

УДК 615.32 + 582.565.2

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СОКА КАЛЛИЗИИ ДУШИСТОЙ (*CALLISIA FRAGRANS* WOOD.) И ЕГО АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ (*IN VITRO*)

© Д.Н. Оленников^{*1}, И.Н. Зилфикаров², А.А. Торопова¹, Т.А. Ибрагимов³

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047 (Россия) E-mail: oldaniil@rambler.ru

²Закрытое акционерное общество «Вифитех», к. №84 ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Московская обл., 142279 (Россия) E-mail: dagfarm@mail.ru

³ГОУ ВПО «Пятигорская государственная химико-фармацевтическая академия», пр. Калинина, 11, Пятигорск, 35753 (Россия) E-mail: aloefarm@mail.ru

В ходе изучения химического состава сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* Wood., «золотой ус», сем. Commelinaceae), установлено наличие в нем углеводов (полисахаридов и свободной глюкозы), аскорбиновой кислоты, аминокислот, фенолокислот (галловая, кофейная, цикориевая, феруловая), флавоноидов (кверцетин, кемпферол), кумаринов (умбеллиферон, скополетин), антрахинонов (алоэ-эмодин), тритерпеновых соединений (β -ситостерин) и холина. С применением ДФПГ-метода выявлена антирадикальная активность, обусловленная присутствием кумаринов, фенолокислот и аскорбиновой кислоты, а также обнаружена способность сока *C. fragrans* к связыванию ионов Fe^{2+} , молекул NO, радикалов $O_2^{\cdot-}$ и инактивации H_2O_2 .

Ключевые слова: каллизия душистая, *Callisia fragrans* Wood., антирадикальная активность, антиоксидантная активность.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, БАС – биологически активное соединение, БХ – бумажная хроматография, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография, Д – детектор, ДФПГ – дифенилпикрилгидразил, СВС – сухие вещества сока.

Введение

Каллизия душистая (*Callisia fragrans* Wood., «золотой ус», сем. коммелиновые – *Commelinaceae*) – культивируемое многолетнее суккулентное травянистое растение. Местообитание *C. fragrans* на родине – влажные леса юга Мексики, полуострова Юкатан и Гватемалы; чаще всего она встречается во вторичном лесу, на месте старых вырубок. В России *C. fragrans* выращивается как декоративное растение в домашних условиях; она хорошо культивируется в условиях теплицы [1].

Сведения о применении *C. fragrans* чрезвычайно обширны; с применением системы Google[®] на запрос по ключевому слову «золотой ус» предлагается более 400 тысяч ссылок. Средства массовой информации (печатные и электронные) рекомендуют данное растение для терапии практически всех известных заболеваний. Результатов целенаправленных фармакологических исследований *C. fragrans* и ее препаратов в доступной научной литературе нам обнаружить не удалось.

Данные о химическом составе *C. fragrans* также немногочисленны. Ранее был изучен состав нейтральных, глико- и фосфолипидов листьев, побегов и стеблей, доминирующими компонентами которых являются пальмитиновая, линолевая, олеиновая и линоленовая кислоты; также установлено присутствие каротиноидов (α -, β -каротины, неоксантин, антраксантин), хлорофиллов (a и b), аскорбиновой кислоты и антоцианов

* Автор, с которым следует вести переписку.

[2]. С применением метода ГХ/МС идентифицированы салициловая, ванилиновая и хлорогеновая кислоты, фитол, ванилин, биформен, сквален, лупеол и бетулин [3].

Целью настоящей работы является исследование качественного состава и количественного содержания биологически активных соединений сока *C. fragrans*, а также определение антиоксидантной активности в экспериментах *in vitro*.

Экспериментальные условия

Сырье *C. fragrans* (надземная часть) предоставлено экспериментальным хозяйством СГАУ им. Н.И. Вавилова (Саратов, Россия).

Извлечение сока осуществляли в лабораторных условиях вручную: для этого сырье измельчали на блендере, полученную массу отжимали через капрон и далее фильтровали через бумажный фильтр в вакууме. Полученный сок представлял собой прозрачную жидкость желтого цвета со слабым характерным запахом, содержание сухих веществ (СВС) 2,22%, плотность 0,986 г/см³. Выход сока ~80% от массы свежего сырья.

Фракционирование экстрактивных веществ. 21,5 л сока *C. fragrans*, полученного из 27 кг свежего сырья, концентрировали до объема 3 л и подвергали жидкофазной экстракции последовательно гексаном, хлороформом, этилацетатом и бутанолом. К водному остатку после жидкофазной экстракции приливали 95% спирт этиловый (1 : 5), выпавший осадок полисахаридов центрифугировали и высушивали сменой растворителей. Супернатант концентрировали до полного удаления спирта этилового и высушивали в вакуум-сушильном шкафу.

Для деминерализации и удаления полисахаридов 100 мл сока *C. fragrans* пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8 (Н⁺-форма, 1 × 20 см), элюировали 300 мл воды и концентрировали элюат до объема 50 мл. После чего к водному остатку приливали 95% спирт этиловый (1 : 5), выпавший осадок центрифугировали; супернатант концентрировали, высушивали и использовали в эксперименте (сок II).

В работе использовали следующие образцы СОВС: скополетин, умбеллиферон, алоэ-эмодин, аскорбиновая кислота, галловая, кофейная, цикориевая, феруловая кислоты, кверцетин, кемпферол, глюкоза (*Fluka*), β-каротин (*Acros Organics*), β-ситостерин, холин, таннин скумпии (*Aldrich*), а также дифенилпикрилгидразил (ДФПГ, *MP Biomedicals Inc.*), *o*-фенантролин, ионол (*Fluka*); остальные реактивы имели степень чистоты ч.д.а.

Для регистрации спектров поглощения использовали спектрофотометр *UV-Vis-mini (Shimadzu)*; для регистрации оптической плотности в кинетическом режиме – спектрофотометр *Cecil-2001*.

ВЭТСХ проводили на пластинах *Сорбфил ПТСХ-АФ-В (Сорбполимер)* в следующих условиях: антрацены – этилацетат–MeOH–H₂O (100 : 13,5 : 10) (Д: 5% КОН, УФ), тритерпеновые соединения – бензол–этилацетат (2 : 1) (Д: 20% H₂SO₄, УФ), фенолокислоты – этилацетат–толуол–НСООН–H₂O (100 : 5 : 10 : 10) (Д: NH₃, 5% FeCl₃, УФ), флавоноиды – этилацетат–НСООН–CH₃COOH–H₂O (100 : 11 : 11 : 26) (Д: 5% AlCl₃, УФ). Для определения компонентов, обладающих антирадикальной активностью, хроматограммы обрабатывали 0,02% раствором ДФПГ в 95% спирте этиловом.

Для анализа алкалоидов фракции хроматографировали на бумаге FN-16 (*Filtrak*) клиновидным способом в системе растворителей BuOH–CH₃COOH–H₂O (4 : 1 : 2), Д: 5% раствор рейнеката аммония в ацетоне.

ВЭТСХ-денситометрический анализ проводили с применением планшетного сканера *Mustek 2000* и программы для сканирующей денситометрии *TLC-Manager 3.1 (©PinSoft 2005)*.

ВЭЖХ. Анализ этилацетатной фракции проводили на жидкостном хроматографе *Gilston 305* с ручным инжектором *Rheodyne 7125*; колонка (250×4,6 мм) *Kromasil C18 (5 μ)*; подвижная фаза MeOH–H₂O–H₃PO₄ (80 : 120 : 1); T = 20 °C; скорость 0,8 мл/мин; УФ-детектор *Gilston UV/VIS 151*, λ = 254 нм. По 20 мкл исследуемого раствора (0,012% раствор в 70% спирте этиловом) и растворов сравнения (0,05% растворы в 70% спирте этиловом) вводили в хроматограф и хроматографировали.

Количественный анализ сока *C. fragrans* осуществляли с применением следующих методик: сухой остаток, зольность [4], органические кислоты [5], углеводы [6], фенолы [7], свободные аминокислоты [8], липиды общие – гравиметрическим методом после экстракции смесью CHCl₃–MeOH (3 : 1).

Антирадикальную активность определяли с применением ДФПГ-метода по методу *Seyoum* с соавт. [9], связывание супероксидных радикалов и инактивация пероксида водорода – по методу *Chen* с соавт. [10], связывание NO – по методу *Govindarajan* с соавт. [11].

Fe²⁺-хелатирующая способность. В центрифужную пробирку вместимостью 10 мл вносят 200 мкл исследуемого раствора и 25 мкл 0,003% раствора FeSO₄. Раствор термостатируют при 20 °C в течение 10 мин, после чего к нему приливают 3 мл 95% спирта этилового, встряхивают и центрифугируют при 3000 об/мин в

течение 10 мин. К 3 мл супернатанта приливают 200 мкл 0,005% раствора о-фенантролина в 95% спирте этиловом и определяют оптическую плотность раствора через 10 мин при длине волны 505 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный по аналогичной схеме без введения FeSO₄.

Результаты и их обсуждение

В результате фракционирования сока *C. fragrans* получено 6 фракций (табл. 1). Наибольший выход наблюдается для водной фракции, содержание которой составляет около 50% от массы сухих веществ.

Хроматографический анализ хлороформной фракции показал наличие в ней кумаринов и антрацен-производных. Содержание кумаринов в хлороформной фракции по данным ВЭТСХ-ДМ составляет 57,31% (концентрация в соке 32 мкг/мл) (рис. 1). В сравнении с хроматографической подвижностью СОВС идентифицированы скополетин и умбеллиферон в соотношении 1,0 : 3,1 (концентрация в соке 6,70 и 20,77 мкг/мл, соответственно), а также алоэ-эмодин в количестве 3,33% от массы фракции (концентрация в соке 1,81 мкг/мл).

В этилацетатной фракции методом ВЭЖХ обнаружено 12 соединений; из них идентифицировано 7 (рис. 2).

Доминирующим являются галловая и аскорбиновая кислоты (26,03 и 38,12% соответственно), содержание которых в соке *C. fragrans* составляет 7,62 и 5,21 мкг/мл соответственно.

В ходе исследования общего химического состава сока *C. fragrans* установлено наличие в нем углеводов (полисахаридов и свободной глюкозы), органических кислот, аминокислот, тритерпеновых соединений и алкалоидов; сердечные гликозиды и иридоиды не обнаружены (табл. 2). На долю углеводов, органических кислот и зольных элементов приходится до 95% от массы СВС; содержание остальных классов соединений не превышает 5%.

Таблица 1. Выходы фракций сока *C. fragrans* и их антирадикальная активность

Фракция	Выход, %		IC ₅₀ , мг/мл*
	от массы сока	от массы СВС	
гексановая	0,0003	0,025	-
хлороформная	0,0055	0,49	0,210
этилацетатная	0,02	1,49	0,024
бутанольная	0,04	3,07	0,087
полисахариды	0,21	18,41	> 10
водная	0,86	76,42	0,032
исходный сок	-	-	1,07**
сок II	-	-	0,98**

* – концентрация, вызывающая 50% улавливание радикалов ДФПГ; ** – в пересчете на СВС

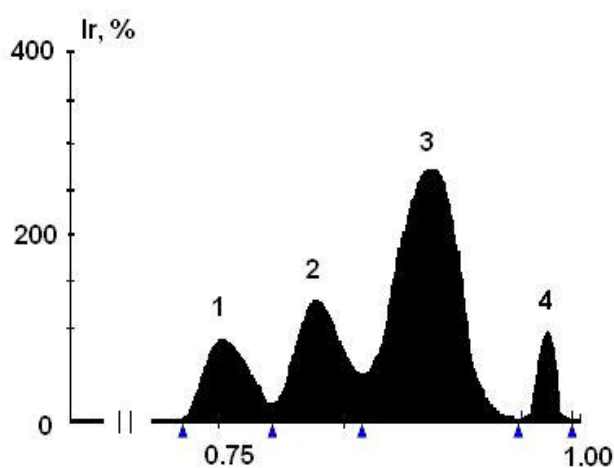


Рис. 1. Фрагмент хроматограммы хлороформной фракции сока *C. fragrans* (ВЭТСХ, участок с R_f 0,6–1,0): 1 – аскорбиновая кислота; 2 – скополетин; 3 – умбеллиферон; 4 – алоэ-эмодин; Iг – относительная интенсивность

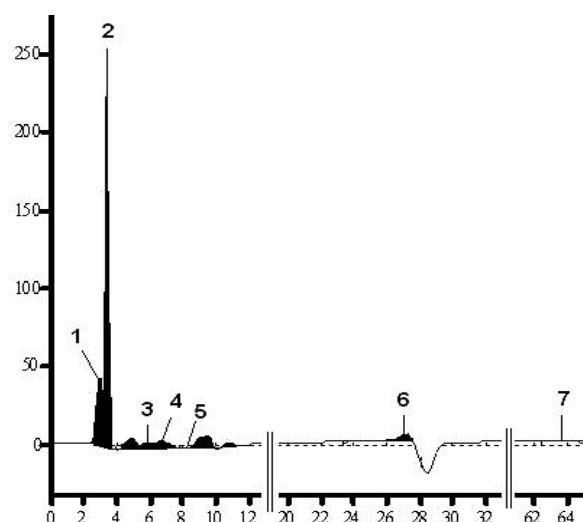


Рис. 2. Хроматограмма этилацетатной фракции сока *C. fragrans* (ВЭЖХ): 1 – аскорбиновая кислота; 2 – галловая кислота; 3 – кофейная кислота; 4 – цикориевая кислота; 5 – феруловая кислота; 6 – кверцетин; 7 – кемпферол

Таблица 2. Химический состав сока *C. fragrans*

Группа БАС	Идентифицировано	Концентрация, %	
		от массы сока	от массы СВС
Сухие вещества		2,22	100
Зольность		0,67	30,37
Аминокислоты		0,07	3,20
Углеводы	Свободные углеводы (глюкоза) / Полисахариды	0,56 / 0,05	25,13 / 2,44
	Общее содержание	0,61	27,57
Органические кислоты	Свободные / связанные	0,14 / 0,68	6,23 / 30,82
	Общее содержание	0,82	37,05
Фенольные соединения	Кумарины (умбеллиферон, скополетин)	0,0032	0,14
	Антрахиноны (алоэ-эмодин)	0,00018	0,008
	Фенолокислоты (галловая, кофейная, цикориевая, феруловая)	0,00975	0,37
	Флавоноиды (кемпферол, кверцетин)	0,00135	0,05
Липиды	Каротиноиды (β -каротин)		
	Тритерпеновые соединения (β -ситостерин)		
	Общее содержание	0,0047	0,21
Другие	Холин		+
Сердечные гликозиды, иридоиды		Не обнаружены	

Исследованиям активных форм кислорода (АФК) в последнее время уделяется особое внимание по причине их участия в ряде патологических процессов, связанных со свободно-радикальным окислением. К АФК, продуцируемым *in vivo*, относят супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2) и гипохлористую кислоту (НСЮ). $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 могут взаимодействовать в присутствии ионов переходных металлов (например Fe^{2+}), в результате чего образуются реакционноспособные гидроксирадикалы. Оксид азота (NO) является плейотропным медиатором некоторых физиологических процессов, но также он участвует в патогенезе воспаления и боли. Поэтому если развитие некоторых патологических процессов связано с дисбалансом между окислительным стрессом и антиоксидантной защитой организма, то существует вероятность ограничения окислительного повреждения введением веществ, способных связывать влияние АФК ($O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2), NO и ионов Fe^{2+} .

В экспериментах по определению антирадикальной активности (ДФПГ-метод) установлена величина 50% улавливания ДФПГ-радикалов, составляющая 1,07 мг/мл (табл. 1). После удаления из сока *C. fragrans* полисахаридов и зольных элементов активность незначительно увеличивается ($IC_{50} = 0,98$ мг/мл). Хлороформная фракция проявляет заметную выраженность действия ($IC_{50} = 0,21$ мг/мл); после проявления хроматограммы данной фракции раствором ДФПГ-радикала выявлены зоны наиболее активных соединений, идентифицированные со скополетином и умбеллифероном. Наибольшая активность отмечена для этилацетатной фракции ($IC_{50} = 24$ мкг/мл), действие которой обусловлено в большей степени присутствием галловой, аскорбиновой и кофейной кислот, что также подтверждено хроматографически (ВЭТСХ-ДФПГ).

При исследовании кинетических кривых связывания ДФПГ растворами сока *C. fragrans* выявлено дозозависимое действие: при концентрации сока в реакционной смеси 4,5 мг/мл его активность сопоставима с таковой растворов кверцетина в концентрации 0,01 мг/мл (рис. 3).

В экспериментах по определению способности сока *C. fragrans* связывать Fe^{2+} , $O_2^{\cdot-}$ и NO, а также инактивировать H_2O_2 , установлено наличие активности в отношении указанных частиц (рис. 4).

При исследовании Fe^{2+} -хелатирующей активности сока *C. fragrans* найдено, что величина IC_{50} составляет 0,79 мг/мл (ионол 0,15 мг/мл); для $O_2^{\cdot-}$ данная величина составляет 0,36 мг/мл.

Сок *C. fragrans* вызывает инактивацию H_2O_2 : IC_{50} составляет 0,57 мг/мл; аналогичные показатели для ионола и таннина составляют 0,46 и 0,75 мг/мл соответственно (рис. 4В). H_2O_2 является слабым окисляющим агентом, но при взаимодействии с ионами Fe^{2+} может приводить к образованию гидроксирадикалов, чем обусловлено его токсическое действие. Разрушение H_2O_2 наблюдается под влиянием некоторых ферментов (пероксидаза, каталаза), ионов металлов и фенольных соединений, присутствие которых, вероятно, является причиной активности сока *C. fragrans*.

По отношению к NO сок *C. fragrans* более активен ($IC_{50} = 2,96$ мг/мл), чем таннин ($IC_{50} = 3,50$ мг/мл) и несколько уступает по действию аскорбиновой кислоте ($IC_{50} = 1,28$ мг/мл).

Проведенные эксперименты показали, что сок *C. fragrans* проявляет свойства антиоксиданта, нейтрализуя влияние свободных радикалов, NO и ионов Fe^{2+} .

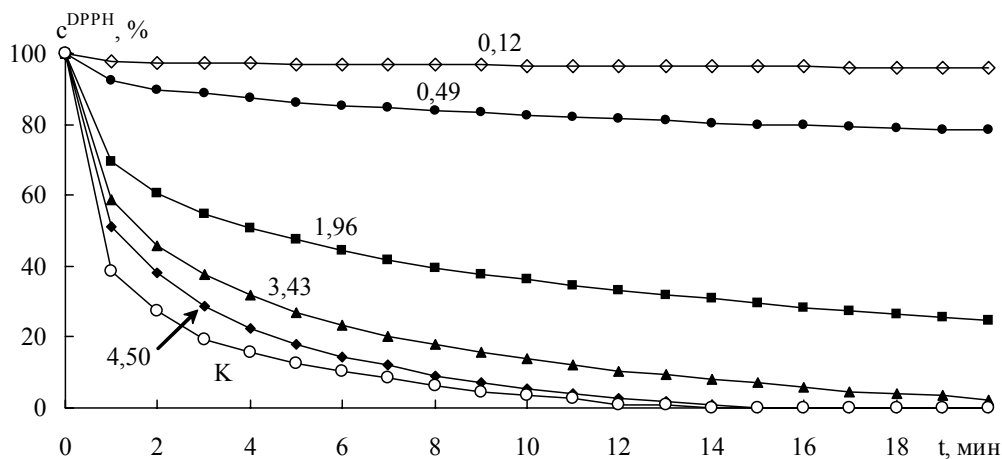


Рис. 3. Динамика связывания радикалов ДФПГ растворами сока *C. fragrans* (на рисунке указаны концентрации СВС в реакционной смеси в мг/мл, К – кверцетин, 0,01 мг/мл). $c^{\text{ДФПГ}}$ – концентрация ДФПГ в процентах по отношению к начальной, t – время

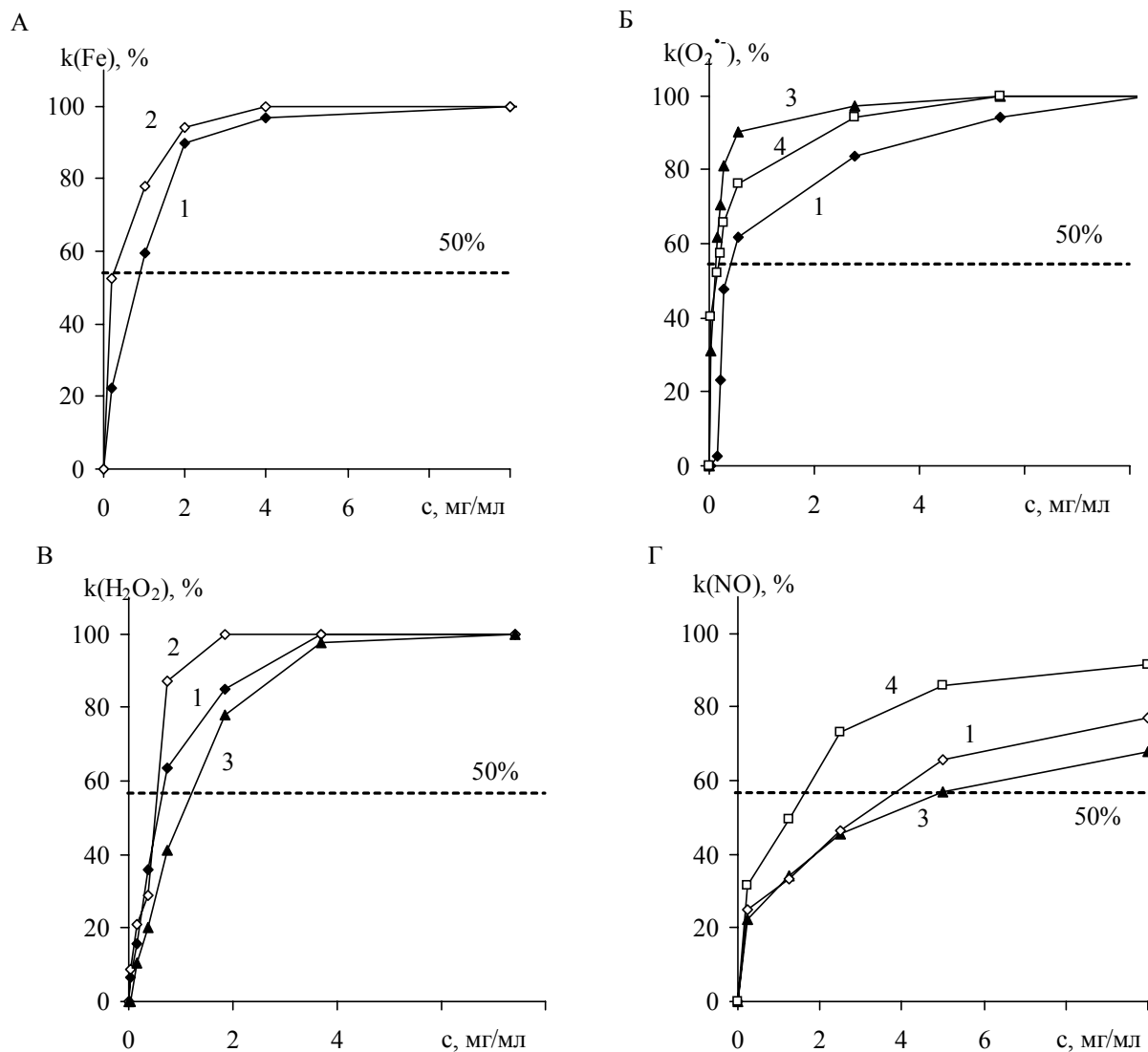


Рис. 4. Результаты экспериментов по определению связывания Fe²⁺ (А), O₂^{•-} (Б), H₂O₂ (В), NO (Г) соком *C. fragrans* (1) и стандартными антиоксидантами (ионол – 2, танин – 3, кислота аскорбиновая – 4). $k(\text{Fe}^{2+})$, $k(\text{O}_2^{\bullet-})$, $k(\text{H}_2\text{O}_2)$, $k(\text{NO})$ – степень связывания или инактивации по отношению к контролю

Выводы

В результате проведенных исследований сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* Wood., «золотой ус») установлен его химический состав, представленный разными классами соединений: углеводы, аминокислоты, органические кислоты, фенольные соединения, тритерпеновые соединения и алкалоиды. В составе фенольных соединений идентифицированы галловая, кофейная, цикориевая, феруловая кислоты, кверцетин, кемпферол, умбеллиферон, скополетин и алоэ-эмодин.

Методами *in vitro* выявлено наличие антирадикальной активности (ДФПГ-метод), а также установлена способность сока *C. fragrans* к связыванию ионов Fe^{2+} , молекул NO, радикалов $O_2^{\cdot-}$ и инактивации молекул H_2O_2 .

Полученные данные свидетельствуют о наличии у сока *C. fragrans* антиоксидантной активности, обусловленной присутствием фенольных соединений и аскорбиновой кислоты.

Список литературы

1. Семенова Л.В., Ямпольский Ю.В. Каллизия – *Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson – выращивание и использование // Лекарственные экзотические растения. Вып. 1. СПб., 2003. 125 с.
2. Черненко Т.В., Ульченко Н.Т., Глушенкова А.И., Реджепов Д. Химическое исследование *Callisia fragrans* // Химия природных соединений. 2007. №3. С. 212–213.
3. Кондратьева В.В., Курилов Д.В., Воронкова Т.В., Олехнович Л.С. и др. *Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson как продуцент физиологически активных соединений // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: тез. докл. межд. конф. Сыктывкар, 2007. С. 366–368.
4. Государственная фармакопея СССР. Изд. XI. Вып.2. М., 1990. 398 с.
5. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Николаева Г.Г., Маркарян А.А. Методика количественного определения суммарного содержания органических кислот в растительном сырье // Растительные ресурсы. 2004. Т. 40. Вып. 3. С. 112–116.
6. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов // Химия растительного сырья. 2006. №4. С.29–33.
7. Folin O., Ciocalteu V. On tyrosine and triptophane determination in proteins // Journal of Biological Chemistry. 1927. V. LXXIII. P. 627–650.
8. Пахомов В.П., Максимова Т.В., Никулина И.Н., Цыганков В.В., Хромова Л.В. Стандартизация рогов и пантов северного оленя. I. Количественное определение нингидринактивных веществ в порошке рогов северного оленя // Химико-фармацевтический журнал. 1997. №4. С. 53–54.
9. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. Structure-radical scavenging relationships of flavonoids // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 2058–2070.
10. Chen A.-S., Taguchi T., Sakai K., Kikuchi K., Wang M.-W., Miwa I. Antioxidant activities of chitibiose and chititriose // Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2003. V. 26. P. 1326–1330.
11. Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gagenticum* // Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2003. V. 26. P. 1424–1427.

Поступило в редакцию 1 апреля 2008 г.