

УДК 615.322

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2023.4.31 EDN: YJSBTZ

**ВЛИЯНИЕ БИОСТИМУЛЯЦИИ ТРАВЫ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ СВЕЖЕЙ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ СОКА**

© Черемных Е.В., Зорина Е.В., Белоногова В.Д.

Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия, 614990, Пермь, Полевая ул., 2

*Резюме*

**Цель.** Исследовать влияние низких положительных температур на химический состав сока травы манжетки обыкновенной и антиоксидантную активность.

**Методика.** Объектом исследования служили образцы соков, полученные из свежей травы манжетки без биостимуляции и после воздействия на сырье низкой положительной температуры (+4°C) в течение 7 и 14 суток. Качественный состав фенольных соединений в соках устанавливали, восходящей хроматографией на бумаге. Профиль фенольных соединений сока устанавливали методом ультраэффективной жидкостной хроматографии. Содержание сухого остатка и групп биологически активных веществ (БАВ) определяли фармакопейными методами, антиоксидантную активность (АОА) – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) – тестом.

**Результаты.** При биостимуляции сырья изменяется качественный состав фенольных соединений, увеличивается содержание флавоноидов и дубильных веществ в соке травы манжетки и повышается АОА. Продолжительность воздействия на сырье низких положительных температур имеет существенное значение. Биостимуляция в течение 7 дней показала наибольшее содержание фенольных соединений (идентифицировано 16 веществ) в соке и повышение АОА.

**Заключение.** Процесс биостимуляции сырья оказывает положительное влияние на качественный и количественный состав биологически активных веществ сока травы манжетки обыкновенной свежей, и способствует повышению АОА.

*Ключевые слова:* сок манжетки, биостимуляция, *Alchemilla vulgaris*, антиоксидантная активность

**BIOSTIMULATION OF FRESH HERBS *ALCHEMILLA VULGARIS* AND ITS EFFECT ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF JUICE**

Cheremnykh E.V., Zorina E.V., Belonogova V.D.

Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya St., 614990, Perm, Russia

*Abstract*

**Objective.** To investigate the effect of low positive temperatures on the chemical composition of the juice of the common herbs of the *Alchemilla vulgaris* and antioxidant activity.

**Methods.** The object of the study was juice samples obtained from fresh herb *Alchemilla vulgaris* without biostimulation and after exposure to raw materials at a low positive temperature (+4 ° C) for 7 and 14 days. The qualitative composition of phenolic compounds in juices was established by ascending chromatography on paper. The profile of the phenolic compounds of the juice was established by ultra-efficient liquid chromatography. The content of the dry residue and groups of biologically active substances (BAS) was determined by pharmacopoeial methods, the antioxidant activity (AOA) – 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPHG) - by a test.

**Results.** During biostimulation of raw materials, the qualitative composition of phenolic compounds changes, the content of flavonoids and tannins in the juice of herbs *Alchemilla vulgaris* increases and the AOA increases. The duration of exposure to low positive temperatures on raw materials is essential. Biostimulation for 7 days showed the highest content of phenolic compounds (16 substances were identified) in the juice and an increase in AOA.

**Conclusions.** The process of biostimulation of raw materials has a positive effect on the qualitative and quantitative composition of biologically active substances of fresh herbs *Alchemilla vulgaris* juice, and contributes to an increase in AOA.

*Keywords:* juice, biostimulation, *Alchemilla vulgaris*, antioxidant activity

## Введение

Интерес к изучению влияния стрессовых факторов на изменения химического состава растительного сырья вызван перспективами разработки лекарственных средств на основе метаболитов, образующихся в результате адаптивных реакций [1, 4, 5, 6]. Влияние низкой положительной температуры в условиях отсутствия света на фармакологическую активность сырья алоэ и других растений изучал В. П. Филатов в 30-х годах XX века, он же впервые ввел термин «биогенные стимуляторы». Можно предположить, что процессы, происходящие в изолированных тканях растения аналогичны происходящим в естественных местообитаниях под действием низких положительных температур. Многочисленными исследованиями показано, что стресс, вызванный низкими положительными температурами, приводит к генерированию в клетках растения активных форм кислорода, которые в свою очередь вызывают активацию защитной системы. Важными компонентами ответа (защитной реакцией) растения является индукция специфических ферментов (полифенолоксидазы, пероксидазы, каталазы и др.), катализирующих синтез вторичных метаболитов, поддерживающих баланс оксидант-антиоксидантной системы. Ферментативные трансформации претерпевают флавоноиды, дубильные вещества, аскорбиновая кислота, полисахариды [7, 10].

Современные исследования подтверждают изменения в химическом составе и биологической активности свежего сырья под периодическим влиянием низких положительных температур. Изменения носят индивидуальный характер и выражаются в повышении выхода фенольных соединений в листьях осины обыкновенной, экстрактивных и дубильных веществ в листьях ольхи, экстрактивных веществ в соке из листьев подорожника большого [1, 4, 5]. Содержание антиоксидантов – аскорбиновой кислоты и флавоноидов в листьях алоэ и каллизии душистой в стрессовых условиях (при температуре 4-8°C) увеличивалось, что по мнению авторов связано с адаптивной реакцией растений на стресс [6]. Изменения химического состава биостимулированного сока подорожника привело к повышению ранозаживляющей активности по сравнению с нативным соком [1].

Ранее нами показано, что сок из свежей травы *Alchemilla vulgaris* содержит широкий спектр биологически активных соединений [8]. В связи с вышеизложенным интерес вызывает изучение влияния биогенной стимуляции свежей травы манжетки на химический состав и антиоксидантную активность сока.

Цель исследования – изучить химический состав и антиоксидантную активность сока из свежей травы манжетки обыкновенной, подверженной периодическому воздействию низких положительных температур.

## Методика

Надземную часть манжетки обыкновенной заготавливали в период цветения и начала плодоношения на разнотравном луге с преобладанием в фитоценозе манжетки в Краснокамском районе Пермского края. Из свежего сырья получали образцы соков: 1. нативный сок (СН), свежее сырьё измельчали до частиц размером 3-5 мм, полученную массу отжимали через 4-5 слоев марли, далее консервировали 95% этиловым спиртом, отстаивали 10 суток при t+4°C после чего осадок отфильтровали через бумажный фильтр (образец сока получен из сырья без воздействия на него стрессовых факторов); 2. соки из биостимулированного сырья (СБ7 и СБ14), свежее сырьё манжетки, упакованное в полиэтилен, выдерживали в условиях отсутствия света при низких положительных температурах (при t + 4±2°C) в течение 7 и 14 дней. Соки получали аналогичным нативному соку способом.

Фенольные соединения исследовали методом восходящей хроматографии на бумаге в системах бутиловый спирт – уксусная кислота ледяная – вода очищенная (БУВ 4:1:5) и уксусная кислота ледяная – вода очищенная (УВ 15:85) на бумаге марки FN 1, плотностью 150 г/м<sup>2</sup>, производитель MUNKTEL & FILTRAK GmbH. Детектирование веществ, проводили по хроматографическим

характеристикам веществ и с применением детектирующих реагентов: пары аммиака, алюминия III хлорида спиртового раствора 2%. Идентифицировали зоны адсорбции по соответствию стандартным образцам рутина, хлорогеновой, кофейной и феруловой кислоты.

Профиль фенольных соединений сока травы манжетки обыкновенной биостимулированной в течение 7 дней определяли методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC/MS) на хроматографе Waters Acquity с диодно-матричным УФ-детектором и тандемным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters). Хроматографировали испытуемый раствор и растворы стандартов в следующих условиях: объем пробы 2 мкл и 5 мкл; колонка 0,21×15,0 см Acquity UPLC BEH C18 (1,7 мкм); температура колонки 35; скорость потока 0,25 мл/мин; градиентный режим хроматографирования формировался путем смешивания подвижных фаз А и В: подвижная фаза А (ПФ А) – смесь: вода очищенная – ацетонитрил (95 : 5) с муравьиной кислотой; подвижная фаза В (ПФ В): ацетонитрил с муравьиной кислотой. УФ-детекция: 220-500 нм. Условия МС: МС детекция в режиме позитивных ионов; параметры детектора: напряжение на капилляре +3 кВ; напряжение на конусе 50 В; температура капилляра 450; температура источника 120; скорость потока осушающего газа 800 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.; МС-детекция в режиме негативных ионов; параметры детектора: напряжение на капилляре -3 кВ; напряжение на конусе -30 В; температура капилляра 350; температура источника 120; скорость потока осушающего газа 500 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.

В соках, определяли содержание сухого остатка, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ, полисахаридов по фармакопейным методикам. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили дифференциальным спектрофотометрическим методом на приборе СФ-2000 при длине волны 405 нм, с использованием реакции комплексообразования с алюминия хлоридом [9].

Антиоксидантную активность (АОА) определяли радикал-нейтрализующим методом, с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). Вычисляли АОА исследуемых веществ по формуле  $АОА = (A_k - A_n/A_k) * 100\%$ ; где  $A_k$  – оптическая плотность раствора ДФПГ,  $A_n$  – оптическая плотность ДФПГ в присутствии испытуемого образца [2] и концентрацию сока, при которой АОА равна 50% ( $IC_{50}$  мг/мл).

Результаты исследования обрабатывали статистически: для каждой группы образцов сока рассчитывали среднее значение и среднее квадратичное отклонение, для оценки различий между группами использовали t критерий Стьюдента.

## Результаты исследования и их обсуждение

Влияние периодического воздействия стрессовых факторов (низких положительных температур и отсутствие света) на сырьё изучали на соках, полученных из сырья биостимулированного в течение 7 и 14 дней. Для фиксации изменения химического состава проводили сравнительное качественное и количественное исследование биологически активных веществ (БАВ).

На хроматограммах всех исследуемых соков обнаружили флавоноиды (флавоны, флавонолы, в том числе флавонол-3-гликозиды), изофлавоноиды, коричные и фенолкарбоновые кислоты, вещества фенольной природы неустановленной группы. В соке СН детектировано в системах БУВ и УВ по 21 веществу, в соке СБ7 – 18/24 соответственно, в СБ14 – 22/19 веществ. Сравнительный анализ характеристик зон адсорбции веществ соков показал различие в химическом составе, вне зависимости от принадлежности их к одной группе биологически активных веществ. В соках СН/СБ7 детектированы флавонол-5-гликозиды (система БУВ, Rf 0,46/0,44 соответственно), метилированные флавонолы (система УВ, Rf 0,10/0,10), флавонол-5-гликозиды (система УВ, Rf 0,30, 0,43, 0,50/0,30, 0,43, 0,44). В соках СН/СБ14 обнаружены флавоноиды с различными формами замещения фенольных групп (система БУВ, Rf 0,31/ 0,26, 0,45, 0,49, 0,77 соответственно), агликоны метоксифлавонолов (система УВ, Rf 0,01/0,01), флавоны без 5-ОН группы (система УВ, Rf 0,32/БУВ Rf 0,04). В соках СБ7/СБ14 детектированы агликоны флавонолов (система УВ, Rf 0,16/0,16) и агликоны метоксифлавонолов (система УВ, Rf 0,15, 0,23/0,26). Флаваноны (система БУВ, Rf 0,43), метоксифлавоны (система УВ, Rf 0,19), дигидрохалконы (система УВ, Rf 0,45) детектированы только в соке СН. Метилированные производные коричной кислоты (система БУВ, Rf 0,73) – только в соке СБ7. Агликоны флавононов с 3-ОН группой (система БУВ, Rf 0,10) и 3,5-диметоксифлавонолы (система УВ, Rf 0,76) – в соке СБ14. Идентичные характеристики на хроматограммах всех соков имели только вещества в системе БУВ 4:1:2 с Rf 0,16±0,00, соответствующие окисленным флавоноидам (флаванам или флавонолам), с Rf 0,26±0,01 – п-

кумаровой кислоте (или др. коричневыми кислотами), с  $R_f$   $0,80 \pm 0,01$  – фенолкарбоновыми кислотами и с  $R_f$   $0,84 \pm 0,01$  – изофлавоноидами. В системе УВ 15:85 идентичных веществ, присутствующих на хроматограммах всех соков не обнаружено.

В образцах соков из сырья подвергнувшегося 7-дневному воздействию низких положительных температур (биостимуляции) наблюдали достоверно большее содержание полифенолов: дубильных веществ и флавоноидов, но меньшее количество аскорбиновой кислоты в сравнении с нативным соком (СН). Содержание полисахаридов, и сухого остатка не имело достоверных отличий (табл. 1).

Таблица 1. Содержание биологически активных веществ и сухого остатка в соках из травы манжетки обыкновенной

Группа БАВ	Содержание БАВ, %		
	сок нативный	сок из сырья, биостимулированного 7 дней	сок из сырья, биостимулированного 14 дней
Аскорбиновая кислота	$0,052 \pm 0,003$	$0,046 \pm 0,002^*$	$0,050 \pm 0,006$
Флавоноиды	$5,8 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,7^*$	$6,4 \pm 0,6$
Дубильные вещества	$7,9 \pm 0,6$	$11,7 \pm 0,9^*$	$11,6 \pm 0,7^*$
Полисахариды	$55 \pm 9$	$51 \pm 6$	$43 \pm 5^*$
Сухой остаток	$6,9 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,3^* 2^*$

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  уровень различий в сравнении с соком нативным;  $2^*$  – при  $p < 0,05$  уровень различий в сравнении с соком из сырья биостимулированного 7 дней

Воздействие на сырье низких положительных температур в течение 14 дней привело к достоверному снижению содержания сухого остатка в СБ14 в сравнении с соками СН и СБ7. Содержание аскорбиновой кислоты и флавоноидов в СБ14 статистически значимо не отличалось от соков СН и СБ7. Количество дубильных веществ и полисахаридов в соках СБ14 и СБ7 находилось в одном диапазоне колебаний концентраций, но имело статистически значимое отличие от сока СН. В результате выявили, что наибольшее содержание дубильных веществ и флавоноидов характерно для всех образцов сока, сырьё которых подвергалось биогенной стимуляции.

Все исследуемые образцы соков из травы манжетки обыкновенной проявили антиоксидантную активность в тесте с ДФПГ, которая уступала веществу сравнения – аскорбиновой кислоте. Биостимуляция травы манжетки в течение 7 дней привела к достоверному увеличению антиоксидантной активности сока в сравнении с СН, более длительное воздействие (в течение 14 дней) низких положительных температур показало статистически более низкую АОА в сравнении с СБ7 (табл. 2).

Таблица 2. Антиоксидантная активность исследуемых соков

Образцы соков	IC <sub>50</sub> мг/мл	ED <sub>50</sub> мг
сок нативный	0,15-0,19	0,80-1,00
сок из сырья биостимулированного 7 дней	0,06-0,07 <sup>1*</sup>	0,30-0,40
сок из сырья биостимулированного 14 дней	0,10-0,11 <sup>2*</sup>	0,60-0,61
аскорбиновая кислота	$0,0041 \pm 0,2$	$0,0221 \pm 1,1$

Примечание: <sup>1\*</sup> – при  $p < 0,05$  уровень различий в сравнении с СН; <sup>2\*</sup> – при  $p < 0,05$  уровень различий в сравнении с СБ7

Природу фенольных соединений, содержащихся в соке из травы манжетки обыкновенной биостимулированной в течение 7 дней, определяли методом LC/MS. На основании масс-спектров при ионизации в позитивном и негативном режимах были предположены молекулярные ионы ( $M+H^+$ ,  $M+Na^+$  и  $M-H^-$ ) и молекулярный вес компонента, а по фрагментации и УФ-спектрам предположена структура агликона, входящего в состав молекулы. Использованы данные для пиков, имеющих площадь не менее 1% от суммы всех площадей при 260 нм. Полученные данные приведены в табл. 3.

В соке СБ7 идентифицировано 16 веществ фенольной природы: протокатеховая и эллаговая кислота, флавонолы – производные кверцетина и кемферола, флавононы, флавоны и метоксифлавоны производные апигенина.

Таблица 3. Фенольные соединения сока из травы манжетки биостимулированной 7 дней

Структурная формула / название вещества		
Protocatechuic Acid /Ellagic acid	Quercetin-3-O-glucuronide	Quercetin 3-O-glucuronilglucoside
Quercetin-3-O-arabinoglucoside	Rhamnazin	Rhamnazin-3-O-glucuronide
Rhamnetin-3-O-glucuronilglucoside	Rhamnetin-3-O-glucuronide	Kaempferol-3-O-glucuronide
Kaempferide-3-O-glucuronide	Apigenin-7-O-glucuronide	Methoxyapigenin-7-O-glucuronide
Hesperetin-7-O-glucuronide	Blumeatin B-3-O-dimethylramnosylglucuronide	Persicogenin-5-O-glucuronide

Преобладание производных кверцетина и кемферола согласуется с литературными данными, описывающими ферментативные превращения флавоноидов при окислительно-восстановительных реакциях инициированных низкими положительными температурами [7].

## Выводы

1. Воздействие низких положительных температур (биостимуляции) на траву манжетки обыкновенной свежую приводит к изменению качественного состава, количественного содержания биологически активных веществ и антиоксидантной активности соков, что подтверждает протекание адаптивных реакций в сырье под влиянием стрессового фактора.

2. Продолжительность биостимуляции сырья манжетки влияет на химический состав и антиоксидантную активность сока. Семидневная биостимуляция сырья манжетки является оптимальным периодом подготовки сырья. Полифенольные соединения, идентифицированные в соке биостимулированной травы манжетки, показывают перспективность дальнейшего изучения химического состава и фармакологической активности.

## Литература (references)

1. Бадальян З.В., Макарова Л.М., Погорелый В.Е. и др. Сравнительное фармакологическое изучение ферментированного сока подорожника // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – №10-3(129). – С. 121-123. [Badalyan Z.V., Makarova L.M., Pogorely V.E. et al. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Medicina. Farmaciya*. Scientific Bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy. – 2012. – N10-3(129). – P. 121-123. (in Russian)]
2. Варшавский Б.Я. Химия и биохимия свободно - радикального окисления. – Учебно-методическое пособие / Варшавский Б.Я., Галактионова Л.П., Ельчанинова С.А. – Барнаул, 2012 г. [Varshavsky B.Y. *Chemistry and biochemistry of free radical oxidation. Educational and methodical manual*. Varshavsky B.Y., Galaktionova L.P., Yelchaninova S.A. – Barnaul, 2012. (in Russian)]
3. Живетьев М.А., Рудиковская Е.Г., Дударева Л.В. и др. Влияние сезонного понижения суточных температур на суточную адаптацию и динамику биологически активных веществ в листьях лекарственных растений // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2013. – №3(1). [Zhivetyev M.A., Rudikova E.G., Dudareva L.V. et al. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya*. Izvestiya Irkutsk State University. Series: Biology. Ecology. – 2013. – N3(1). (in Russian)]
4. Нестеров Г.В., Литвинова Т.М., Кондрашев С.В. Влияние процесса ферментации на показатели качества листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.) Moench и *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2020. – Т.22, №3. – С. 67-71. [Nesterov G.V., Litvinova T.M., Kondrashev S.V. *Mediko-farmaceuticheskij zhurnal Pul's*. Medico-pharmaceutical journal Pulse. – 2020. – V.22, N3. – P. 67-71. (in Russian)]
5. Нехорошева А.В., Нехорошев С.В., Дренин А.А. и др. Влияние процесса ферментации на химический состав растительного сырья, получаемого из листьев осины обыкновенной // Химия растительного сырья. – 2019. – № 2. – С. 251-259. [Nekhorosheva A.V., Nekhoroshev S.V., Drenin A.A. et al. *Himiya rastitel'nogo syr'ya*. Chemistry of vegetable raw materials. – 2019. – N2. – P. 251-259. (in Russian)]
6. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Торопова А.А. и др. Химический состав сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* Wood.) и его антиоксидантная активность (in vitro) // Химия растительного сырья. – 2008. – №4. – С. 95-100. [Olennikov D. N., Zilfikarov I. N., Toropova A. A. et al. *Himiya rastitel'nogo syr'ya*. Chemistry of vegetable raw materials. – 2008. – N4. – P. 95-100. (in Russian)]
7. Червяковский Е.М., Курченко В.П., Костюк В.А. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т.4. – №1. – С. 9-26. [Chervyakovskiy E.M., Kurchenko V.P., Kostyuk V.A. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biohimicheskie i molekulyarnye osnovy funkcionirovaniya biosistem*. Proceedings of the Belarusian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular bases of functioning of biosystems. – 2009. – V.4, N1. – P. 9-269. (in Russian)]
8. Черемных Е.В., Зорина Е.В., Белоногова В.Д. Химический состав сока манжетки обыкновенной // Вестник ПГФА. – 2018. – Т.22, – С. 174-177. [Cheremnykh E.V., Zorina E.V., Belonogova V.D. *Vestnik PGFA*. Bulletin of the PGFA. – 2018. – T.22, – P. 174-177. (in Russian)]
9. Черемных, Е.В., Зорина Е.В., Белоногова В.Д. Аспекты стандартизации сока травы манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris*) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – 11(4). – С. 99-104. [Cheremnykh E.V., Zorina E.V., Belonogova V.D. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*. Drug development & registration. – 2022. – 11(4) – P. 99-104. (in Russian)]
10. Borges, Cristine & Minatel, Igor Otavio & Gomez Gomez, Hector & Lima, Giuseppina. (2017). Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. 10.1007/978-3-319-68717-9\_15.

### **Информация об авторах**

*Черемных Елена Васильевна* – ассистент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: chl1978@yandex.ru

*Зорина Елена Владимировна* – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: formularis@yandex.ru

*Белогова Валентина Дмитриевна* – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: belonogovavd@yandex.ru

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.06.2023

Принята к печати 15.12.2023