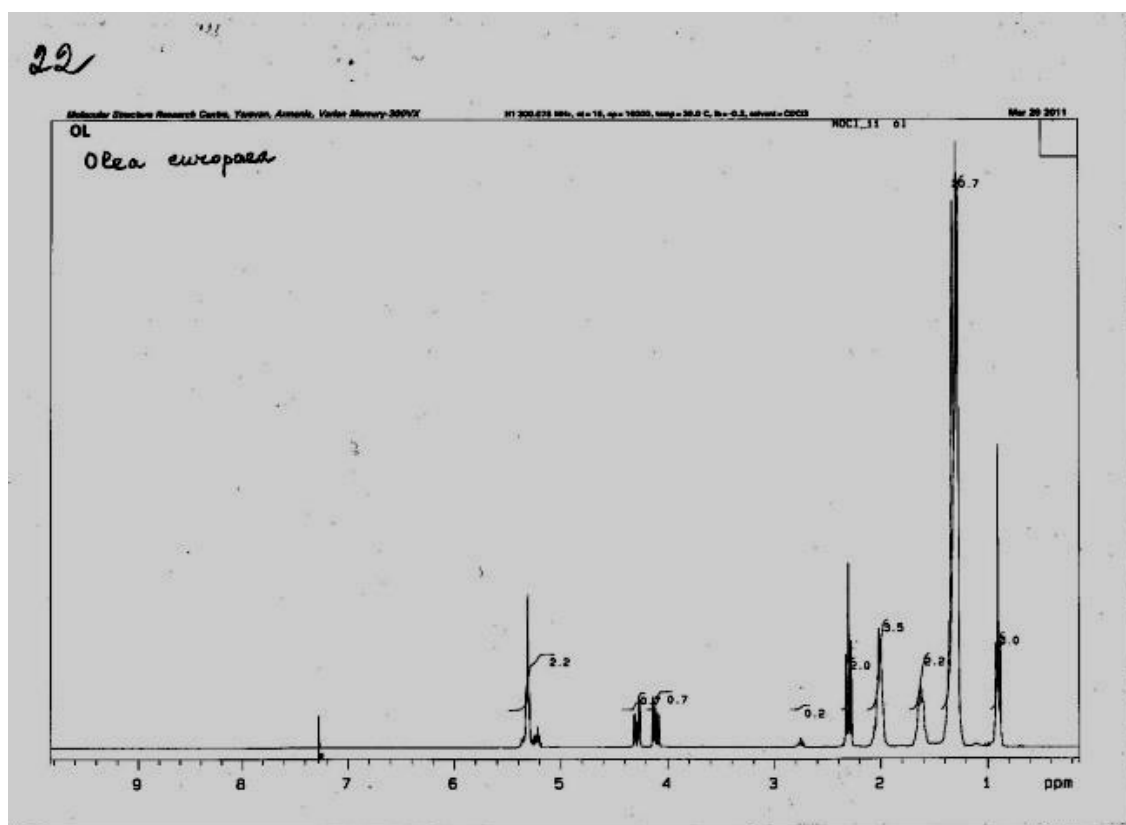
Какао



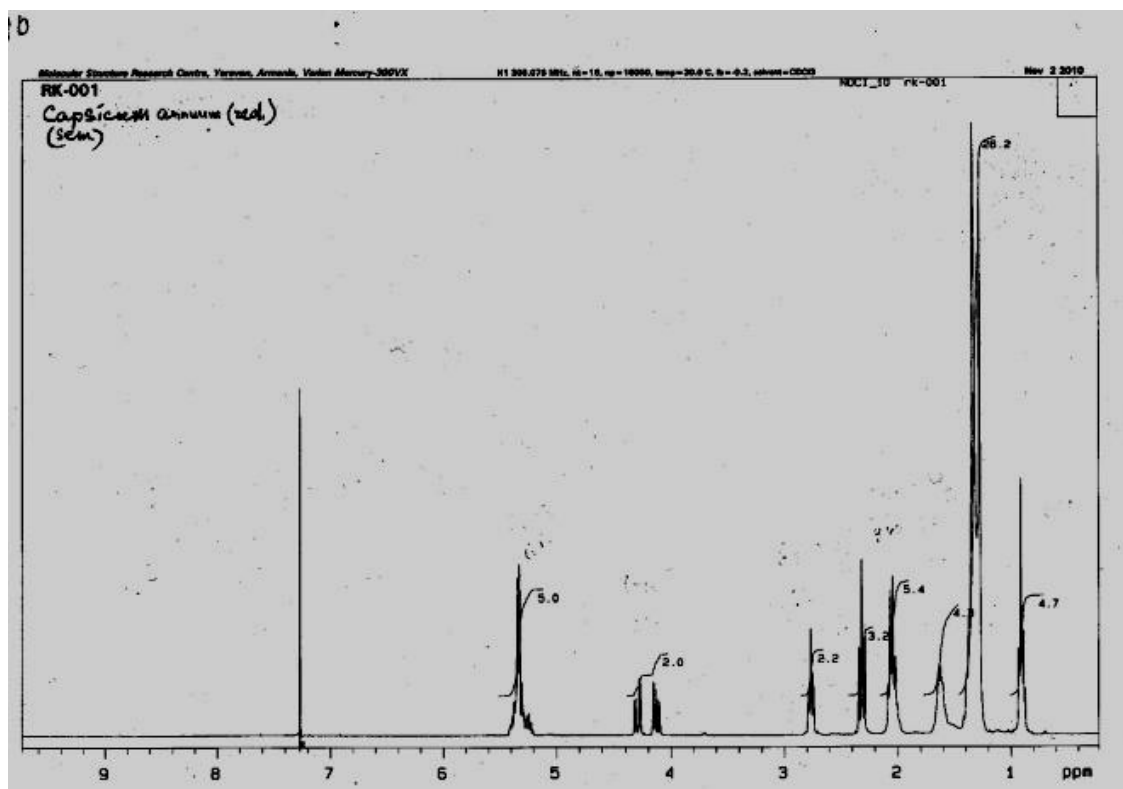
Кориандра



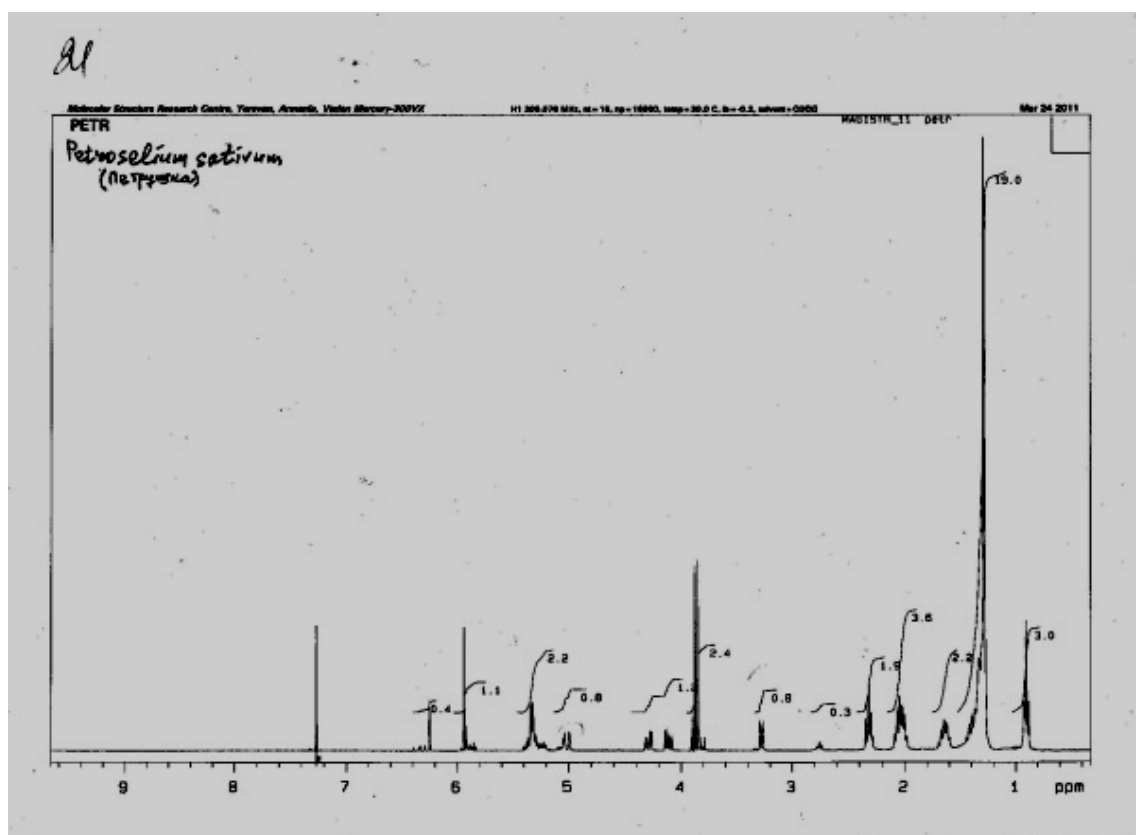
Кукурузы



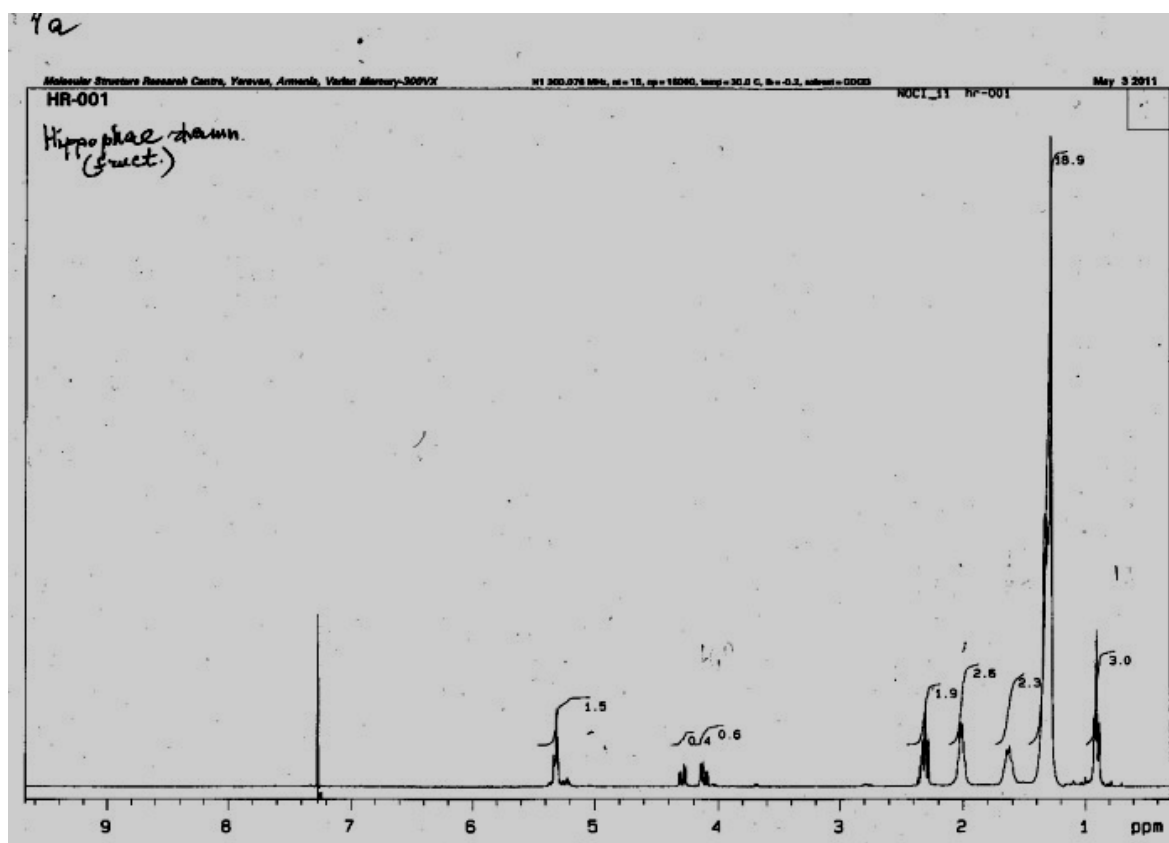
Оливы



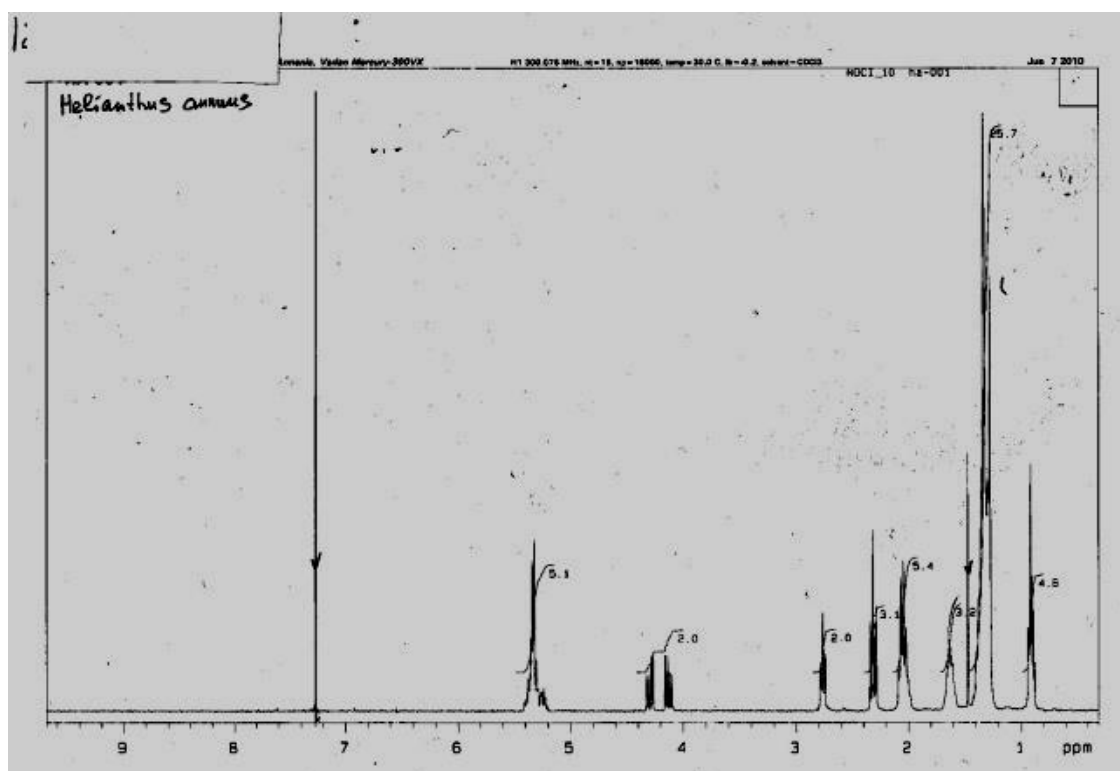
Перца



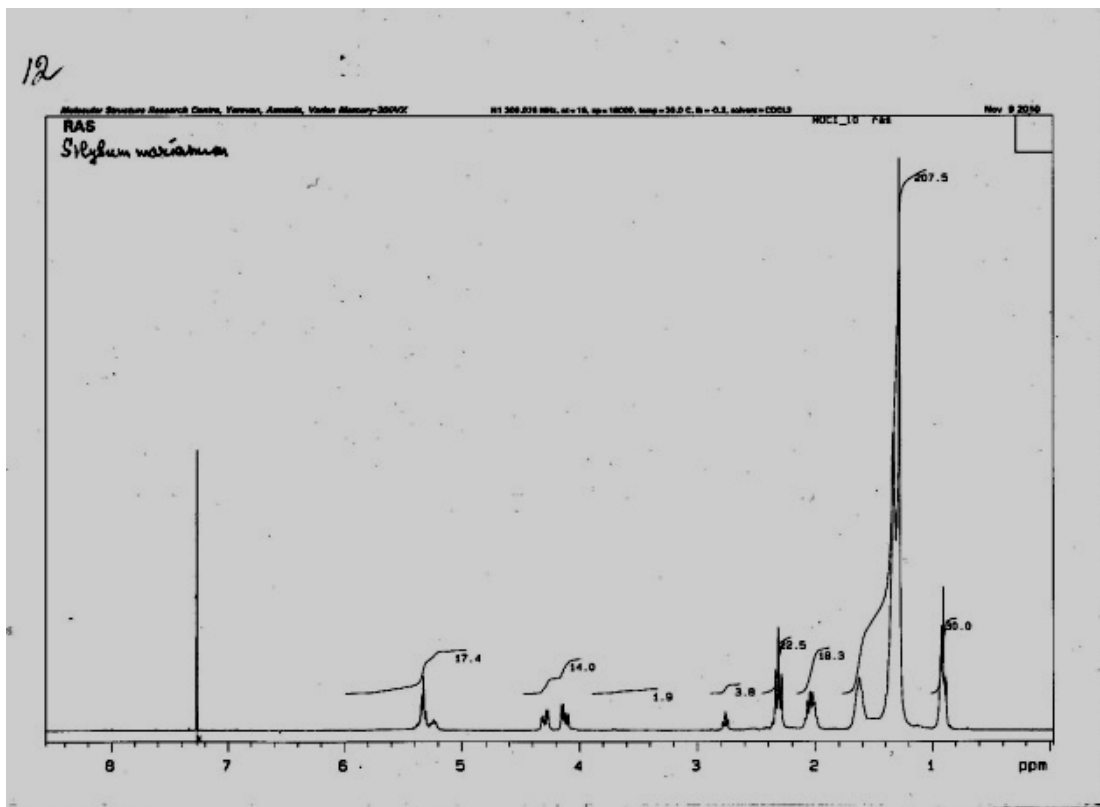
Петрушки



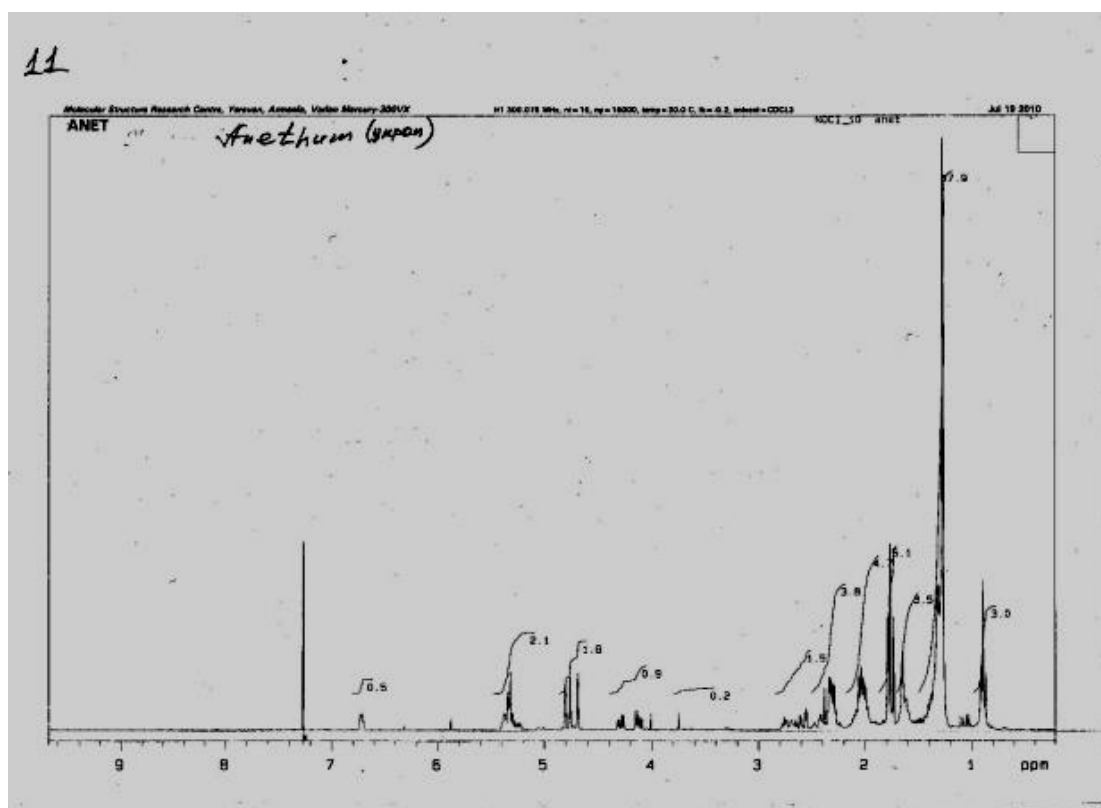
Плодов облепихи (Севан)



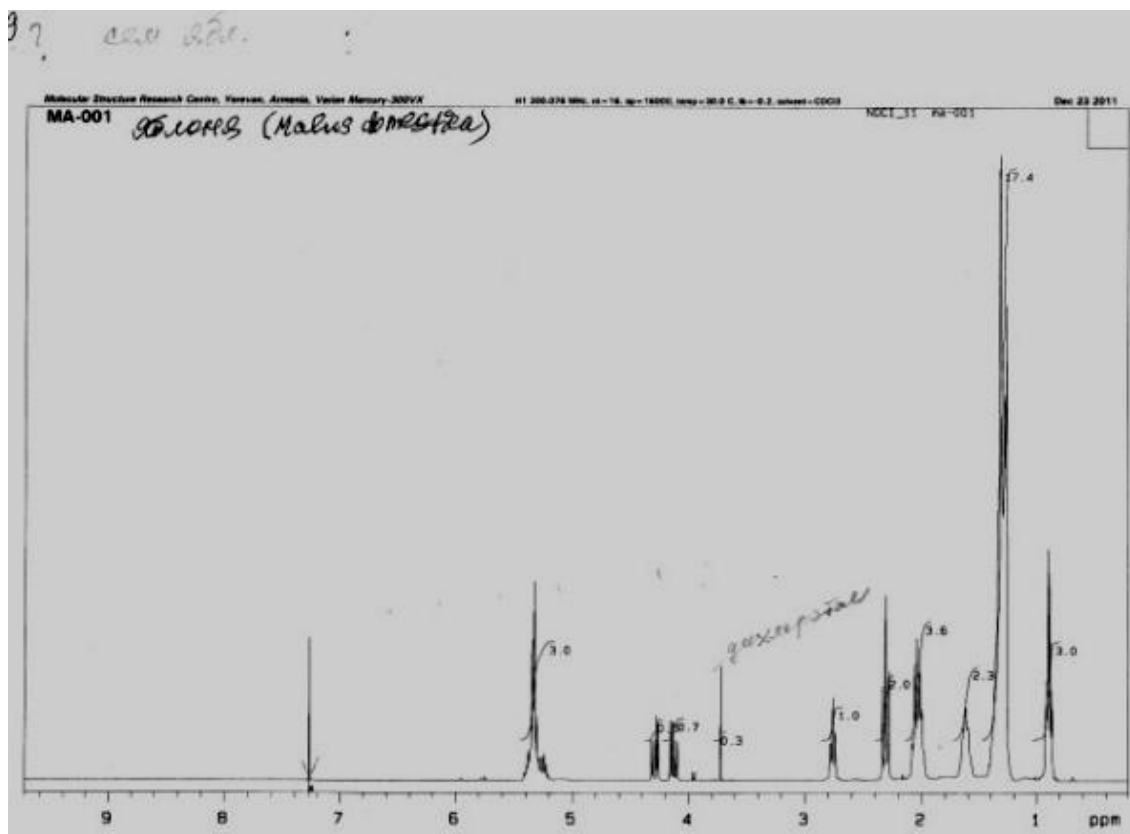
Подсолнечника



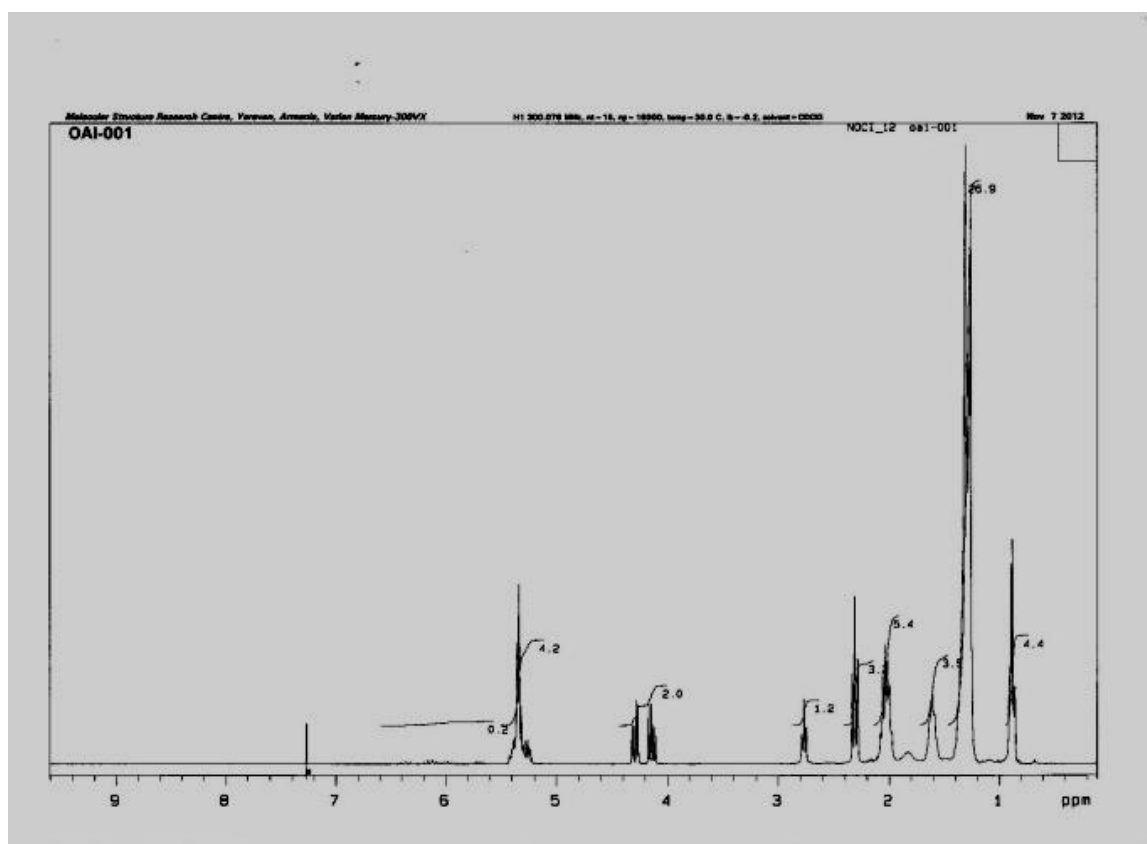
Расторопши (из Ннги, Арцах)



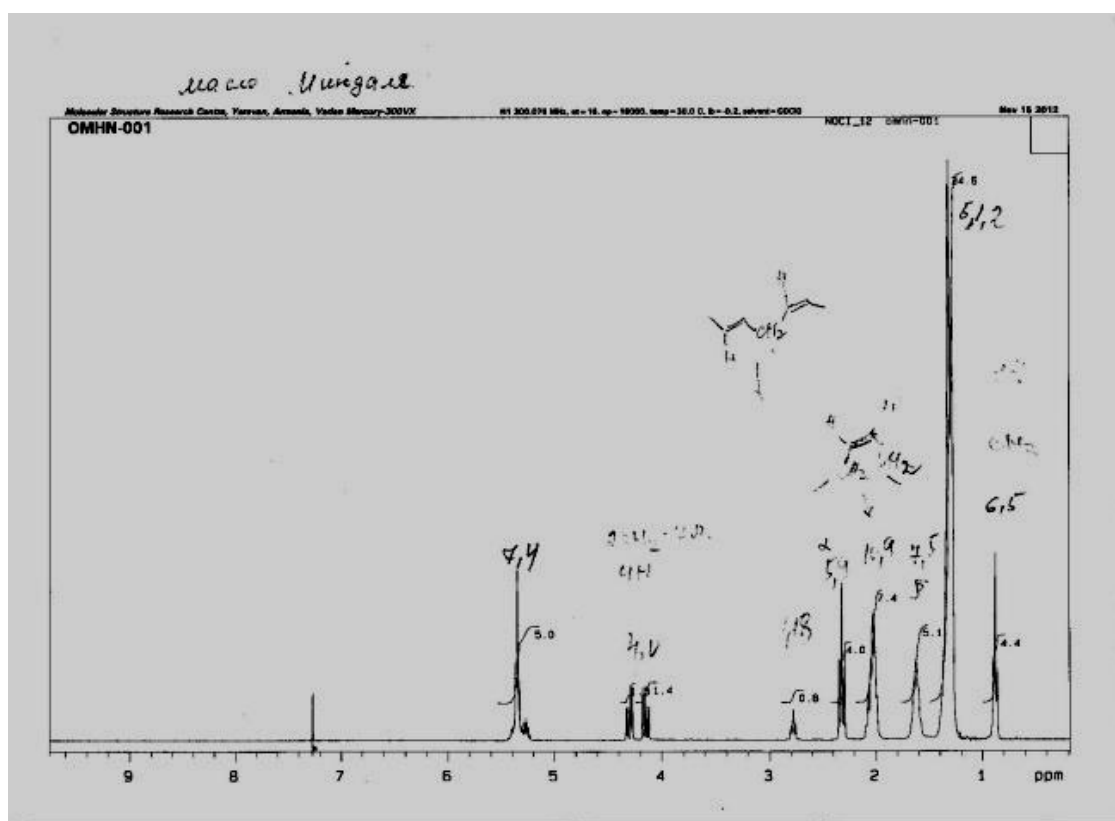
Укропа



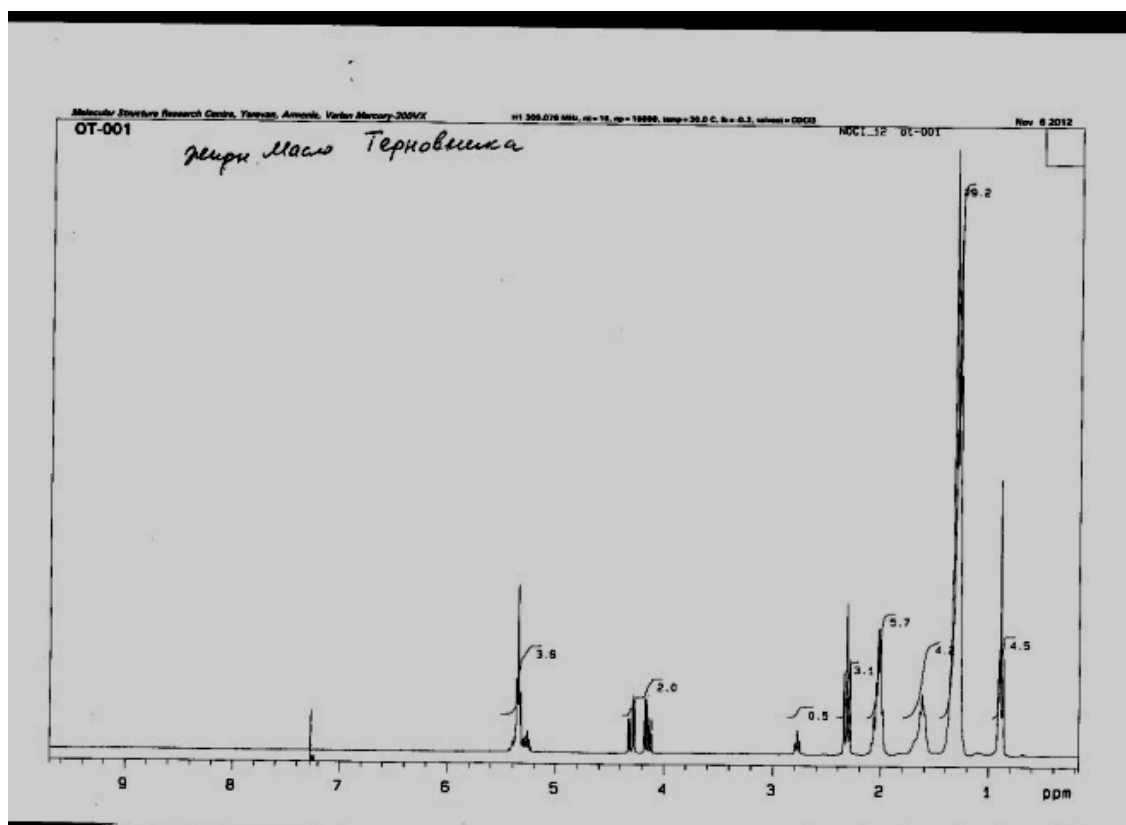
Яблони



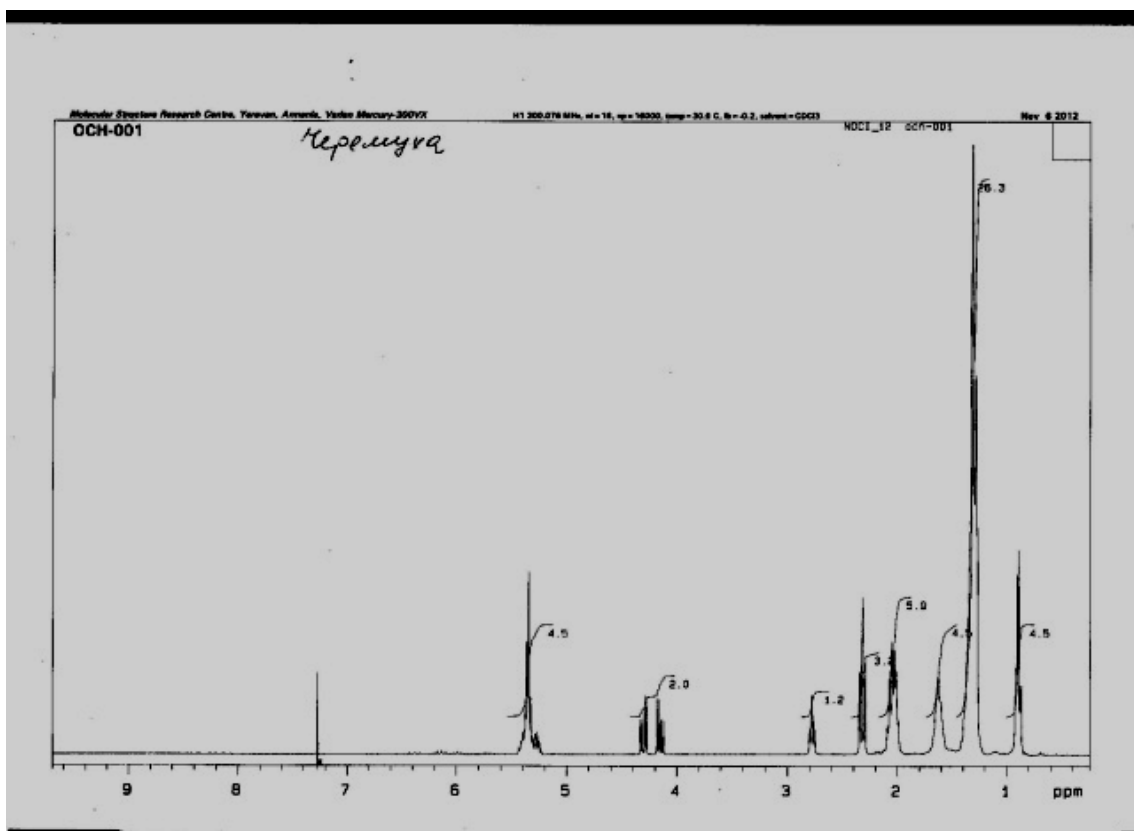
АЙВЫ



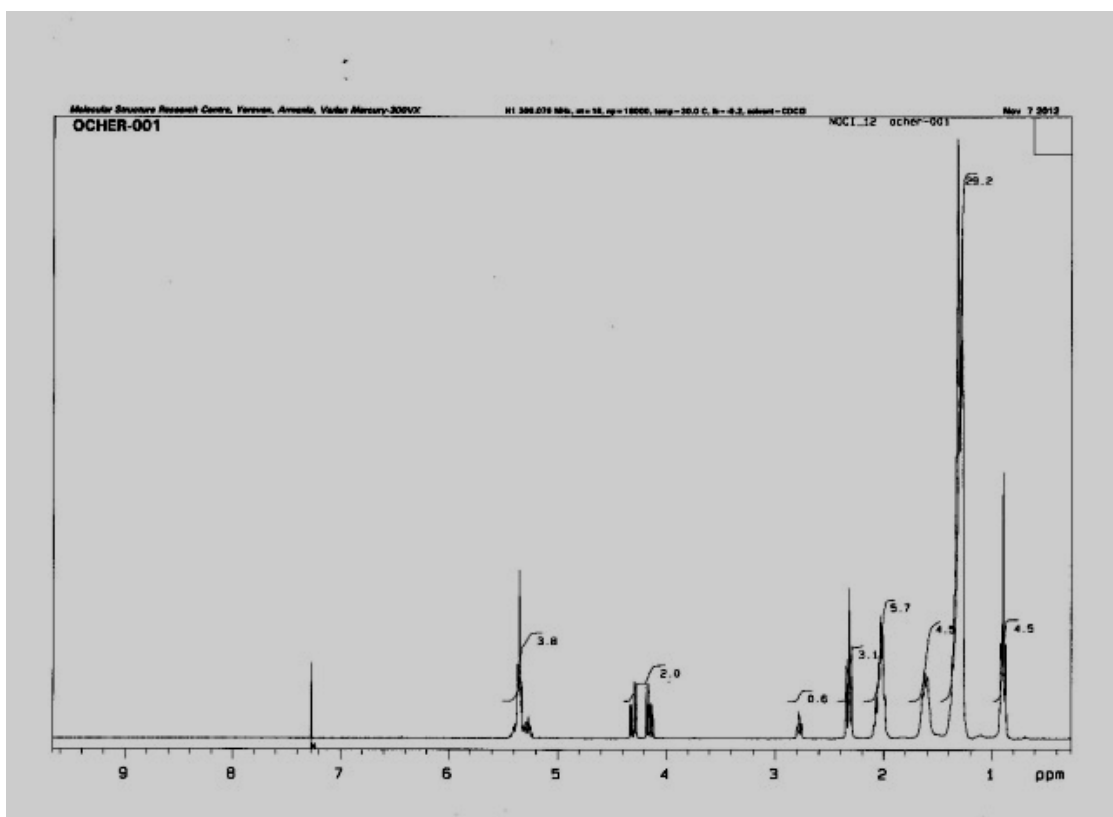
Миндаля



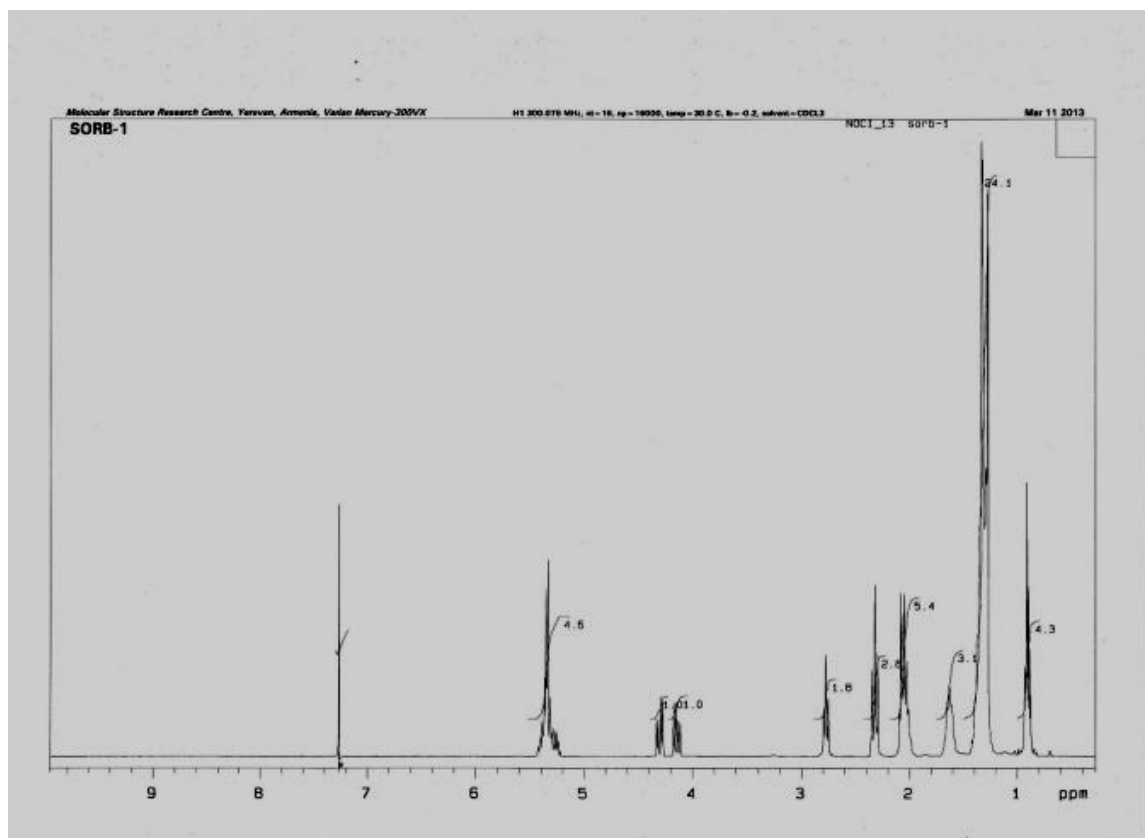
Птичьей вишни



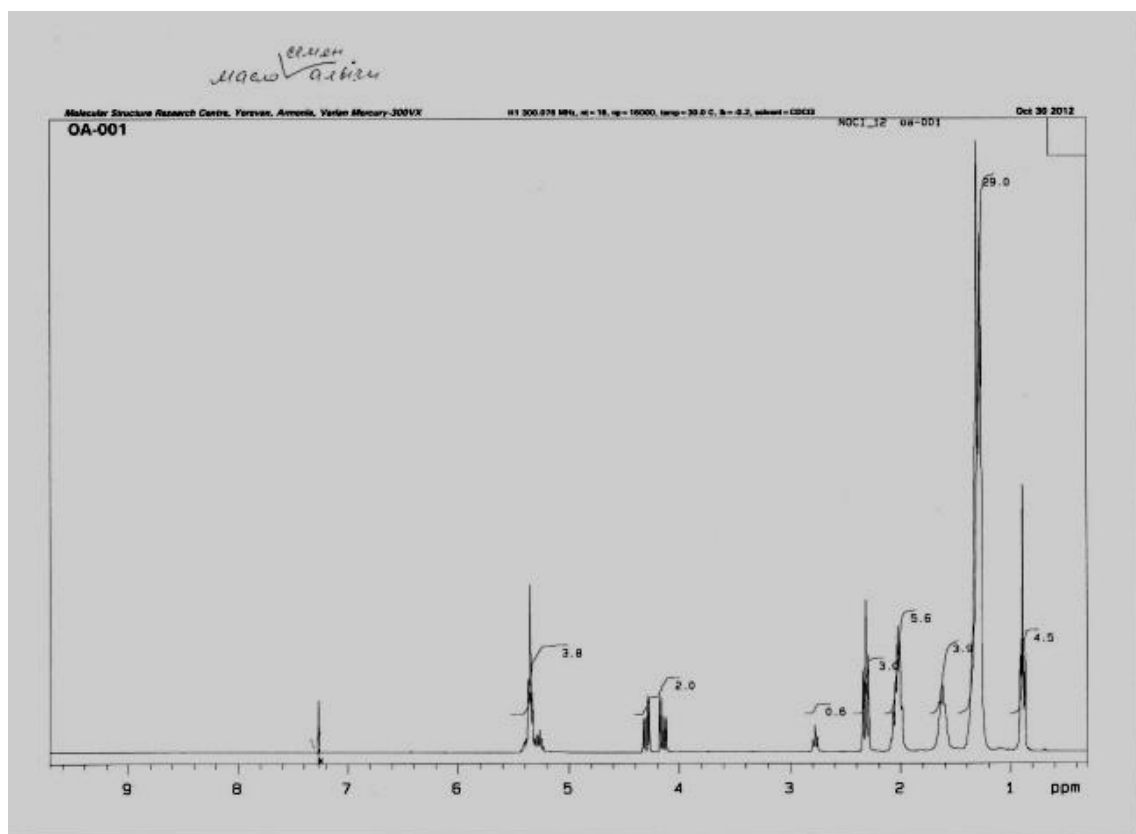
Чермухи



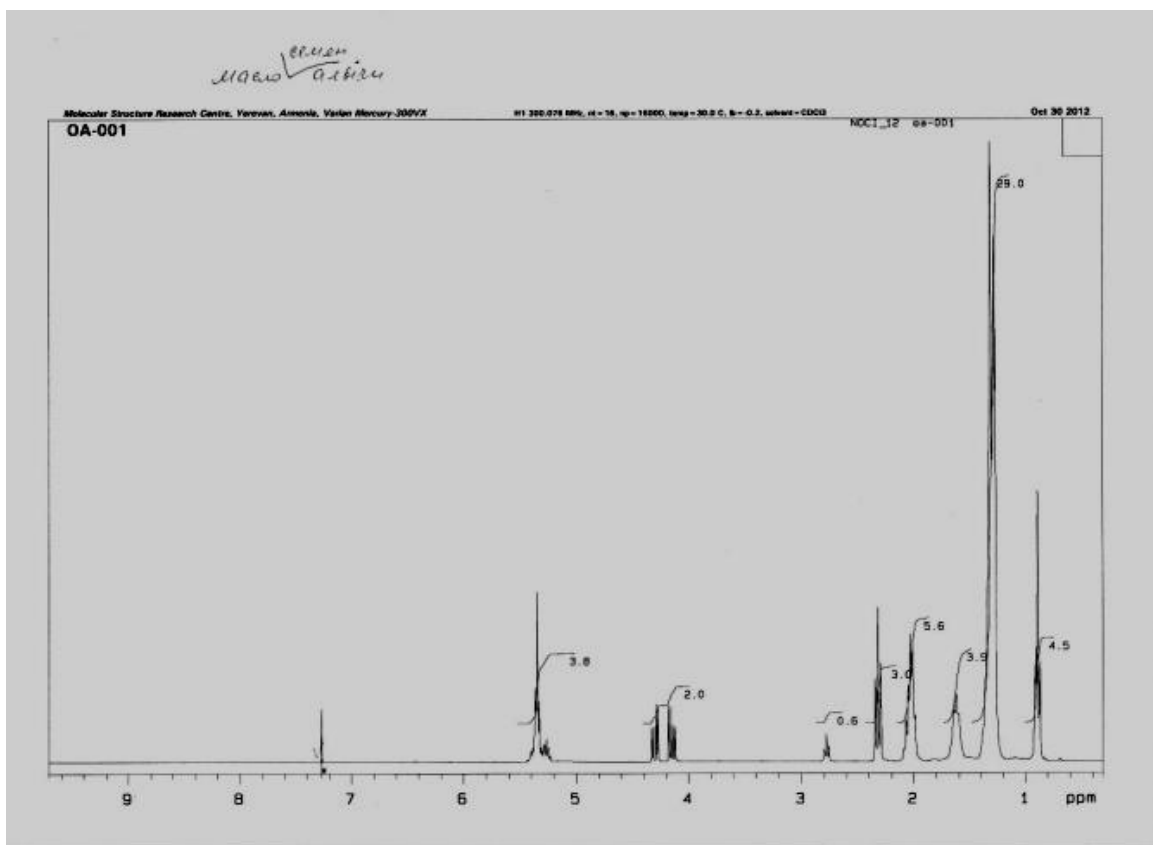
Черносливы



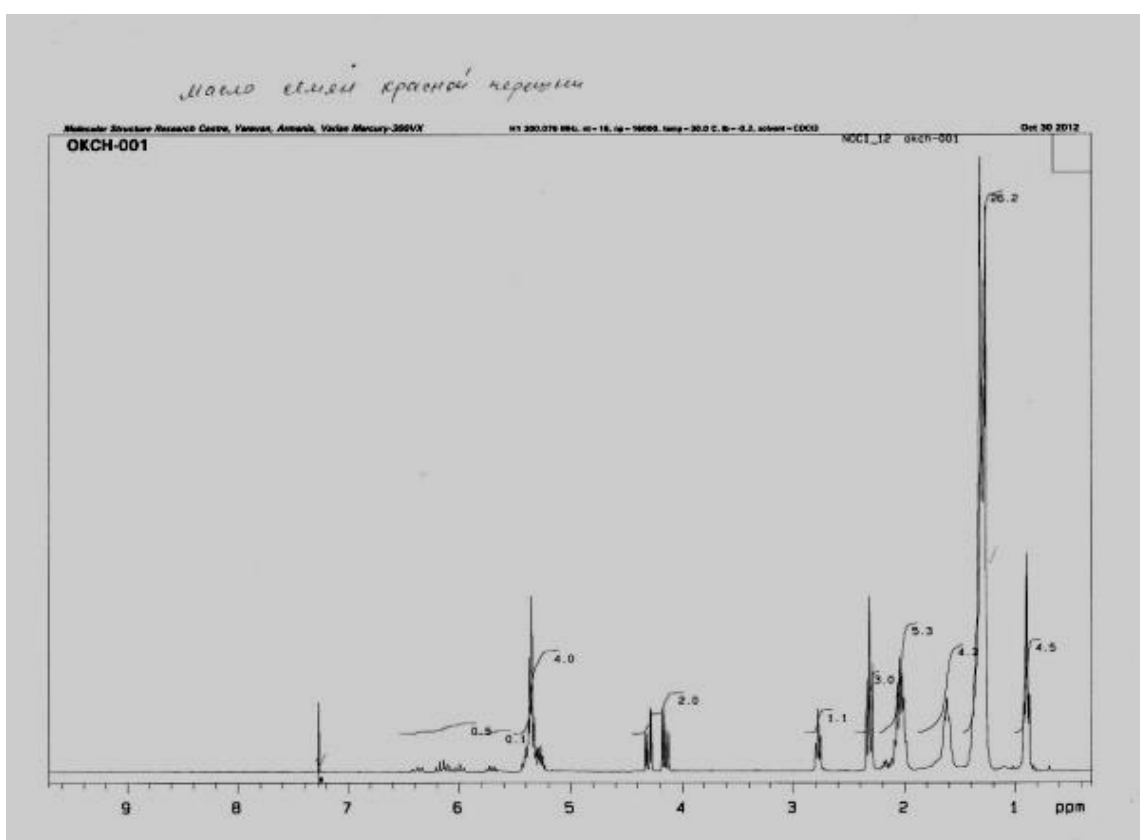
Рябины



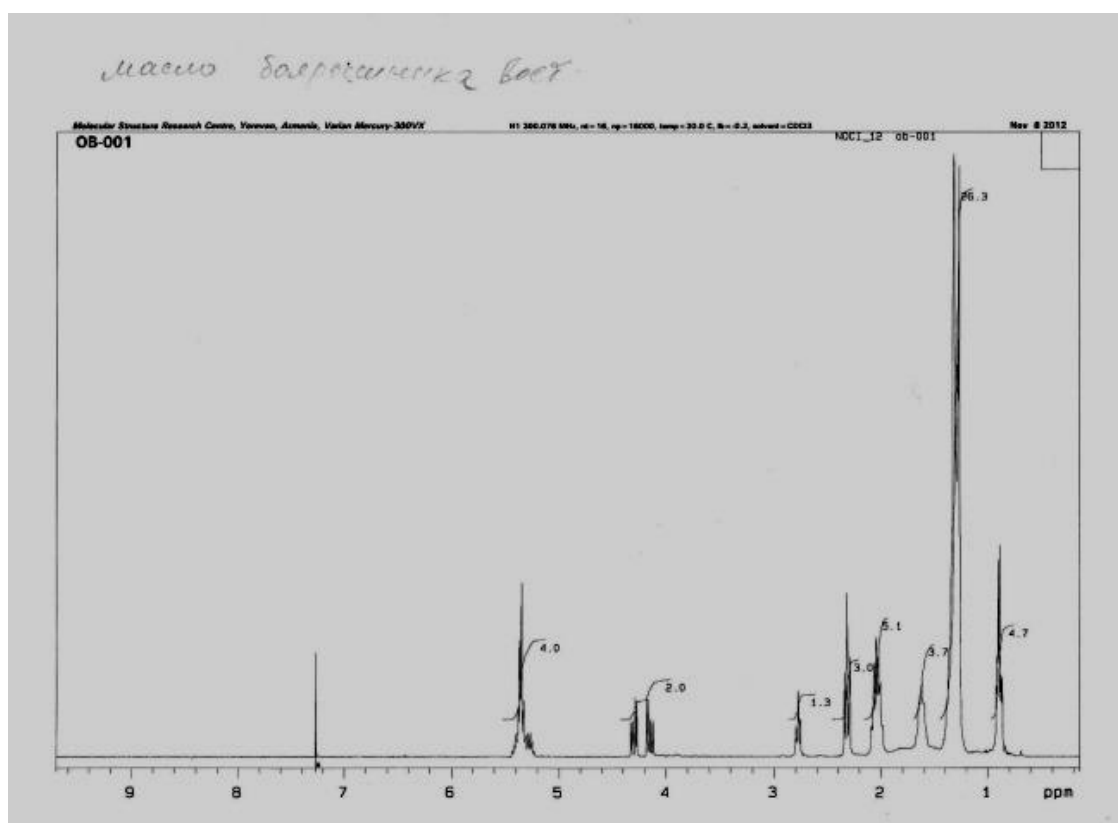
Алычи



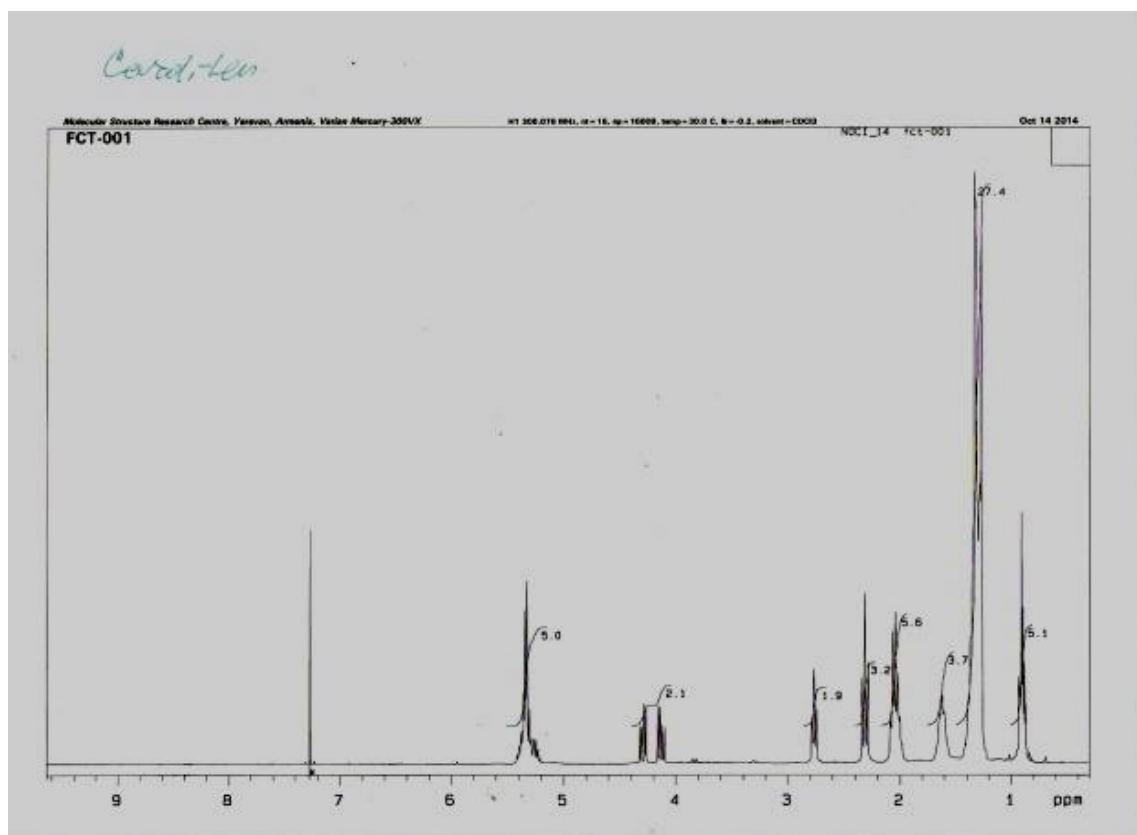
Черешни белой



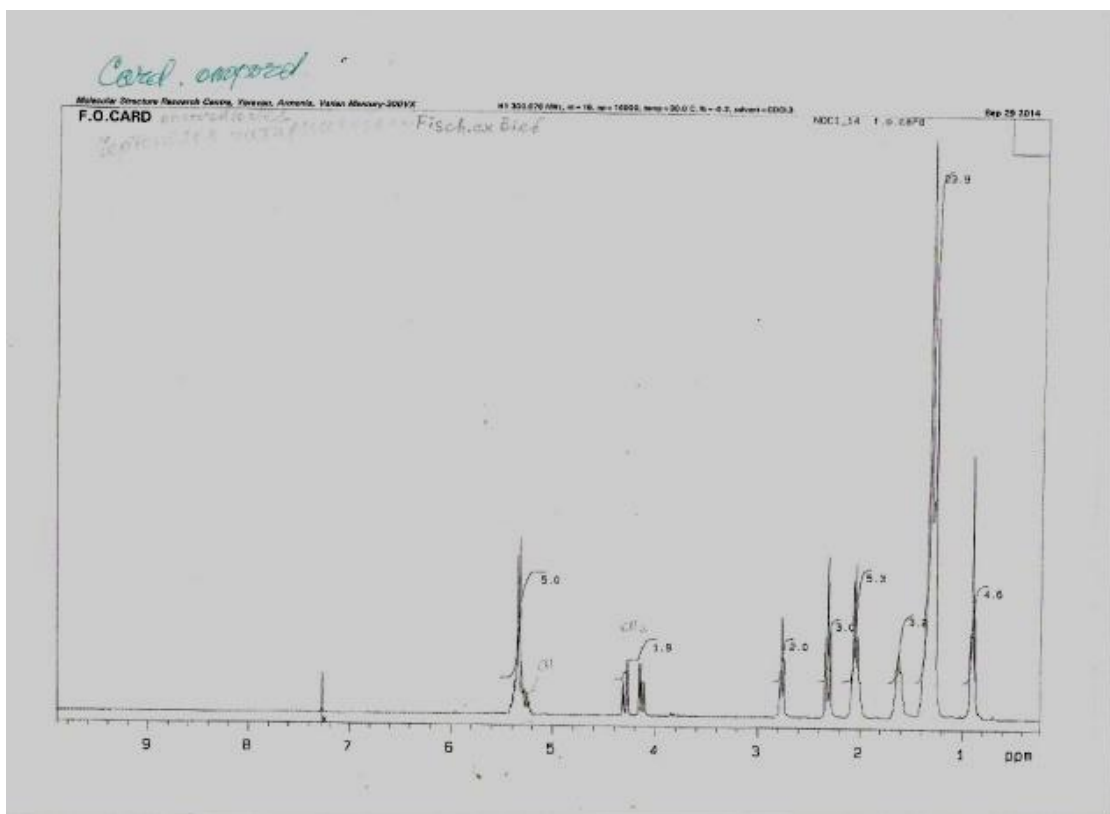
Черешни красной



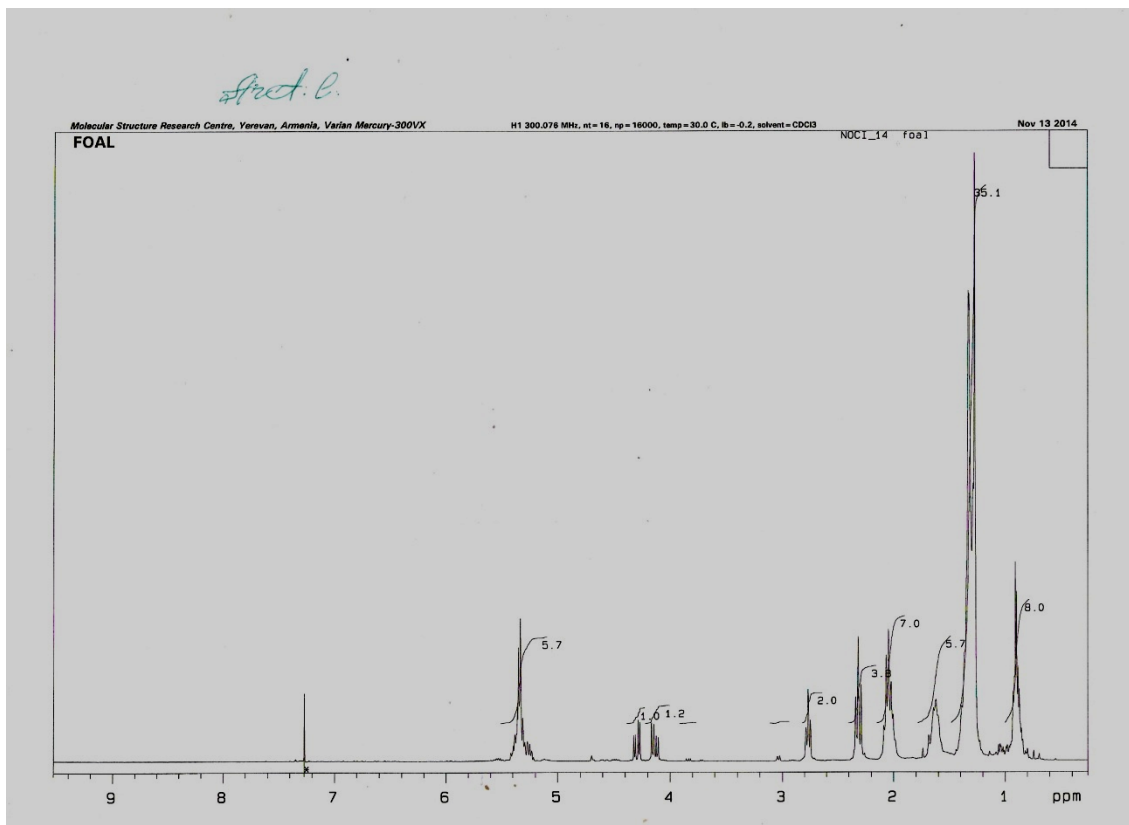
Боярышника восточного



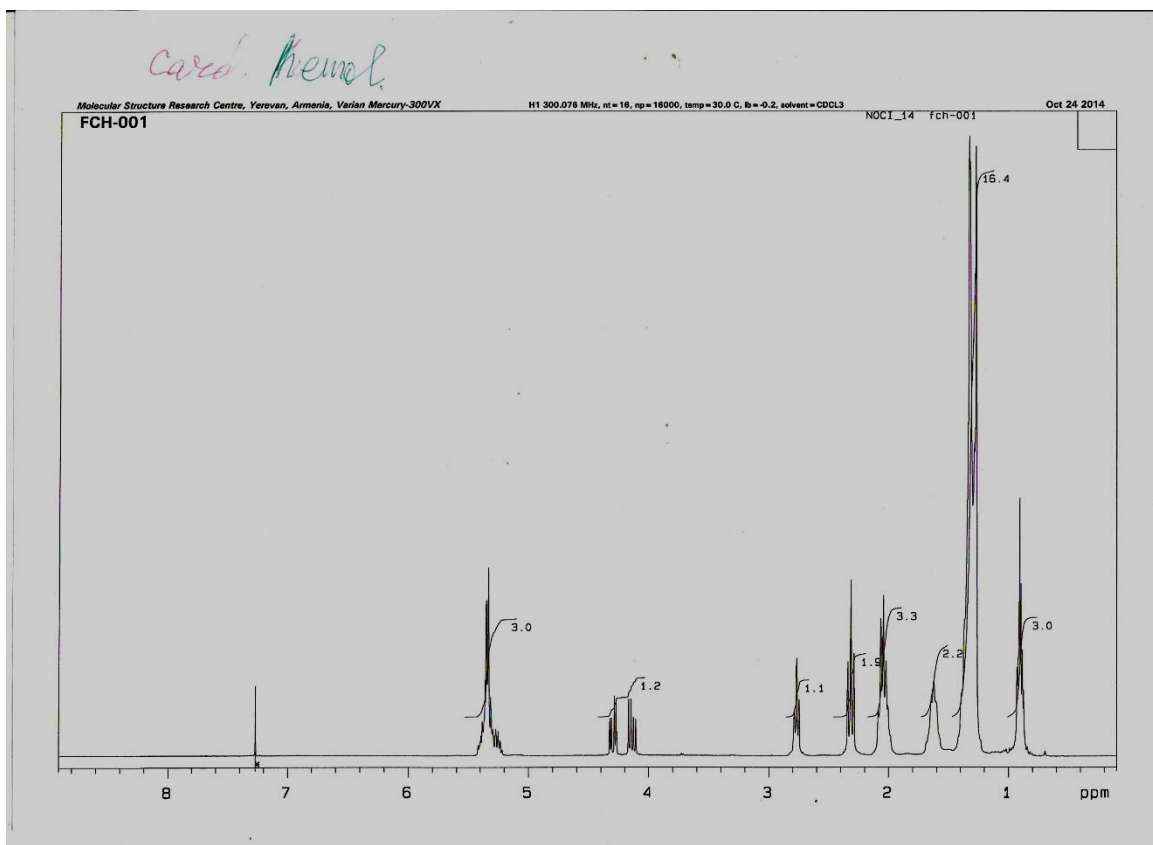
Чертополоха (Carduus tenuifolium)



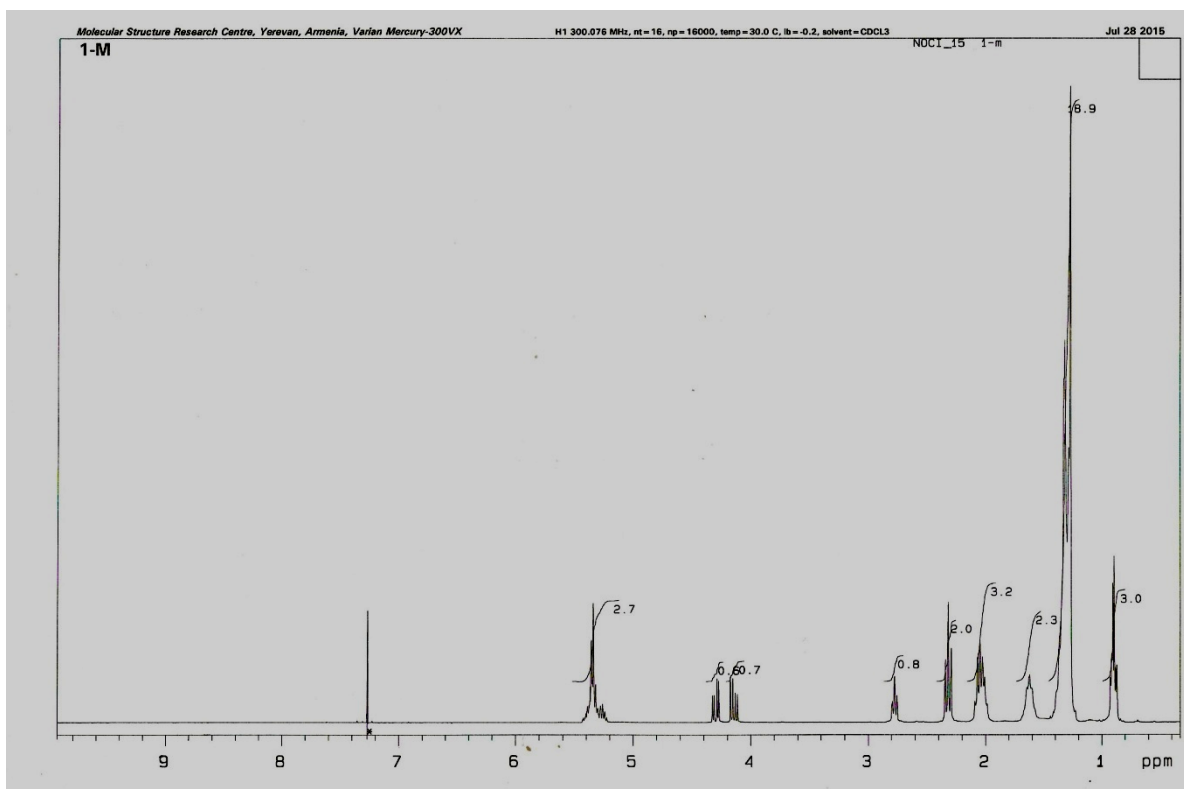
Чертополоха (Татарника, *Carduus onopordioides*).



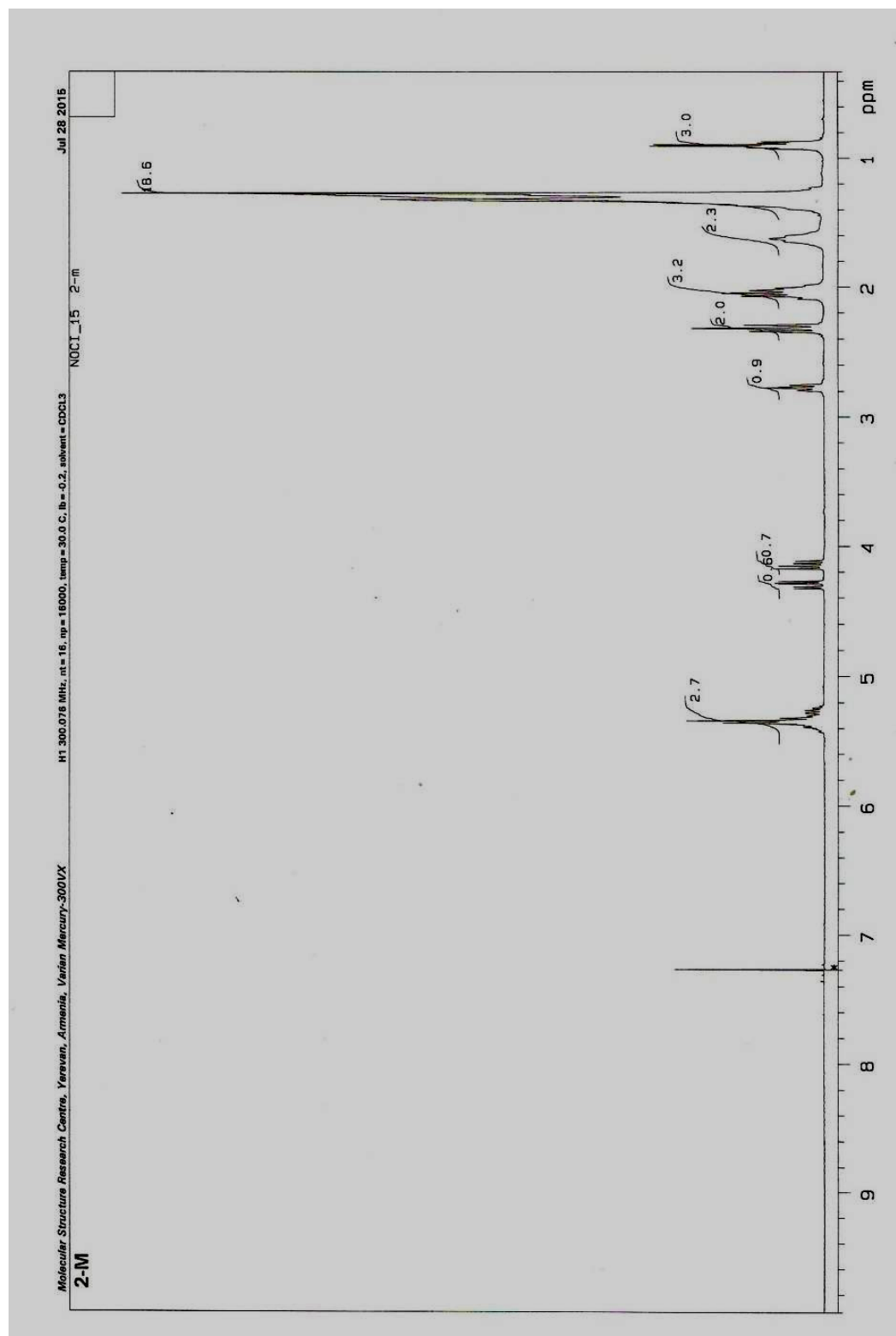
Лопуха



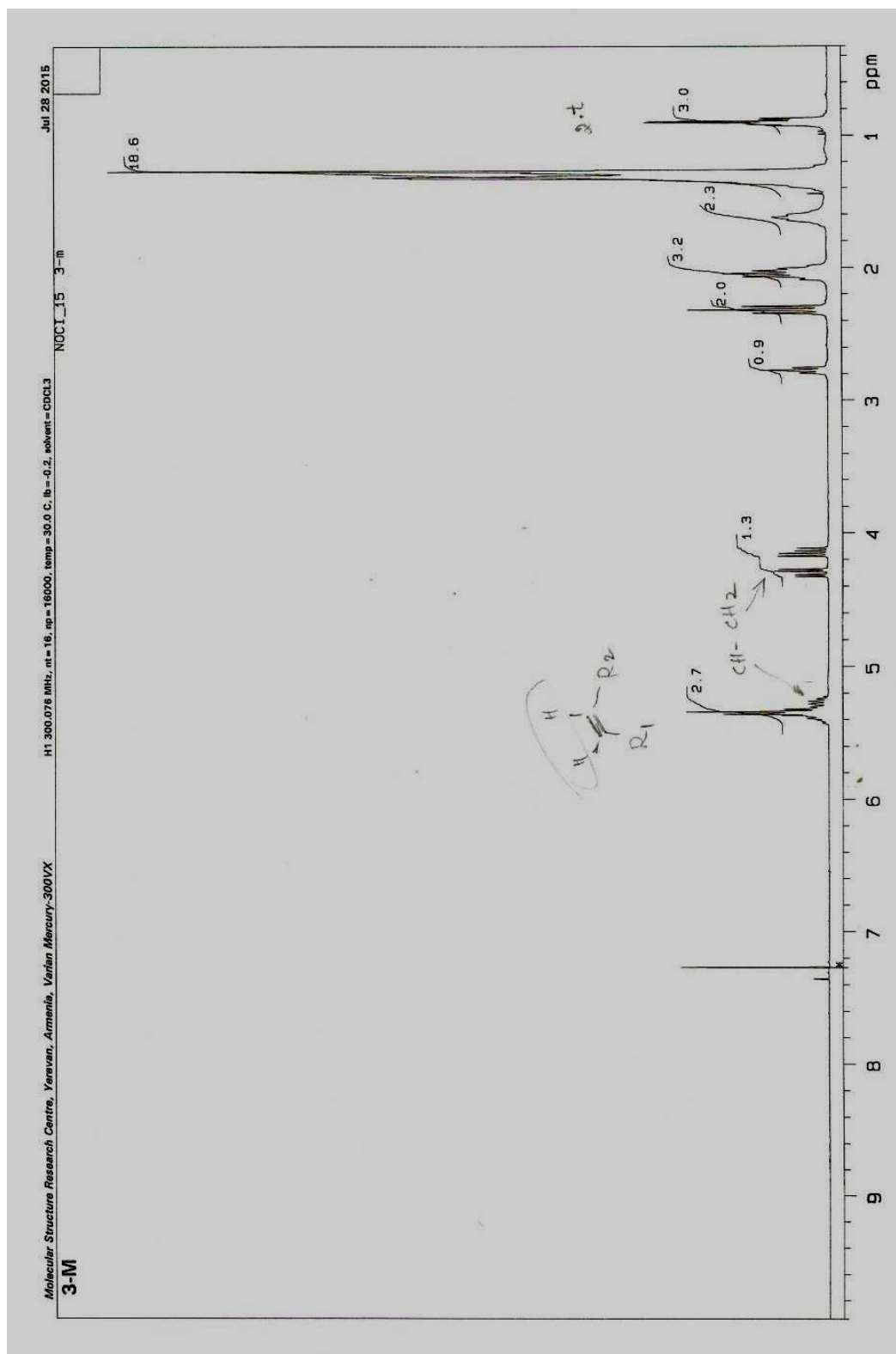
Чертополоха (Carduushemolus)



Расторопши (гидропоника 1 год).



Расторопши (Гидропоника 2-й год)



Расторопши из Агдама