

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ԱՆԱՆԻԿՅԱՆ ՀՐԱՉՅԱ ՍԻՄԱՎՈՆԻ

**ՈՐՈՇ ԲՈՒ ՅՍԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՄԵՏԱԲՈԼ ԻՏՆԵՐԻ
ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ**

Գ.00.14 - «Կենսաառեխնոլոգիա» մասնագիտությունը ամբ
քիմիական գիտությունը և ներքին թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսությունը ան

ՍԵՂԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2016

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

АНАНИКЯН ГРАЧЬЯ СИМВОНОВИЧ

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

АВТОРЕФЕРАТ

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

ԵՐԵՎԱՆ - 2016

Ատենախոսությունը թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ
«Հայ կենսաառեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝
Սարգսյան

ք.գ.դ., պրոֆեսոր Ս.Յ.

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝
Աղաջանյան

ք.գ.դ. Ա. Ե.

ք.գ.թ. Ա. Յ. Ծատուրյան

Առաջատար կազմակերպիչ ուն՝
ազգային

Հայաստանի

ագրարային համալսարան

Ատենախոսություն պաշտպանությունը կայանալու է 2016թ. հունիսի 6-ին ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՅ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:
Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փ., 14, հեռ./ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությունը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:
Սեղմագիրն առաքված է 2016թ. հունիսի 6-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.
Ավետիսովա

Գ.Ե.

Тема диссертации утверждена в НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель:

д.х.н., профессор С.А Саргисян

Официальные оппоненты:

д.х.н. А. Е. Агаджанян
к.х.н А.О. Цатурян

Ведущая организация:

Национальный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 6 июля 2016 г. в 15:00 часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 6 июня 2016г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАК

ГИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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. Актуальность подобных исследований безусловна и объясняется потребностью медицины в расширении сырьевой базы лекарственных средств. Растительный мир был и остается неисчерпаемым источником разнообразных биологически активных соединений. Флора Армении обладает необходимым запасом потенциально лекарственных видов и может служить таким источником.

Цель работы. Целью диссертационного исследования являлось выделение и изучение структур биологически активных веществ - флавоноидных соединений представленных во флоре Армении популяций растений: бессмертника красноватого, расторопши пятнистой, маклюры оранжевой, а также жирных масел семян (и плодов) более полусотни других растений.

Научная новизна. Изучение соцветий бессмертника красноватого, собранных вблизи озера Севан, показало, что этот вид бессмертника может быть использован в качестве сырья для получения препарата “Фламин”. Из плодов расторопши пятнистой, выращенной на опытном участке, а также собранной на территории Арцаха, выделили смесь флаволигнанов (“Силимарин”), изучение которой установило ее пригодность в качестве сырья. Апробирован гидропонический метод выращивания расторопши и показано преимущество этого метода для получения полноценных семян. Изучено содержание смеси пренилизофлавонов в плодах маклюры, собранных в Ереване и установлено их количество в настойке. Изучена сравнительная антирадикальная активность полученных флавоноидов и показано, что наибольшей активностью обладает пренилизофлавоном помиферин, а “Фламин” более активен, чем “Силимарин”. Разработан и апробирован приемлемый метод уточненного количественного определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот в жирных маслах использованием спектров ¹H-ЯМР.

Практическая ценность диссертационной работы заключается в обнаружении во флоре Армении перспективных сырьевых источников лекарственных средств: бессмертника красноватого (сырья препарата “Фламин”), лиловоцветковой расторопши силидианиновой хеморасы (сырья гепатопротекторных препаратов), маклюры оранжевой, содержащей пренилизофлавоны. Апробирован метод количественного определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот (с точностью порядка ±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, а также могут быть использованы при преподавании предмета “Фармакогнозия”.

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

Апробация работы. Основное содержание диссертационной работы доложено на конференциях: 1) “ArmChemFront” , Armenia, august 25-29, 2013. 2) 4-th international Conference of young scientists: Chemistry Today-2014. August 18-22, 2014. Yerevan. Young Chemists Association, 2014. 3). IV научная конференция Армянского химического общества (с международным участием). “ Достижения и Проблемы” 7-11 октября 2014г., Ереван-Ванадзор.

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 142 страницах компьютерного набора и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, 10 таблиц, 5 схем, 82 рисунков, выводов, списка цитируемой литературы (104 библиографические ссылки), приложений.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В литературном обзоре представлены сведения о флавоноидах: их структурном разнообразии, биосинтезе, методах выделения и идентификации, биологических свойствах, функциях в растениях и о сырье, содержащем флавоноиды. Представлены также сведения о жирных маслах, жирных кислотах масел, в том числе об омега-3 жирных кислотах, о биосинтезе, свойствах, функциях и растительном сырье жирных масел.

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ

2.1 Изучение соцветий бессмертника красноватого в качестве возможного источника препарата “Фламин”

Вещество под названием Фламин - желтый порошок, который получают из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum aenariium* L.).

Известно много разновидностей рода Бессмертник (*Helichrysum* L.) семейства Астровых, *Asteraceae*). Бессмертник песчаный произрастает в основном на территории России и Украины, по этой причине Фламин производится, в основном, именно в этих регионах. Бессмертник песчаный не зафиксирован во флоре Армении, где есть 6 других видов. Один из них, наиболее распространенный, полиморфный вид - бессмертник красноватый (*Helichrysum rubicundum* (C.Koch.)). Фламин представляет собой смесь флавоноидных соединений – гликозидов салипурпозид, изосалипурпозид и агликонов кемпферол, апигенин, нарингенин. Фламин – желчегонный препарат. Он используется для лечения болезней печени, желчного пузыря, при хронических холециститах, при воспалении желчных желез. Нами было предпринято изучение химического состава соцветий бессмертника красноватого, собранного на территории, окружающей озеро Севан, и производимого в упакованном виде кооперативом «Бусабуйж нана» при Севанском ботаническом саде.

Измельченные, высушенные соцветия бессмертника были экстрагированы 50% спиртом в аппарате Сокслета, полученный экстракт упаривался до водного раствора, который охлаждался, фильтровался, подвергался экстрагированию смесью этилацетат - спирт (9:1) и затем полученный этилацетатный экстракт упаривался досуха. Выход высушенного экстракта (условно обозначенного как Ф 1) составил около 6%. Сравнением его с аптечным препаратом “Фламин”, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ рис.1), была показана схожесть картин ТСХ флавоноидных составов полученного экстракта (Ф1) и препарата “Фламин”.

Экстракт Ф1 подвергли разделению на фракции 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.3).

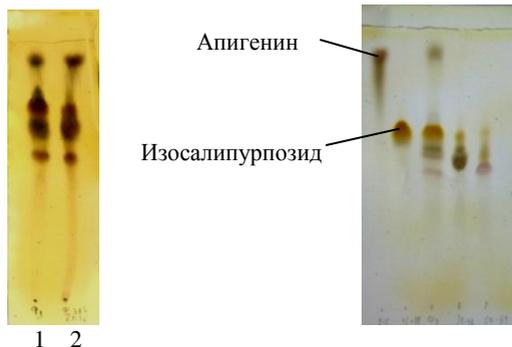


Рис.1. ТСХ полученного экстракта(1) и аптечного препарата “Фламин”(2)

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

Истинность изосалипурпозид и апигенина была подтверждена и доказана, главным образом, методами ТСХ (рис. 2.) и ЯМР – спектрометрии.

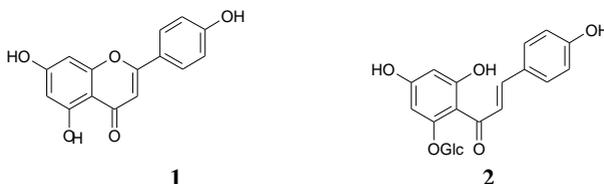


Рис.3. Структуры апигенина (1) и изосалипурпозид (2).

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.

^1H -ЯМР-спектр (в $\text{DMSO-d}_6\text{-CCl}_4$ - 1:3) δ , 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 (1)

^1H -ЯМР-спектр (в $\text{DMSO-d}_6\text{-CCl}_4$ - 1:3) δ , м.д.: 13.94(1H, с., 2¹-OH), 9.67 и 10.15(2 неразрешенных горба от 4- и 4¹-OH), 8.03(1H,д.5,5 Гц, H_β), 7.59 (1H, д. 5.5Гц, H_α), 7.58(2H,м.,H-2, H-6), 6.80(2H,м, H-3, H-5), 6.14(1H,д.2.1Гц, H-5¹), 5.91(1H, д.2,1 Гц, H-3¹), 5.04(1H,д.7,5Гц, H-1¹¹), 4.97(1H, уш.м., OH), 4.87(1H, уш.м., OH), 4.31(1H, уш.м., OH), 3.76(1H, уш.д.11,8 Гц., H-6¹¹), 3.59(1H, кв.д.11,8; 11,8; 4,1) – изосалипурпозид(2).

^{13}C -ЯМР-спектр: (75.5 МГц. в $\text{DMSO-d}_6\text{-CCl}_4$ - 1:3) δ , м.д.: 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) – изосалипурпозид(2).

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

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 [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], принадлежащей семейству Астровых (Asteraceae). Растение это – дикорастущий во многих странах двулетник, покрытый мелкими, острыми колючками, легко поддающийся выращиванию на плантациях и характеризующийся наличием белоцветковой и лиловоцветковой разновидностей. У лиловоцветковой расторопши обнаружены две разные хеморасы. На территории Республики Армения встречается лиловоцветковая расторопша (довольно редко, в основном в окрестностях Иджевана), но в Арцахе, как это было показано ресурсной оценкой, его лиловоцветковая разновидность образует места 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” (3) и “силидианин” (4). 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 анализом “силимаринов”, выделенных из семян разных образцов расторопши, выращенных в одиннадцати ботанических садах Европы. 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.

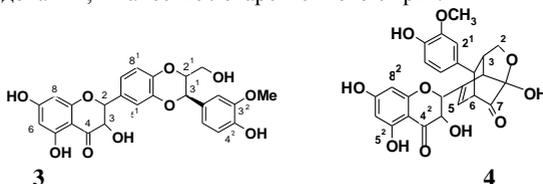


Рис.4. Структуры силибина (3) и силидианина (4).

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 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 ЯМР спектров. Силибина: 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-4'-OH); 7.07- 7.04 (1H, м, C-2'-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,

$J=8.1$, $C-3^1-H$); 4.66 (1H, уш.т, $J_1=5.7$, $C-3H$ изомера); 4.37 (1H, д.т, $J_1=11.2$, $J_2=5.7$, $C-3-H$); 4.05 – 3.98 (1H, м, $C-2^1-H$); 3.85 (3H, с, OCH_3); 3.67 – 3.58 и 3.42 – 3.33 (по 1H, м, $C-2^1-CH_2OH$). **ЯМР** ^{13}C , δ , м.д.: 196.751 ($C-4$); 166.797 ($C-7$); 163.416 ($C-5$); 162.146 ($C-9$); 147.270 ($C-3^2$); 147.238 ($C-4^2$); 146.890 ($C-4^2$ изомера); 143.736 ($C-10^1$); 143.695 ($C-9^1$); 142.773 ($C-9^1$ изомера); 129.952 ($C-6^1$); 129.911 ($C-6^1$ изомера); 127.153 ($C-1^2$); 120.237 ($C-6^2$); 120.067 ($C-6^1$); 119.994 ($C-6^1$ изомера); 116.055 ($C-5^1$); 116.022 ($C-2^1$); 115.942 ($C-2^1$ изомера); 115.019 ($C-5^2$); 111.242 ($C-2^2$); 100.144 ($C-10$); 96.051 ($C-8$); 95.541 ($C-6$); 82.469 ($C-2$); 82.404 ($C-2$ изомера); 78.109 ($C-8^1$); 75.537 ($C-7^1$); 71.775 ($C-3$); 71.703 ($C-3$ изомера); 60.038 ($C-2^1a$); 55.419 (OCH_3); и силидианина: спектр **ЯМР** 1H , δ , м.д., $G\mu$: 11.72 (1H, с, $C-5^2-OH$); 10.49 (1H, с, $C-7^2-OH$); 8.24 (1H, с, $C-4^1-OH$); 6.93 (1H, с, $C-3^2-OH$); 6.69 (1H, д, $J=1.8$, $C-2^1-H$); 6.63 (1H, д, $J=8.1$, $C-6^1-H$); 5.56 (1H, д.д., $J=8.1$ и 1.8 , $C-5^1-H$); 6.06 (1H, уш.д., $J=6.8$, $C-5-H$); 5.86 (1H, уш.с, $C-6^2-H$); 5.58 (1H, д, $J=5.7$, $C-3^2-OH$); 4.78 (1H, уш.д, $J=11.1$, $C-2^2-H$); 4.78 (1H, уш д, $J=11.1$, $C-2^2-H$); 4.38 (1H,дд, $J=11.1$ и 5.7 , $C-3^2-H$); 3.81 (1H, дд, $J=10.1$ и 4.1 , $C-2^1-H$); 3.79(3H, с, OCH_3); 3.77 (1H, д, $J=10.1$, $C-3^1-H$); 3.28 (1H, м, $C-6a-H$); 3.17 (1H,дд, $J=6.8$ и 2.9 , $C-6-H$); 2.82 (1H,м, $C-3a$); **ЯМР** ^{13}C , δ , м.д.: 81.56 ($C-2^2$); 71.096 ($C-3^2$); 196.01 ($C-4^2$); 163.45 ($C-5^2$); 96.25 ($C-6^2$); 165.83 ($C-7^2$); 94.88 ($C-8^2$); 161.79 ($C-9^2$); 100,02 ($C-10^2$); 132.41 ($C-7a$); 48.49 ($C-3a$); 96.42 ($C-4$); 201.05 ($C-7$); 43.86 ($C-6$); 123.81 ($C-5$); 56.42 ($C-6a$); 46.45 ($C-3$); 72.73 ($C-2$); 139.5 ($C-1^1$); 111.97($C-2^1$); 146.92 ($C-3^1$); 145.15 ($C-4^1$); 114.81 ($C-5^1$); 120.24 ($C-6^1$); 55.33 (OCH_3), совпадающие с описанными.

Сравнение количеств выделенных флаволигнанов показало, что в семенах лиловоцветковой расторопши из Арцаха главным компонентом флаволигнановой смеси по количеству 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.

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

Семена расторопши пятнистой, как было отмечено выше, являются сырьем для приготовления ценных гепатопротекторных препаратов (Карсил, Легалон, Силибор, Силимар, Силиминин и др.) и целебного жирного масла (Масло расторопши). Изучение семян растения, произрастающего в окрестности села Ннги (НКР), показало 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 делянках на открытой гидропонике. Для роста и развития растений использовали питательный раствор Давтяна, подаваемый периодически, в соответствии с гидропонической фитотехнологией. Первые всходы расторопши появились в конце апреля- начале мая (рис.5.а), а зрелые плодоносящие корзинки в конце июля-начале августа (рис.5.б). Визуальная оценка среднего количества корзинок, зрелых семян (рис.б) расторопши первого и второго года в течение вегетации свелась к следующему: у растений первого года количество плодоносящих корзинок составляет $6-8 \pm 2$, а у

растений второго года - $19-23 \pm 2$; количество семян в корзинках и средняя масса семени у растений первого и второго годов одинаковы: 60 ± 10 штук и 18 ± 2 мг.

Полученные семена, после подсушивания при комнатной температуре в тонком слое, подверглись измельчению и экстрагированию по описанному методу гексаном, затем этанолом, с целью выделения, отдельно жирного масла и Силимарина». В качестве контроля, для сравнения, такой же обработке подвергли образцы семян дикорастущей расторопши из трех районов Арцаха (Агдама, Гюлиджана и Храморда).



а
б
Рис.5. Расторопша в гидропонике



Рис.6. Семена расторопши

Проведены и представлены сравнения количественного содержания масла и Силимарина (табл.1), качественные характеристики спектров ^1H -ЯМР жирных масел (табл. 2) и сравнение методом тонкослойной хроматографии выделенных Силимаринов (рис.7).

Таблица 1.

Спектры ^1H -ЯМР жирных масел семян расторопши пятнистой
Области сигналов H^α (в миллионных долях, м.д.), их характер и интенсивность

N	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	Гидроп. 2-го года	9.21	57.1	7.1	9.8	6.1	2.8	4.0	8.3
3	Гидроп. 1-го года	9.21	58.0	7.1	9.8	6.1	2.5	4.0	8.3
4	Группы сигналов	$-\text{CH}_3$	CH_2-	CH_2- CH_2- CO	CH_2- CH_2-	CH_2- CO	CH_2-	2CH_2 глиц.	CH - глиц и (=)

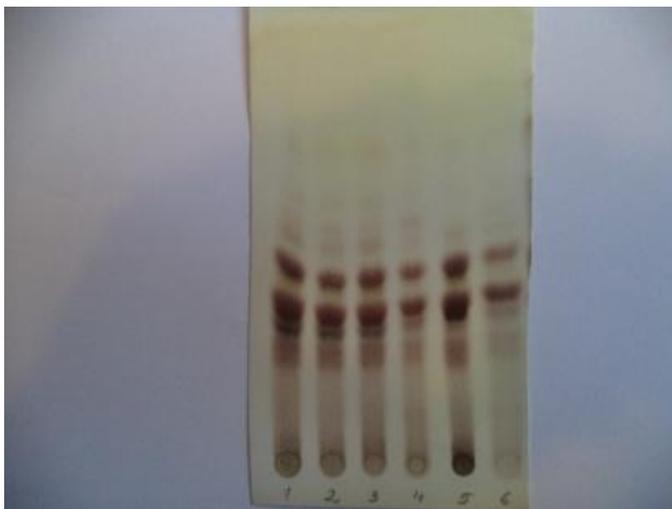


Рис. 7. ТСХ Силимаринов из семян расторопши: 1-й образец – гидропонического происхождения 1-го года; 2-й – гидропонического происхождения 2-го года; 3-й - из Гюлиджана; 4-й – из Храморда; 5-й образец Силимарина из ИТОХ НТЦОФХ; 6-й - из Агдама.

Таблица 2.
Сравнение количественного содержания жирного масла и “салимарина”

Образцы семян	Жирное масло	Силимарин
Гидропон. 2-го года	24.0%	4.9%
Гидропон. 1-го года	15.49%	3.99%
Агдам	22.0%	4.45%
Гюлиджана	20.4%	4.55%
Итох	19.26%	3.25%
Храморда	20.56%	2.18%

Из данных таблицы 1 следует, что наибольшее количество как масла, так и Силимарина содержат семена растений двухлетнего гидропонического возделывания. Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что масло семян однолетней расторопши содержат меньше жирных кислот с двойными связями, удаленными друг от друга метиленовой группой, чем семена двулетней 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 ранее, интенсивнее по окраске, чем самое верхнее, от силибина.

Резюмируя приведенные данные, следует заключить, 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 pH питательного раствора), так и более высоким количественным и качественным показателям получаемых семян.

Выделенные нами из бессмертника и расторопши флавоноидные смеси Ф1 (Фламин) и Силимарин были переданы на изучение их гепатопротекторных свойств в отдел биологии НТЦОФХ НАН РА. Заключение о результатах представлено в Приложении 1 диссертационной работы.

2.4. Осаин и помиферин – биологически активные вещества настойки плодов маклюры оранжевой

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 прениизофлавона, названных осаином и помиферином (рис.8). При исследовании осаина и помиферина в опытах *in vivo* и *in vitro* были выявлены антимикробное, антиоксидантное, кардиопротекторное, противоопухолевое свойства этих изофлавонов, более выраженные у помиферина. 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 ее к последующему предклиническому изучению в качестве потенциального официального средства.

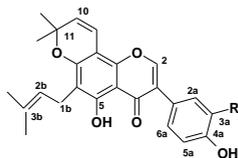


Рис.8. Структурные формулы осаина (5) ($R=H$) и помиферина (6) ($R=OH$)

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) 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 .

Часть плодов, после измельчения 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 укупили и хранили в затемненном месте при комнатной температуре (18 – 25 °С) 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, проветриваемом помещении до постоянной остаточной массы в $20 \pm 0.5\%$ от исходной, на что потребовалось 13 суток. Для получения хроматографически чистых осаина, помиферина и их смесей были использованы (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, 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°С и 3 мм Hg 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.9). 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 ^1H -ЯМР спектров с описанными в литературе.

Ниже приведены фиксированные нами характеристики ^1H -ЯМР спектров осаина (5) и помиферина (6) в растворе DMSO- d_6 :

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).



1 2 3

Рис.9. ТСХ: осаина(1), эстракта (2)и помиферина (3)

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

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 фламина, Силимарина и смеси осаин-помиферин.

Для измерения антирадикальной активности использовали ранее описанный спектрофотометрический метод. Определения проводились спектрофотометром Helios (Termo Electron corp.) при длине волны 515 нм. В качестве свободного радикала использовался 2,2-дифенил 1-пикрил гидразил (ДФПГ, C₁₈H₁₂N₅O₆, Sigma Aldrich GmbH, метанольный раствор которого имеет характерный максимум поглощения при 515 нм. Для приготовления растворов использовался дважды перегнаный, высушенный молекулярными ситами, абсолютный метанол.

Для корреляционных расчетов было использовано два метанольных раствора с известными концентрациямиДФПГ (20×10^{-5} г/л и 2×10^{-5} г/л), а также для расчетов уравнений корреляционных прямых использовалось уравнение прямой по координатам двух точек. 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 антирадикальной активности.

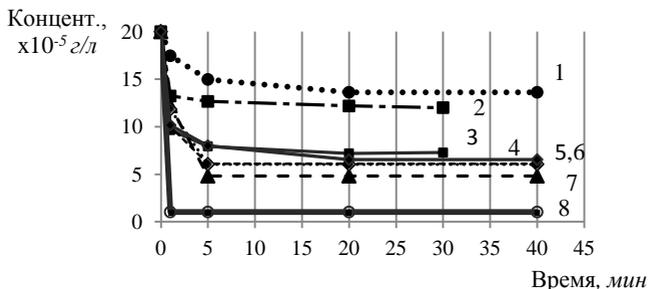


Рис.10. График фиксации антирадикальной активности: 1- Силимарина (3 мг); 2- смеси Силимарина с Фламином (1 мг); 3- смеси Силимарина с Фламином (3 мг); 4- Фламина (3 мг); 5- Помиферина (1 мг); 6 – смеси Осаина с Помиферином (1 мг); 7- Помиферина (3 мг); 8- смеси Осаина с Помиферином (3 мг).

Наиболее наглядно вышесказанное отражается на графике фиксации антирадикальной активности (Рис.10). 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 помиферина 1 мг (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 низкую активность.

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

Известно, что для нормального функционирования человеческого организма крайне важное значение имеет сбалансированный прием ненасыщенных и

насыщенных жиров. Особенно это касается содержания в жирах оптимального соотношения омега-3 и омега-6 жирных кислот. Омега-3 кислоты 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, 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 CCl_4 в соотношении 1:3). Известно также, что ^1H -ЯМР-спектры жиров (жирных масел) однотипны и состоят из восьми групп сигналов, соответствующих определенным структурным фрагментам жирных масел. Расположение сигналов структурных фрагментов масел в ^1H -ЯМР- спектрах можно представить в виде таблицы 3. Приведенное в таблице расположение сигналов водородных атомов свойственно только жирам и характеризует общность их химической (триацил глицероловой) структуры. Различие составов разных жиров отражается различием интегральных интенсивностей сигналов всех групп, за исключением группы 7. В качестве аргумента правомочности такого утверждения может служить ^1H -ЯМР спектр жирного масла семян шиповника (рис. 11).

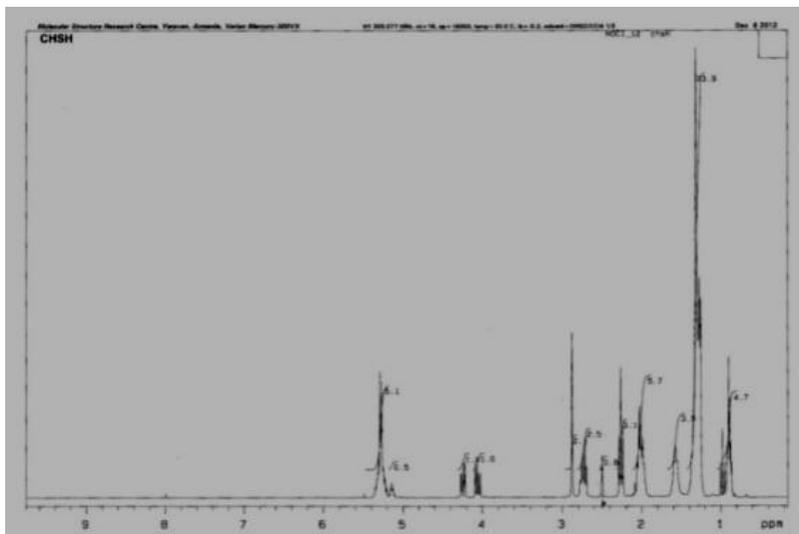


Рис.11. ^1H -ЯМР-спектр жирного масла семян шиповника

Одним из самых неизменных и постоянных сигналов в ^1H -ЯМР спектрах жиров являются сигналы группы 7 от двух метиленовых групп глицериновой части жиров, проявляющихся 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.11.). В спектрах масел, очищенных от липофильных примесей (от стеринов и свободных жирных кислот), соотношение интегральных интенсивностей глицериновых 2CH_2 -групп и суммы метильных групп приближается к соотношению 4:9.

Таблица 3.
Расположение сигналов структурных фрагментов жирных масел в ^1H - ЯМР- спектрах

Группы сигналов							
1	2	3	4	5	6	7	8
$-\text{CH}_3$	$-(\text{CH}_2)-$	Бета $-\text{CH}_2-\text{к}$ $\text{C}=\text{O}$		альфа- $\text{CH}_2-\text{к}$ $\text{C}=\text{O}$		2CH_2- Глиц.	(=) и $\text{CH}-$ глиц.
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.

В этом случае, по интегральным интенсивностям 2CH_2 -группы (J_7) и триплета омега-3 кислот (J_{tr}) 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.11 спектре интегральная интенсивность омега-3 триплета J_{tr} 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 вычислений двух значений содержания, а именно: $19.5 \pm 0.5\%$.

Подобным же образом мы определили содержание омега-3 кислот в семенах облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.), равное $27.4 \pm 0.8\%$, в семенах конопли (*Cannabis sativa* L.; $22.4 \pm 0.2\%$), в семенах Melissa (*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 из семян ряда бобовых, когда наблюдается существенная их загрязненность нежирномаслячными веществами, для вычисления содержания омега-3 ненасыщенных кислот считаем целесообразным допускать, что триплет, принадлежит лишь кислотам, связанным с глицерином. Такой подход даст возможность с приблизительно (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.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментальной части представлено как сырье используемое в экспериментах, использованные методы исследований, вещества и аппараты, так и методы выделения смесей флавоноидов из цветков бессмертника красноватого, смесей флаволигнанов из расторопши пятнистой и смесей пренилированных изофлавонов из маклюры оранжевой.

После описания методов и веществ представлены проведенные эксперименты разделенные на подглавы с той же последовательностью что и в обсуждении результатов экспериментальной части. В описании эксперимента в некоторых случаях представлены необходимые методы применяемые для изучения данного исследования.

Результаты экспериментов представлены в виде снимков ТСХ выделенных смесей и выделенных соединений, ЯМР спектров выделенных компонентов смесей, таблиц содержания жиров и смеси флаволигнанов, результатов изучения и определения антирадикальной активности исследованных веществ, а также таблиц с процентами содержания масел и омега-3 жирных кислот в семенах и плодах некоторых растений. Кроме того в экспериментальной части представлены спектры масел выделенных из 16 растений содержащих омега-3 жирные кислоты, с помощью которых так же были рассчитаны проценты содержания омега-3 жирных кислот в этих маслах и определена точность расчетов.

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 имеют 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, маклюры показано, что наибольшей антирадикальной активностью (94.8%) обладает пренилизофлавоном 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.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

1. **Անանիկյան Յ.Ս.**, Հովհաննիսյան Գ.Պ. Մնացականյան Վ.Յ. Անթառամ կարմրավուն և դորպե սլավոնի հևարավոր հոսմք: Հայաստանի պետական ճարտարագիտական համալսարանի «Լրաբեր» գիտական հոդվածների ժողովածու, 2013թ. մաս 2, էջ 663-669:
2. **Ананикян Г.С.**, Саргсян С.А, Мнацакян В.А. “Силимарин” расторопши из Арцаха. IV научная конференция Армянского химического общества (с международным участием). “Достижения и проблемы”. 7-11 октября 2014г., Ереван-Ванадзор. Материалы конференции, 2014, с.155.
3. **Ananikyan H.S.**, Mnatsakanyan V.A., Avetisyan M.V. 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. Armenia . p.138-140.
4. **Ананикян Г.С.**, Мнацакян В.А., Паносян Г.А., Саргисян С.А., Флаволигнаны расторопши Арцаха, Хим.ж.Армении, 2015, т.68, №1, с.51-56.
5. **Ананикян Г.С.** Ананикян В.В., Ерибемян М.И., Мнацакян В.А. Паносян Г.А.. Осаин и помиферин – биологически активные вещества настойки плодов маклюры оранжевой. Международ. журн. прикладных и фундаментальных исследований, 2015, №9 ч.4 с.673-675.
6. Мнацакян В.А., Ерибемян М.И., Ананикян В.В., **Ананикян Г.С.** “Некоторые результаты изучения химии растительного сырья. Сборник трудов НТЦОФХ “Некоторые успехи органической и фармацевтической химии”. 2015, выпуск 2, с.113-125.
7. Мнацакян В.А., **Ананикян Г.С.**, Бабахян 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. Междунаро д. журн. прикладных и фундаментальных исследований, 2015, №12, ч.8, с.1445-1447.

8. **Ананикян Г.С.** Сравнительный анализ антирадикальной активности флавоноидных компонентов соцветий бессмертника красноватого, плодов расторопши пятнистой и маклюры оранжевой. Хим.ж.Армении, 2016, т.69, № 1-2, с. 143-150.
9. **Ананикян Г.С.** Целесообразность определения содержания омега-3 ненасыщенных кислот в жирных маслах методом ЯМР ¹Н спектроскопии. Хим.ж.Армении, 2016, т.69, № 1-2, с.177-180.

ԱՆԱՆԻԿՅԱՆ ՀՐԱԶՅԱ ՄԻՄԱԿՈՆԻ

ՈՐՈՇ ԲՈՒՅՄԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՄԵՏԱԲՈՆ ԻՏՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒ ՄԵՎ ՈՒ ՍՈՒ ՄՆԱՄԻՐՈՒ Մ

Ամփոփագիր

Հանգուցային բառեր: *Ֆլավոնոնոիդներ, անթառամ կարմրավուն և, կարթնափուռ 2 պուլտավոր, մակլյունրա նարնջագույն, ճարպայուղեր, օմեգա-3 չհագեցած ճարպաթթուներ:*

Տվյալ առենախոսական աշխատանքի նպատակն էր՝ ուսումնասիրել Հայաստանի բնաշխարհում առկա երեք բույսերի՝ անթառամ կարմրավունի, կարթնափուռ 2 պուլտավորի, մակլյունրա նարնջագույնի, *Ֆլավոնոիդային միացությունները, ինչպես նաև ավելի քան 50 այլ բույսերի ճարպայուղերը: Նշված բույսերի այդ միացությունները օժտված են առողջասպահության համար արժեքավոր կենսաբանական ակտիվություն և այդ պատճառով գրավում են հետազոտողների ուշադրությունը: Օրինակ, անթառամ ավագային (Helichrysum arenarium) տեսակը հանդիսանում է հումք էղամուղ դեղամիջոց Ֆլամինի (Ֆլավոնոիդային միացությունների խառնուրդի) ստացման համար: Հայաստանի ֆլորայում անթառամի այդ տեսակը չի նկարագրված: Դրա փոխարեն ֆիքսված են վեց այլ վայրի աճող տեսակները, որոնցից առավել տարածված է անթառամ կարմրավուն տեսակը (Helichrysum rubicundum): Անթառամ կարմրավունի ծաղկազամբյուններից Ֆլամինի ստացման եղանակով մեկուսացվեց 6% ելքով Ֆլավոնոիդային նյութերի խառնուրդ, որը, ըստ նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի (ՆԾԸ) լիովին համապատասխանում է Ֆլամինին: Այնուհետև ստացված Ֆլավոնոիդային խառնուրդը մասնակիորեն ենթարկվեց բաժանման աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով և մեկուսացվեցին խառնուրդի երկու գլխավոր բաղադրիչներ ապիգենին և իգոսալիպուրպոզիդ: Ֆլավոնոիդները, որոնց իսկությունը հաստատվեց միջուկամագնիսական ռեզոնանսի (ՄՄՌ-ի) մեթոդով:*

Մյուս ուսումնասիրված բույսը Հայաստանում սակավ տարածված (հիմնականում Իջևանի շրջակայքում), բայց Արցախում լայնորեն տարածված՝ կաթնափուշ պուտավորն է (*Sylibum marianum*), իրենից ներկայացնում է երկամյա խոտաբույս, որի սերմերից ստանում են \$լավուլիզանային խառնուրդ՝ Սիլիմարին: Սիլիմարինը մի շարք հանրահայտ լյարդապաշտպանիչ դեղամիջոցների՝ Լեգալոնի, Կարսիլի, Սիլիբոբի, և այլ պրեպարատների «գործող» նյութն է: Հայտնի են կաթնափուշի մի քանի ենթատեսակներ, ըստ նրանց Սիլիմարինների բաղադրիչների քանակական հարաբերության: Արցախյան կաթնափուշը այդ տեսակետից ուսումնասիրված չէ, մինչդեռ առանց դրա դժվարանում է սվյալ բուսական հումքի շարժումը դեպի պաշտոնական բժշկագիտություն: Իրականացնելով այդպիսի ուսումնասիրություն, անջատելով \$լավուլիզանային խառնուրդը, ենթարկելով այն, բաժանման, ՆԾՔ և ՄՄՌ ուսումնասիրման, հայտնաբերվեց, որ կաթնափուշ պուտավորի արցախյան ենթատեսակը պատկանում է սիլիբինանային բեմոցեդին:

Այնուհետև, փորձարկվեց կաթնափուշի անցումը հիդրոպոնիկ եղանակով և ապացուցվեց հիդրոպոնիկ եղանակի առավելությունը կաթնափուշի լիարժեք սերմերի արտադրման գործում: Ցույց է տրվել, որ ստացված Սիլիմարինի ՆԾՔ պատկերը համեմատելի է Լեգալոնի հաբերից անջատված հանուկի ՆԾՔ-ի պատկերի հետ, ինչպես նաև Սիլիմարինից մեկուսացված երկու \$լավուլիզանները, ըստ ՄՄՌ-ի սիլիբին և սիլիբինանի միջություններն են:

Ուսումնասիրվել է երևանում ինտրոդուցված ամերիկյան ծառ՝ մակլյուրանարևազագույնի (*Maclura pomifera*) պտուղներից, ըստ ժողովրդական բժշկության դեղատոմսի պատրաստված ոգեթուրմի մեջ պրենիլիզոն \$լավուլիզանների (օսայինի և արմիֆերինի) խառնուրդի քանակը:

Կատարվել է երեք ուսումնասիրված բույսերից անջատված \$լավուլիզանային նյութերի համեմատական հակառադիկալային ակտիվության փորձարկումը 2,2-դիֆենիլ 1-պիկրիլ հիդրոզիլ ազատ ռադիկալի (DPPH) միջոցով: Հայտնաբերվել է, որ ամենաբարձր ակտիվությամբ օժտված է արմիֆերինը (94,8% ակտիվություն 1 րոպեում), օսայինը ակտիվ չէ, \$լավուլիզան և Սիլիմարինի ակտիվությունները հասունանում են 20-րդ րոպեում և չեն հասնում 50%-ի:

¹ՄՄՌ-սպեկտրոմետրիայի եղանակով ուսումնասիրվել են ավելի քան 50 տարբեր բույսերի սերմերից և որոշ պտուղներից անջատված ճարպայուղերը: Ինչպես սպասվում էր բոլոր նյութերի սպեկտրներում 0.5 մ.մ. – 5.5 մ.մ. դաշտում դիտվում են դասավորված ազդանիշների 8 խմբեր, որոնք, բացառությամբ 4.05 մ.մ. – 4.35 մ.մ. տիրույթում նկատված ազդանիշների, արտացոլում են ճարպայուղերի կազմում կապված ճարպաթթուների համապատասխան խմբերի ազդանիշները, այդ թվում 0.85 մ.մ. – 1.05 մ.մ. դաշտում գտնվում

են ճարպաթթուների մեթիլ խմբերի ազդանիշները: Օմեգա-3 չհագեցաց ճարպաթթուների մեթիլ խմբերի ազդանիշները միշտ դիտվում են 0.95 -1.02 մ.մ. տիրույթում տրիպլետի տեսքով, մնացած մեթիլ խմբերից մեկուսացված: Օգտագործելով այդ տրիպլետի ինտեգրալ ինտենսիվությունը և համեմատելով այն բոլոր մեթիլ խմբերի և գլիցերիլի 2CH₂ -խմբի ինտենսիվությունների հետ հաշվարկվել են օմեգա-3 թթուների տոկոսները ճարպայուղերի մեջ և առաջարկվել է ՄՄԻ եղանակով ճարպայուղերում օմեգա-3 ճարպաթթուների քանակական որոշման ճշտությամբ հաշվարկման մեթոդը:

ANANIKYAN HRACHYA

ISOLATION AND INVESTIGATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES OF SOME PLANTS

Summary

Key words: *Flavonoids, Helichrysum rubicundum, Silybum marianum, Maclura pomifera, fatty oils, omega-3 unsaturated fatty acids.*

Aim of the thesis was an investigation of biologically active flavonoidal compounds obtained from three plants: *Helichrysum rubicundum*, *Silybum marianum*, *Maclura pomifera* and investigation of fatty oils from other more than 50 plants seeds and fruits. Because of their biological properties and medical importance these compounds are in attention of scientists from all over the world. For example *Helichrysum arenarium* is an official raw material for a drug Flamin (mix of flavonoidal compounds). That species doesn't described in flora of Armenia. Instead, there are well described six other *Helichrysum* plant wild species that easily grow on armenian territory, and the prevalent one from them is *Helichrysum rubicundum*. Has been obtained flavonoidal extract from *Helichrysum rubicundum* flowers with 6% yield by Flamin drug technology. It have been shown that the thin layer chromatography (TLC) of that extract is identical to TLC of Flamin drug. Than from extract of *Helichrysum rubicundum* flowers have been obtained individual active compounds — apigenin and isosalipurposide flavonoids, these compounds have been identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method.

Also was investigated *Silybum marianum* plant, which isn't so widespread in flora of Armenia as on territory of Nagorno Karabakh Republic(NKR). *Silybum marianum* is a biennial plant and the seeds of this plant are an official raw material for mixture of flavolignans — Silymarin. Silymarin is a major component of many famous hepatoprotective drugs, such as Legalon, Carsil and Silybor. There are several types of Silymarin based on quantitative relations of main components — silybin and silydianin. The type of Silymarin from *Silybum marianum*, which is growing on Nagorno

Karabakh Republic territory, doesn't investigated, that fact impedes progress of it's usage in official medicine. Have been investigated seeds of *Silybum marianum* from NKR, obtained a extract of flavolignans, separated main components, analyzed by TLC and NMR methods. It has been shown that *Silybum marianum* from that territory is from silydianin chemorace.

Also has been studied a hidroponical grow of *Silybum marianum*. A usage of the hidroponical method for that plant has been proved, hidroponical *Silybum marianum* seeds contain more active components than seeds of the wild type of that plant. Have been shown that the pictures that we get by TLC of Legalon drug and obtained extract of flavolignans are identically the same. Also by NMR analysis proved that the components separated from obtained Silymarin is silybin and silydianin.

The prenylisoflavones composition from *Maclura pomifera* fruits, which were introduced in Yerevan, have been studied. It has been shown that the composition contains osajin and pomiferin and that the mixture of these two prenylisoflavones is about a 0.1% of the whole tincture, which have made by traditional medicine recipe. Rational isolation method (with 4% yield) of osajin and pomiferin purified mixture isolation from dried fruits have been suggested. Osajin and pomiferin have been separated from tincture and identified by NMR.

Antiradical activity of obtained osajin, pomiferin, Flamin, Silymarin with free 2,2 dipheny 1-1-picrylhydrazyl radical has been studied. Have been found out that most antiradical activity has the pomiferin (94.8 % in 1 min.), osajin itself doesn't have any antiradical activity, Silymarin and Flamin show antiradical activity at 20 min and it wasn't more than 50%.

¹H NMR spectras of fatty oils obtained from more than 50 different plant seeds, sometimes fruits, have been investigated. As it has been expected in area 0.5-5.5 p. p. m. of each spectra 8 groups of signals have been noticed. All this groups except group in area 4.05-4.35 p. p. m. describes signals of fatty acids in these oils. In 0.85-1.05 p. p. m. area signals of all methyl groups of fatty acids have located, but in area 0.95-1.02 p. p. m. have been noticed signals of methyl groups that belongs to omega-3 fatty acids, that signals have been noticed as a triplet separated from other methyl groups. By relations between intensity of that triplet, all methyl groups, glycerin's 2CH₂ groups have been calculated percents of omega-3 fatty acids in oils. Also has been suggested a method to define accuracy of omega-3 fatty acids per cent calculations using NMR spectroscopy.