

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

## ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СЫРЬЕ *IRIS SIBIRICA* L. СОРТ СТЕРХ В СРАВНЕНИИ С ИНТАКТНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

© *Е.А. Антипова<sup>1</sup>, Л.Е. Кудрикова<sup>1</sup>, Л.И. Тихомирова<sup>2\*</sup>, Н.Г. Базарнова<sup>2</sup>, М.Ю. Чепрасова<sup>2</sup>, Е.П. Харнумова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Алтайский государственный медицинский университет, пр. Ленина, 40, Барнаул, 656038 (Россия)

<sup>2</sup>Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия), e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Выращивание растительного сырья в искусственных условиях неизбежно приведет к изменению качественного и количественного состава вторичных метаболитов в сравнении с составом растений, полученных в почвенных условиях. Для получения альтернативного качественного лекарственного растительного сырья разработана биотехнология на основе клонального микроразмножения и гидропонического выращивания некоторых видов лекарственных растений. Целью данного исследования являлось изучение содержания фенольных соединений в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* сорт Стерх в сравнении с интактными растениями.

В качестве объектов исследования использовали растения, размноженные микроклонально (растения-регенеранты), которые далее выращивали в условиях гидропоники (гидропонные). Интактные растения заготавливали в поле в возрасте шести лет. В результате исследования в сырье *Iris sibirica* L. Сорт Стерх, выращенном в различных условиях, были найдены следующие группы биологически активных соединений, соответствующие роду *Iris* L.: фенилпропеновые кислоты (кумаровая и феруловая кислота и их производные), флавоноиды (С-гликозид апигенина, апигенин-7-О-гликозид), изофлавоноиды, фенолокислоты (ванилиновая кислота), негидролизующие флавоноиды-гликозиды (гликозиды кемпферола и апигенина), стильбены. Качественный состав биологически активных соединений (БАС) ириса сибирского Стерх зависел от условий выращивания, при этом наиболее близким к интактным растениям по содержанию БАС находится биотехнологическое сырье (гидропонные растения). Это позволяет считать биотехнологию получения сырья *Iris sibirica* L. на основе гидропонного выращивания, сопряженного с микроклональным размножением альтернативным способом.

*Ключевые слова:* *I. sibirica* L., вторичные метаболиты, растения-регенеранты, гидропонные растения, интактные растения, биотехнология получения лекарственного растительного сырья.

### Введение

Фенольными соединениями принято называть метаболиты, молекулы которых содержат бензольное ядро с одной или несколькими гидроксильными группами. В современной химии природные фенольные соединения называют полифенолами. Выделяют несколько групп полифенолов: соединения С<sub>6</sub>-ряда (простые фенолы), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>1</sub>-ряда (фенольные кислоты), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>2</sub>-ряда (фенолспирты, фенилуксусные кислоты, ацетофенон), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>3</sub>-ряда (фенилпропаноиды), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>4</sub>-ряда (нафтохиноны), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>-ряда (бензофеноны и ксантоны), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-ряда (стильбены), соединения С<sub>6</sub>-С<sub>3</sub>-С<sub>6</sub>-ряда (флавоноиды, изофлавоноиды и неофлавоноиды) и полимерные фенольные соединения (гидролизующие дубильные вещества, негидролизующие дубильные вещества, лигнины, меланины). Являясь постоянными и универсальными компонентами растительных тканей, фенольные соединения несут значительную функциональную нагрузку: участвуют в процессах дыхания, играют важную роль в окислительно-

---

Антипова Екатерина Алексеевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации, e-mail: lek212@mail.ru

Кудрикова Людмила Евдокимовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации, e-mail: lek212@mail.ru

Окончание на С. 240.

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

восстановительных и защитных реакциях, оказывают влияние на ростовые процессы растений и т.д. [1, 2]. Помимо задач, выполняемых в организме растений, вторичные метаболиты проявляют широкий спектр биологической активности и входят в состав многих лекарственных препаратов. Так, мангиферин (ксантоновый гликозид) является основным компонентом препарата Алпизарин, выпускаемого в России, – противовирусного средства для лечения инфекции, вызванной вирусом герпеса [3, 4].

Фенольные кислоты, особенно ванилиновая, *p*-гидроксibenзойная, протокатеховая, галловая, обнаружены практически у всех исследованных покрытосеменных растений. Фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты, гидроксикоричные спирты), класс растительных органических соединений ароматического ряда характерным структурным фрагментом является бензольное кольцо с присоединенной к нему неразветвленной трехуглеродной цепью. К гидроксикоричным кислотам относятся: *p*-гидроксикоричная, или п-кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая.

Гидроксикоричные кислоты имеют выраженную физиологическую активность и являются природными антиоксидантами. Они проявляют слабые бактериостатические свойства, обладают противовоспалительным, гепатопротекторным (хлорогеновая, кофейная, феруловая кислоты) и иммуностропным (хлорогеновая, кофейная кислоты), желчегонным, антимикробным, антимикозным, радиопротекторным (феруловая кислота) [5, 6]; противовирусным, противовоспалительным и антикомплемментарным действиями (розмариновая кислота) [7].

Флавоноиды широко распространены в природе, их содержат почти все высшие растения. Это самый обширный класс фенольных соединений вторичных метаболитов. Флавоноиды находятся в разных частях растений, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах. В меньшем количестве они содержатся в стеблях и подземных органах. Флавоноиды могут присутствовать в растениях, как в свободном, так и в связанном виде. Они образуют огромное число разнообразных гликозидов. Изофлавоноиды встречаются в растительном мире реже флавоноидов. Помимо семейства *Fabaceae*, изофлавоноиды обнаружены в семействах *Iridaceae*, *Rosaceae*, *Moraceae*, *Amaranthaceae*, *Podocarpaceae* [2]. Апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоноид) – широко встречающийся в природе растительный флавоноид, обладающий противовоспалительными, антиоксидантными и противоопухолевыми свойствами. Апигенин-7-О-β-глюкозид известен как апигентрин, а апигенин, связанный с молекулой глюкозы на 6-углероде, создает 6-С-β-глюкозид, или изовитексин (сапонаритен). Известно, что гликозиды встречаются в тканях активного роста (листья, бутоны, цветки), агликоны – в одревесневших тканях (кора, корни) [2].

Стильбены представляют собой дифенилэтилены. Распространение стильбенов исследовано в меньшей мере, чем других классов растительных фенолов. В некоторых растениях они играют роль фитоалексинов (компоненты системы устойчивости растений к болезням, естественные растительные антибиотики). Установлена антибактериальная, антифунгальная, антитромбозная, гипогликемическая активность резвератрола. На основе стильбена синтезирован ряд эстрогенных препаратов. Некоторые синтетические производные стильбена выступают как ингибиторы образования гормонов: фосфоэстрол, хлортрианазен [8].

Производство вторичных метаболитов с применением плантационного выращивания растений имеет ряд недостатков, таких как низкий выход биологически активных соединений, влияние сезонных и географических условий внешней среды на накопление биомассы. С использованием метода культивирования тканей и органов растений создан ряд клеточных и тканевых технологий, позволяющих получить ценные вторичные продукты метаболизма растений, такие как гликозиды, алкалоиды, некоторые другие биологически активные вещества, имеющие широкое применение в качестве лекарственных препаратов, пищевых красителей, ароматизаторов и др. [9]. В настоящее время существует ряд промышленных производств на основе культур клеток высших растений: в США (ESC genetic), в Корее (Samyang Genex). Однако несмотря на десятилетия интенсивной работы, подобных успешных примеров относительно немного. Основная причина – сложность получения эффективного штамма продуцента, и решение этого вопроса – ключевая проблема развития современных клеточных технологий [10].

Такие биотехнологические подходы, как гидропонные технологии, имеют потенциал для крупномасштабного выращивания растений и производства вторичных метаболитов. Микроразмножение дает возможность получить здоровый посадочный материал в необходимом коли-

---

Тихомирова Людмила Ивановна – кандидат биологических наук, заведующая отделом биотехнологии растений ЮСБС АлтГУ, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Базарнова Наталья Григорьевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой органической химии, декан химического факультета, e-mail: bazarnova@chemwood.asu.ru

Чепрасова Марина Юрьевна – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии, e-mail: marinacheprasova@yandex.ru

Харнutowa Елена Павловна – кандидат химических наук, доцент кафедры физической и неорганической химии, e-mail: harnutova@chem.asu.ru

честве, независимо от времени года, в том числе многолетних и трудноразмножаемых видов. Сочетание этих двух технологических подходов позволяет разработать биотехнологию производства лекарственного растительного сырья с заданным содержанием БАС [11].

Ирисы – перспективные лекарственные и декоративные многолетние растения, синтезирующие широкий спектр биологически активных веществ [12-15]. В настоящее время описаны клеточные культуры *Iris ensata* и *I. germanica*, биосинтезирующие полифенольные метаболиты. Группой немецких ученых была получена клеточная культура *I. pseudacorus*, являющаяся источником вторичных метаболитов класса терпеноидов [16–18].

Выращивание растительного сырья в искусственных условиях, по нашему мнению, неизбежно приведет к изменению качественного и количественного состава вторичных метаболитов в сравнении с составом растений, полученных в почвенных условиях. В связи с этим целью данного исследования являлось изучение содержания фенольных соединений в сырье *Iris sibirica* сорт Стерх, полученного на основе гидропонники, сопряженной с клональным микроразмножением, в сравнении с интактными растениями.

### **Экспериментальная часть**

*Растительный материал.* Сорт *I. sibirica* Стерх зарегистрирован в 2001 г. НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко, автор З.В. Долганова. В качестве объектов исследования использовали растения, размноженные микроклонально (растения-регенеранты), которые далее выращивали в условиях гидропонники (гидропонные) в отделе биотехнологии растений Алтайского государственного университета. Шестилетние интактные растения заготавливали в окрестностях г. Новоалтайска Алтайского края в 2015 г. Сырье, выращенное в различных условиях, представлено корневищами с корнями и листьями. Таким образом, в общей сложности изучено шесть видов сырья.

*Методика исследования* [19]. 1 г сухого растительного сырья, измельченного до размера частиц не более 2 мм, помещали в коническую колбу со шлифом. Экстракцию проводили трижды при нагревании на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин, последовательно прибавляя по 30 мл спирта этилового 70%. Извлечение фильтровали через фильтр «белая лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл. Три полученных извлечения объединяли. После охлаждения объем объединенного извлечения доводили до метки спиртом этиловым 70%. Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Известно, что биологически активные соединения в растениях могут находиться в свободном виде и в виде гликозидов. Гликозиды, как правило, неустойчивы и подвергаются гидролизу в кислой среде, распадаясь на агликон и сахара. Также при гидролизе разрушаются сложноэфирные связи БАС. Ряд гликозидов (С-гликозиды), являясь прочными соединениями, в условиях гидролиза сохраняются, а при экстракции гидролизата диэтиловым эфиром остаются в водной среде. Для изучения природы гликозидных связей БАС проводили гидролиз спиртового извлечения, продукты гидролиза извлекали диэтиловым эфиром, исследовали эфирное извлечение и водный остаток.

10 мл полученного спиртового извлечения помещали в коническую колбу, прибавляли 3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и проводили нагревание на водяной бане с обратным холодильником в течение 1.5 ч. После охлаждения гидролизат экстрагировали диэтиловым эфиром трижды по 20 мл. Эфирные фракции объединяли и упаривали досуха на водяной бане при температуре 40 °С, сухой остаток растворяли в 5 мл спирта этилового и исследовали методом ВЭЖХ.

Кислую водную фазу после извлечения эфиром нейтрализовали гидрокарбонатом натрия до pH 5–7, фильтровали и исследовали.

Исследование выполняли с помощью микроколоночного жидкостного хроматографа «МилиХром А-02» («ЭкоНова», Новосибирск, Россия) с УФ-детектором, хроматографической колонкой 2.0 × 75 мм и сорбентом NucleoSIL-120-5-C18 с размером частиц 5 мкм. В качестве элюента А применяли трифторуксусной кислоты раствор 0.01%, в качестве элюента Б – ацетонитрил. Осуществляли градиентное элюирование (Б: 5–55%), скорость подачи элюента – 100 мкл/мин, объем анализируемой пробы – 2 мкл. В качестве детектора использовали многлучевой спектрофотометр. Детектирование веществ на хроматограммах проводили при длинах волн 220, 254, 268, 300, 324, 360 нм, регистрацию УФ-спектров выполняли в режиме остановки потока элюента. Соединения идентифицировали по временам удерживания ( $t_R$ ) и УФ спектрам поглощения, сравнивая с их аналогичными показателями стандартных образцов «Sigma-Aldrich» и литературными данными.

### Обсуждение результатов

Данная работа является продолжением исследований по изучению биохимического состава сырья *I. sibirica* [20–22].

#### Растения-регенеранты *I. sibirica* сорт Стерх

**Результаты анализа извлечений из корневищ с корнями растений-регенерантов.** На хроматограмме обнаружено 10 пиков веществ. Пик с временем удерживания  $t_R=12$  мин соответствует ванилиновой кислоте. УФ-спектры веществ 3, 4, 6, 7, 8 с  $t_R=14.9$ ; 17.3; 18.3; 21.3; 22.8 мин имеют максимумы поглощения в диапазоне длин волн 255–270 нм, что характерно для изофлавоноидов. Спектр вещества с  $t_R=22.8$  мин близок к спектру изофлавоноида – формонетина. Наличие изофлавоноидов является характерным признаком многих растений рода Ирис [23, 24]. Пик вещества 5 с  $t_R=17.5$  мин по УФ спектру соответствует производному феруловой кислоты, а соединения 9 с  $t_R=28$  мин – флавоноидам группы флавона (рис. 1).

При исследовании гидролизата корневищ с корнями *I. sibirica* методом ВЭЖХ и СФМ в УФ-области удалось идентифицировать ванилиновую, кумаровую и феруловую кислоты. Водорастворимых веществ в количестве, достаточном для исследования нашими методами, не найдено.

**Результаты анализа извлечений из листьев растений-регенерантов.** В спиртовом извлечении удалось идентифицировать флавоноиды группы флавона и фенольные соединения. Также в извлечении обнаружены пики веществ с временами удерживания 17 и 20 мин, спектры которых представлены на рисунке 2 (а, б). Подобные вещества найдены и в других ирисах [24] и предположительно отнесены нами к группе стильбенов.

В гидролизате извлечения из листьев ириса обнаружили кумаровую и феруловую кислоты, а также агликон флавоноида – производного флавона. В водной фазе после экстракции эфиром идентифицирован С-гликозид апигенина – изовитексин ( $t_R=15.5$  мин) (рис. 2в).

Таким образом, при проведении исследования в корневищах с корнями растений-регенерантов *I. sibirica* сорт Стерх обнаружены: ванилиновая кислота, изофлавоноиды и их гликозидные формы, флавоноиды группы флавона и производные фенилпропеновых кислот. В листьях найдены: флавоноиды группы флавона, одним из которых является изовитексин, фенилпропаноиды (кумаровая и феруловая кислоты) и неидентифицированные вещества, предположительно – стильбены [1, 25].

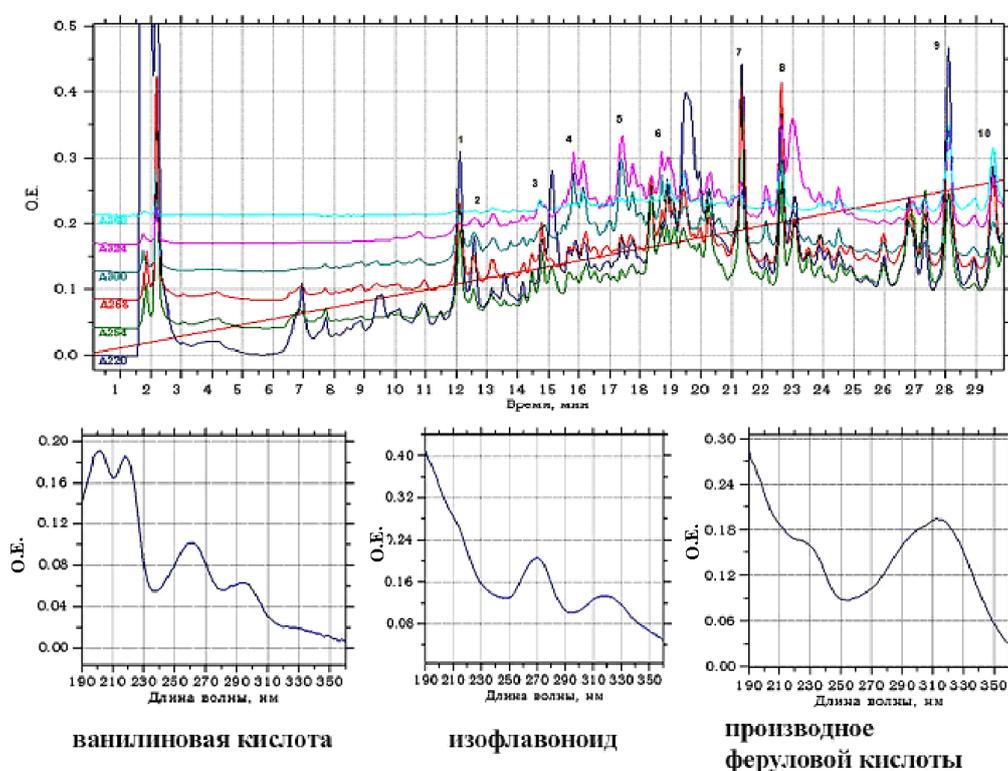


Рис. 1. Хроматограмма спиртового извлечения корневищ с корнями растений-регенерантов *I. sibirica* сорт Стерх и спектры поглощения некоторых БАС

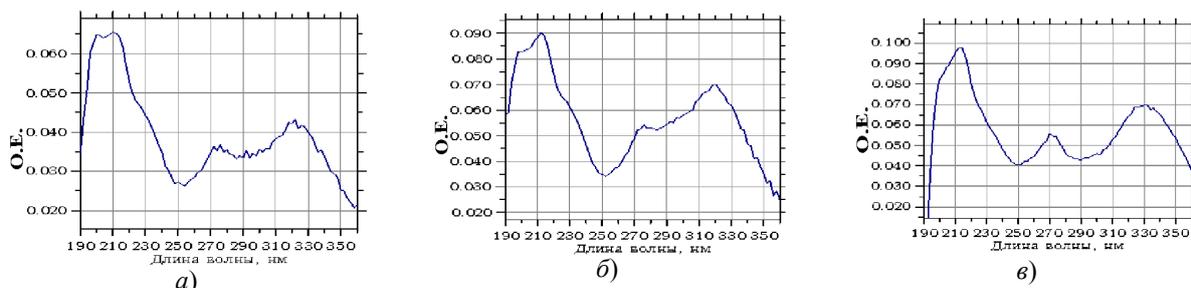


Рис. 2. а), б) спектры неидентифицированных соединений, возможно, стильбенов:  $t_R=17$  мин;  $t_R=20$  мин. в) спектр поглощения изовитексина, извлеченного из листьев растений-регенерантов

### Гидропонные растения *I. sibirica* сорт Стерх

*Результаты анализа извлечений из корневищ с корнями гидропонных растений.* При исследовании спиртового извлечения корневищ с корнями ириса зарегистрировано 4 больших пика: пик вещества с  $t_R=12$  мин – ванилиновая кислота, вещества с  $t_R=17$ ; 19; 20 мин по совпадению УФ спектров отнесены к производным кумаровой кислоты. В ходе исследования гидролизата спиртового извлечения из корней и корневищ ириса зарегистрировано 5 пиков: вещество с  $t_R=12$  мин – ванилиновая кислота, вещество с  $t_R=15$  мин – кумаровая кислота, соединения с  $t_R=16$ ; 17 и 26.3 мин по характеру спектров поглощения нами определены как производные кумаровой кислоты (рис. 3).

Водная фаза после извлечения продуктов гидролиза диэтиловым эфиром не содержит достаточного количества БАС для исследования нашими методами.

*Результаты анализа извлечений из листьев гидропонных растений.* При изучении хроматограммы спиртового извлечения листьев было обнаружено 9 выраженных пиков веществ. Вещества с временами удерживания  $t_R=14.1$ ; 15; 16.5; 18 и 19 мин имеют УФ-спектры поглощения, соответствующие флавоноидам группы апигенина, причем один из них по времени удерживания ( $t_R=16.5$  мин) идентифицирован нами как апигенин-7-О-гликозид. Вещества, пики которых имеют времена удерживания 17.0 и 21.2 мин и спектры с максимумами поглощения при длинах волн 280 и 320 нм, предположительно отнесены к производным стильбена – галофилолам (рис. 4), эти вещества характерны для ряда растений рода Ирис [14, 26]. Вещества с  $t_R=11.6$  и 20.1 мин идентифицировать не удалось.

В гидролизате извлечения из листьев обнаружены продукты гидролиза и дегидратации сахаров. Пиков других веществ не было найдено.

Изучен состав водорастворимых веществ (негидролизующих С-гликозидов флавоноидов и др.). В ходе исследования водной фазы на хроматограмме зарегистрировано 5 пиков веществ: пик вещества 2 с временем удерживания  $t_R=13.5$  мин по спектру соответствует гликозидной форме кемпферола, пик вещества 3 ( $t_R=15.5$  мин) – доминирующий пик, по спектру и времени удерживания соответствует изовитексину, пик 4 с  $t_R=16$  мин соответствует другому С-гликозиду апигенина, структуру которого установить не удалось, пик вещества 5 с  $t_R=17$  мин соответствует по спектру производным стильбена (рис. 5).

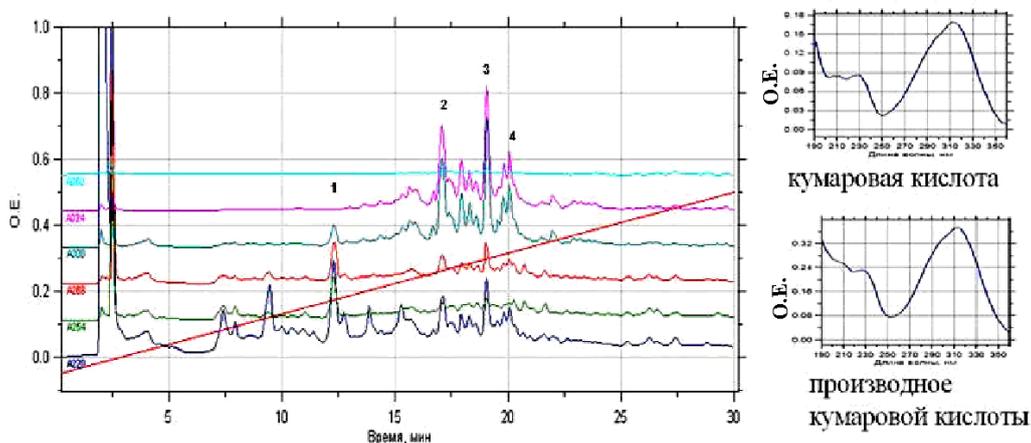


Рис. 3. Хроматограмма спиртового извлечения корневищ с корнями гидропонных растений *I. sibirica* сорт Стерх. Спектры поглощения продуктов гидролиза спиртового извлечения  $t_R=15$  мин – кумаровая кислота;  $t_R=17$  мин – производное кумаровой кислоты

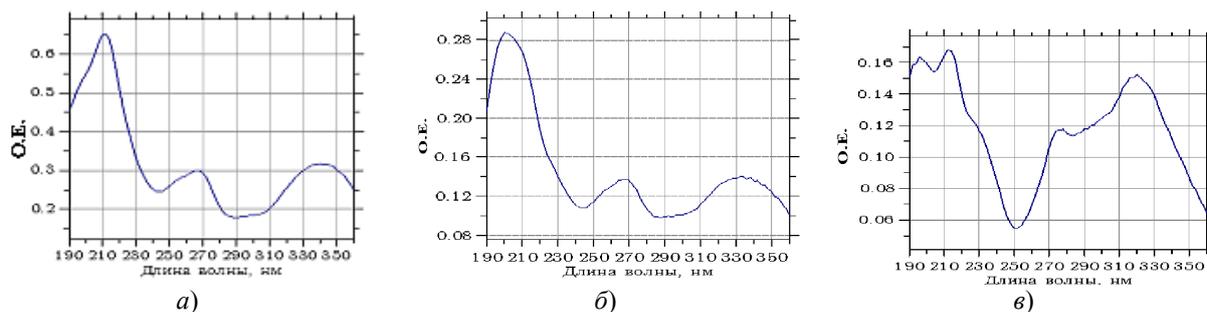


Рис. 4. Спектры поглощения веществ спиртового извлечения листьев гидропонных растений *I. sibirica* сорт Стерх с временами удерживания: а)  $t_R=15$  мин – флавоноид группы апигенина (доминирующий пик на хроматограмме); б)  $t_R=16.5$  – апигенин-7-О-гликозид; в)  $t_R=17$  мин – производное стильбена

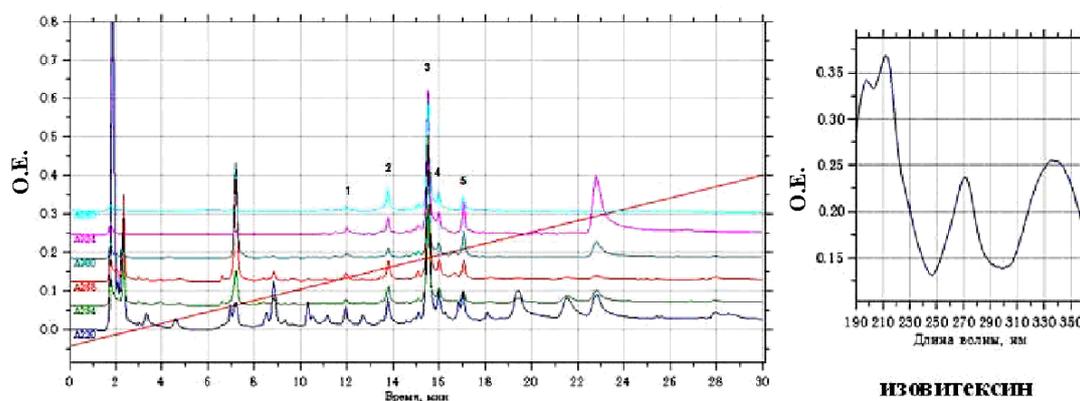


Рис. 5. Хроматограмма негидролизующихся соединений листьев гидропонных растений *I. sibirica* сорт Стерх. Спектр поглощения изовитексина (пик  $t_R=15.5$  мин)

Таким образом, химический состав БАС листьев ириса сибирского Стерх, выращенного на гидропонике, представлен преимущественно С-гликозидами флавоноидов. В листьях ириса сибирского Стерх обнаружены флавоноиды групп кемпферола и апигенина в форме О- и С-гликозидов, причем преобладают негидролизующиеся С-гликозиды – изовитексин и другие. Найденные вещества, предположительно, производные стильбена. В корнях ириса содержатся фенолпропановые кислоты: кумаровая, феруловая и их производные, ванилиновая кислота.

#### Интактные растения *I. sibirica* сорт Стерх

*Результаты анализа извлечений из корневищ с корнями интактных растений.* В ходе исследования спиртового извлечения зарегистрировано множество пиков. У веществ основных пиков регистрировали спектры поглощения. Большинство пиков имеют спектры, соответствующие спектрам фенолпропановых кислот: пик с временем удерживания  $t_R=15$  мин – кумаровая кислота,  $t_R=16.3$  мин – феруловая кислота, пики с  $t_R=17.9$ ; 19; 19.5; 20.7 мин – производные кумаровой кислоты. Вещество с  $t_R=12$  мин идентифицировано как ванилиновая кислота, а вещество с  $t_R=27.5$  мин – как изофлавоноид (рис. 6).

В процессе исследования гидролизата спиртового извлечения корней зарегистрировано 5 пиков: вещество с  $t_R=12$  мин – ванилиновая кислота, вещества с  $t_R=15$ ; 16; 22.5; 26 мин идентифицированы как кумаровая кислота и ее производные.

При ВЭЖХ-исследовании водного остатка после экстракции продуктов гидролиза на хроматограмме выраженных пиков не обнаружено.

*Результаты анализа извлечений из листьев интактных растений.* В ходе исследования спиртового извлечения листьев на хроматограмме было зарегистрировано 9 выраженных пиков. Вещества, соответствующие пикам с временами удерживания  $t_R=10.7$ ; 11.4; 12.9; 13.5; 15.0; 16.5 мин, по характеру спектров поглощения были отнесены к группе флавоноидов производных флавона. Относительно небольшие времена удерживания дают возможность утверждать, что эти флавоноиды находятся в форме гликозидов (рис. 7).

Вещество, пик которого имеет время удерживания  $t_R=17$  мин, предположительно отнесен к производным стильбена – галофилолам.

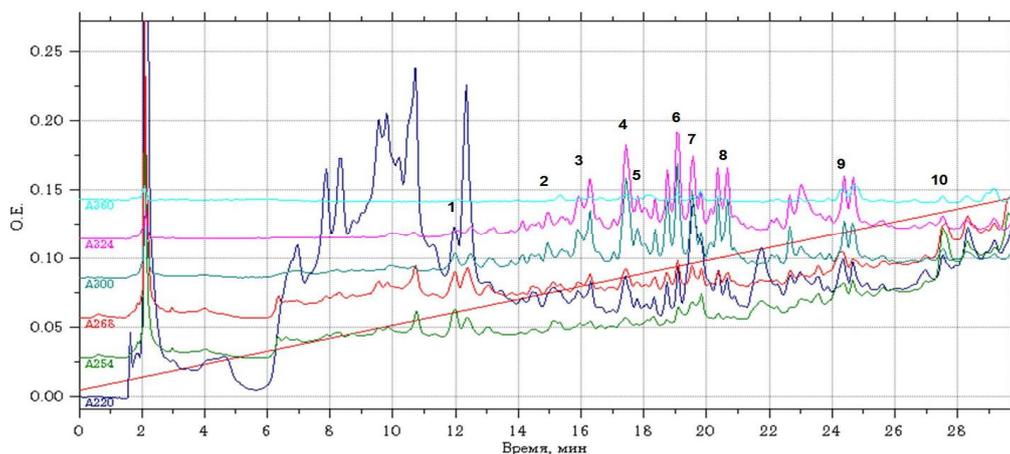


Рис. 6. Хроматограмма спиртового извлечения из корней с корневищами интактных растений *I. sibirica* сорт Стерх: 1 – ванилиновая кислота, 2 – кумаровая кислота, 3 – феруловая кислота, 4, 9 – вещества неустановленной природы, 5, 6, 7, 8 – производные кумаровой кислоты, 10 – изофлавоноид, возможно – текторигенин

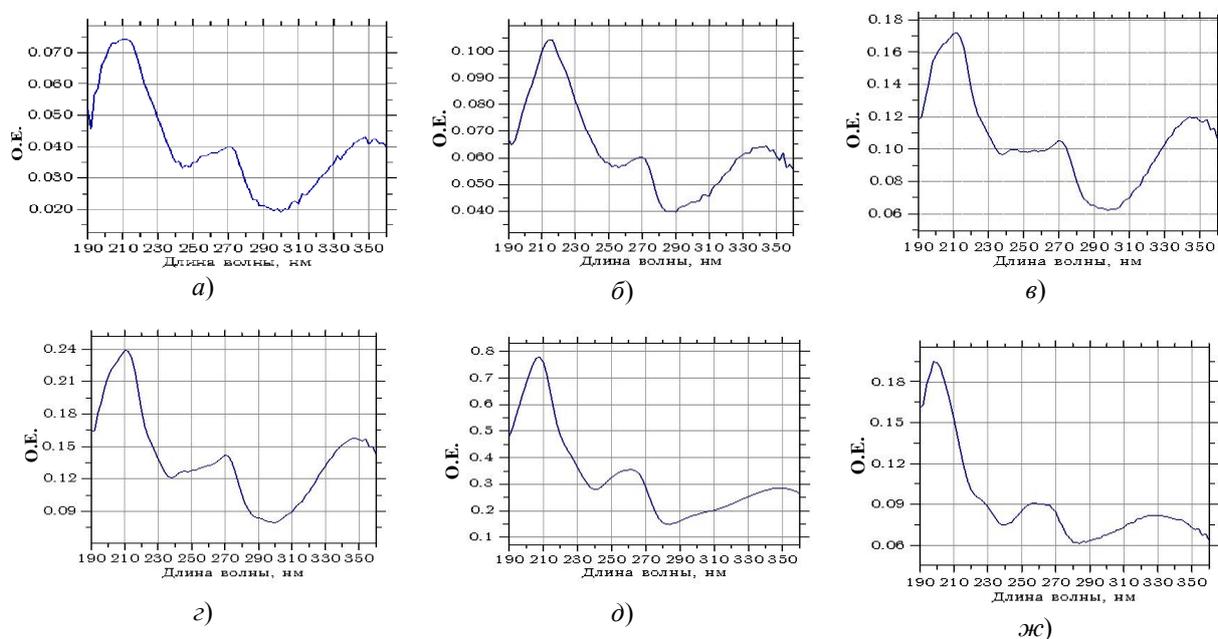


Рис. 7. Спектры поглощения веществ спиртового извлечения листьев интактных растений *I. sibirica* сорт Стерх с временами удерживания: а), б), в), г), д), ж) – гликозидные формы кемпферола, апигенина и лютеолина ( $t_R=10.7; 11.4; 12.9; 13.5; 15.0; 16.5$ )

Для изучения природы гликозидных связей проводили солянокислый гидролиз спиртового извлечения, продукты гидролиза извлекали диэтиловым эфиром. При исследовании гидролизата на хроматограмме было зарегистрировано три выраженных пика с временами удерживания  $t_R=15, 16$  и  $26$  мин. По характеру УФ-спектров и временам удерживания первые два пика были идентифицированы как кумаровая и феруловая кислоты, третий пик по характеру спектра отнесен к производным кумаровой кислоты. Однако пиков агликонов флавоноидов не было найдено. Следовательно, гликозиды флавоноидов листьев *I. sibirica* сорт Стерх полному гидролизу до агликонов не подвергаются. Устойчивость флавоноидов-гликозидов ириса подтвердилась при исследовании водного остатка после извлечения продуктов гидролиза.

В ходе изучения водорастворимых соединений (гликозидов флавоноидов и др.) зарегистрировано пять пиков. Спектры поглощения и времена удерживания веществ трех пиков ( $t_R=10.7; 11.4; 13.5$  мин) совпадают с временами удерживания и спектрами веществ спиртового извлечения листьев ириса. Эти вещества были идентифицированы как гликозидные формы лютеолина и кемпферола. Три пика с временами удержи-

вания 12.9; 15.0 и 16.5 мин исчезли. Появилось два новых пика флавоноидов с временами удерживания 11.9 и 15.5 мин, причем пик ( $t_R=15.5$  мин) по спектру поглощения и времени удерживания соответствует стандартному образцу изовитексина.

Таким образом, в листьях ириса сибирского сорт Стерх найден С-гликозид апигенина – изовитексин, негидролизуемые С-гликозиды флавоноидов группы апигенина, лютеолина и кемпферола, фенолпропаноиды: кумаровая и феруловая кислоты и неидентифицированное вещество, предположительно из группы стильбенов.

Для получения активно пролиферирующей культуры *I. sibirica* сорт Стерх в культуру *in vitro* вводили фрагментами цветка. Полученные побеги размножали и укореняли на агаровых средах с минеральной основой MS в соответствии с разработанной технологией [11]. Далее укорененные растения-регенеранты выращивали в гидропонной установке «Cutting Board» в питательном растворе на основе жидкой MS, содержащей 1/4 состава макро- и микросолей, полный набор витаминов, хелата железа и кальция хлористого [27].

Из доступной нам литературы известны результаты анализа растительного сырья дикорастущего вида *I. sibirica*, собранного в естественных условиях обитания [15]. Результаты, представленные в настоящей работе, являются первыми исследованиями качественного состава БАС растительного сырья, полученного на основе гидропонии, сопряженной с клональным микроразмножением, выполненные с помощью микроколонного жидкостного хроматографа.

Согласно данным источников литературы, содержание органических и оксикоричных кислот в растительных объектах зависит от различных онтогенетических и климатических факторов [28]. При этом различие будет наблюдаться как в качественном, так и в количественном соотношении. Л.К. Асланянц и ее коллегами в листьях дикорастущего вида *I. sibirica* найдены фенолкарбоновые кислоты (кофейная, синаповая, п-кумаровая, феруловая), флавоноиды (кверцетин, мирицетин), антоцианы (дельфинидин, цианидин) [12]. Нами в извлечениях из корней растений-регенерантов, так же как из интактных *I. sibirica* сорт Стерх, обнаружены феруловая, кумаровая и ванилиновая кислоты. В корнях гидропонных растений выявлены следующие фенолпропаноиды: ванилиновая и кумаровая кислоты. В связи с тем, что ванилиновая кислота является промежуточным продуктом биоконверсии феруловой кислоты в ванилин, можно предположить присутствие феруловой кислоты в корнях гидропонных растений. В извлечениях из корней и корневищ выявлены неидентифицированные производные фенолпропаноидов. В листьях гидроксикоричные кислоты (феруловая и кумаровая) обнаружены у растений-регенерантов и интактных, у гидропонных растений выявить не удалось (табл.). Таким образом, содержание феруловой, кумаровой, ванилиновой кислот является сортовым признаком *I. sibirica* сорт Стерх независимо от способа получения растительного сырья.

В траве ранее изученного ириса сибирского (гибрид *I. sibirica* из селекционного фонда З.В. Долгановой, НИИСС) установлено присутствие флавоноидов: рутина, кверцетрина и монозида мирицетина. Определено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин  $1,97 \pm 0,23$  [29]. Флавоны в видах рода *Iris* преимущественно находятся в форме 6-С-гликозидов. Так, изоориентин и изовитексин обнаружены в растениях подрода *Limniris* (*I. rossii*, *I. ensata*) и *Iris* (*I. pseudopumila*, *I. albicans*) [1]. В наших исследованиях гликозид апигенина апигентрин (апигенин-7-О-гликозид) обнаружен в листьях гидропонных растений, а изовитексин (С-гликозид апигенина) найден во всех листьях растений разного способа выращивания. При этом изовитексин образует самый большой пик хроматограммы извлечения гидропонных листьев. Вероятно, это связано с условиями выращивания, а именно составом питательного раствора на основе среды MS, которая содержит много неорганического азота, что стимулирует процессы органогенеза (табл.).

Гликозидные формы флавоноидов лютеолина и кемпферола обнаружены в листьях только интактных и гидропонных растений. Необходимо отметить, что самый большой пик извлечения интактных листьев идентичен спектру гликозидов кверцетина – гиперозиду или кверцетрину, но в отличие от них не распадается при гидролизе до кверцетина, остается в гликозидной форме, частично изменяя свою структуру (табл.).

В спиртовых извлечениях корней растений-регенерантов и интактных ирисов обнаружены изофлавоноиды, предположительно, формонетин и текторигенин (табл.).

Впервые нами выделены стильбены из листьев *I. sibirica*: растений-регенерантов, гидропонных и интактных растений (табл.). Биологическая роль стильбенов разнообразна. Поэтому поиск сырьевых источников, разработка методов выделения, установление структуры и биологической активности стильбенов с целью создания новых лекарственных препаратов весьма актуально.

Синтез и накопление вторичных метаболитов зависит от стадии развития растения. Молодые растения-регенеранты *I. sibirica*, выращиваемые с добавлением фитогормонов, находятся в стадии активного роста и размножения адвентивными побегами. Их возраст после укоренения не превышает 2–3 месяцев. Высаженные в гидропонику эти растения продолжают расти в течение 6 месяцев. По своему развитию гидропонные растения находятся ближе к интактным. За время доращивания в гидропонике корневища и корни одревесневают, листья становятся жесткими. Доказано, что химический состав листьев ириса, выращенного на гидропонике, сходен с химическим составом листьев интактных растений, отличался наличием гидролизуемых производных апигенина. Химический состав листьев растений-регенерантов отличался от интактных растений и выращенных на гидропонике меньшим разнообразием флавоноидов. В корнях интактных растений и регенерантов найдены изофлавоноиды – вещества, соответствующие роду *Iris* L., а в ирисе, выращенном на гидропонике, изофлавоноиды не обнаружены. Корни ириса интактного не содержали водорастворимых соединений.

Но тем не менее нами было установлено, что корни растений, выращенных различными способами, содержали идентичные БАС: ванилиновую кислоту, фенилпропаноиды (феруловая, кумаровая кислоты) и их производные, в листьях найдены негидролизуемые флавоноиды-гликозиды, стильбены, флавоноид изовитексин, кумаровая кислота.

#### Содержание полифенолов в сырье *Iris sibirica* L. Сорт Стерх

Вторичные метаболиты	Растения-регенеранты		Гидропонные		Интактные	
	корневища с корнями	листья	корневища с корнями	листья	корневища с корнями	листья
Фенолокислоты						
Ванилиновая кислота	+	–	+	–	+	–
Кумаровая кислота	+	+	+	–	+	+
Феруловая кислота	+	+	–	–	+	+
Производные гидроксикоричных кислот (фенилпропаноиды)	+	+	+	–	+	+
Флавоноиды						
Изовитексин (С-гликозид апигенина)	–	+	–	+	–	+
Апигенин-7-О-гликозид				+		
Негидролизуемые флавоноиды-гликозиды						
Гликозиды кемпферола	–	–	–	+	–	+
Гликозиды апигенина	–	–	–	+	–	+
Неидентифицированные флавоноиды-гликозиды	–	+	–	+	–	+
Изофлавоноиды						
Изофлавоноиды	+	–	–	–	+	–
Стильбены						
Стильбены	–	+	–	+	–	+

Примечание. «–» – вещество не обнаружено.

#### Заключение

В результате исследования в сырье *Iris sibirica* L. Сорт Стерх, выращенном в различных условиях, были найдены следующие группы БАС, соответствующие роду *Iris* L.: фенилпропеновые кислоты (кумаровая и феруловая кислоты и их производные), флавоноиды (С-гликозид апигенина, апигенин-7-О-гликозид), изофлавоноиды, фенолокислоты (ванилиновая кислота), негидролизуемые флавоноиды-гликозиды (гликозиды кемпферола и апигенина), стильбены. Качественный состав биологически активных соединений ириса сибирского Стерх зависел от условий выращивания, при этом наиболее близким к интактным растениям по содержанию БАС находится биотехнологическое сырье (гидропонные растения). Это позволяет считать биотехнологию получения сырья *Iris sibirica* L. на основе гидропонного выращивания, сопряженного с микрорациональным размножением альтернативным способом.

## Список литературы

1. Тарбеева Д.В. Полифенольные метаболиты *Iris pseudacorus* L. и его клеточной культуры: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 2016. 126 с.
2. Борисова Г.Г., Ермошин А.А., Малева М.А., Чукина Н.В. Основы биохимии вторичного обмена растений. Екатеринбург, 2014. 128 с.
3. Минина С.А., Абу Схела Г.Р., Астахова Т.В., Пряхина Н.И., Зенкевич И.Г., Косман В.М. Технология получения сухого экстракта из надземной части касатика молочно-белого // Химико-фармацевтический журнал. 1999. №4. С. 40–42.
4. Минина С.А., Пряхина Н.И. Исследование химического состава настойки и шрота из травы касатика молочно-белого // Растительные ресурсы. 2003. №3. С. 99–105.
5. Wei Y., Shu P., Honga J. Qualitative and quantitative evaluation of phenolic compounds in *Iris dichotoma* // Pall. Phytochem Anal. 2012. Vol. 23. Pp. 197–207. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.1343>.
6. Seki K., Tomihari T., Haga K. *Iris tectorene* B, a monocyclic triterpene ester from *Iris tectorum* // Phytochemistry. 1994. N36. Pp. 433–438.
7. Марчишин С.М., Козачок С.С. Определение гидроксикоричных кислот в антиаллергическом сборе методом ВЭЖХ // Медицина и образование Сибири. 2013. №4. URL: [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1101](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1101)
8. Георгиевский В.П., Конев Ф.А. Технология и стандартизация лекарств. Харьков, 1996. 784 с.
9. Гринкевич Н.И. Лекарственные растения. М., 1991. 420 с.
10. Носов А.М. Клеточные технологии: настоящее и перспективы // Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере. Якутск. 2018. С. 17–18.
11. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц., Афанасенкова И.В. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) методами биотехнологии // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 235–245. DOI: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018043887>.
12. Асланянц Ж.К., Маршавина З.В., Казарян А.Г. Продуктивность культуры клеток *Iris sibirica* L., выращенных на упрощенной питательной среде // Растительные ресурсы. 1988. Т. 24. С. 107–110.
13. Багдасарова З.М., Асланянц Ж.К., Узунян Л.В. Биоконверсия терпеноидов культурой клеток ириса (*Iris sibirica*) // Прикладная биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. С. 774–778.
14. Kaššák P. Screening of the chemical content of several Limniris group Irises // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014. N3. Pp. 11–14.
15. Седельникова Л.Л., Кукушкина Т.А. Содержание запасных и биологически активных веществ в вегетативных органах *Iris sibirica* L. (*Iridaceae*) // Ученые записки Забайкальского государственного университета. 2016. Т. 11, №1. С. 123–128.
16. Akashi T., Ishizaki M., Aoki T., Ayabe S.I. Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (*Iridaceae*) // Plant Biotechnol. 2005. Vol. 22, N3. Pp. 207–215. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.207
17. Boltenkov E.V., Rybin V.G., Zarembo E.V. Flavones from callus tissue of *Iris ensata* // Chem. Nat. Compd. 2005. Vol. 41, N5. Pp. 539–541.
18. Ritzdorf I., Bartels M., Kerp B., Kasel T., Klonowski S., Marner F.J. Identification of 10-desoxyiridal as an intermediate in the biosynthesis of iridals // Phytochemistry. 1999. Vol. 50, №6. Pp. 995–1003.
19. Харлампович Т.А. Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края: дис. ... канд. фармац. наук. Пермь, 2014. 19 с.
20. Базарнова Н.Г., Ильичёва Т.Н., Тихомирова Л.И., Синицина А.А. Скрининг химического состава и биологической активности *Iris sibirica* L. сорт Cambridge // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 49–57. DOI: 10.14258/jcprm.2016031227.
21. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Халявин И.А. Элементный состав *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro* // Химия растительного сырья. 2017. №2. С. 119–126. DOI: 10.14258/jcprm.2017021517
22. Базарнова Н.Г., Тихомирова Л.И., Синицына А.А., Афанасенкова И.В. Сравнительный анализ химического состава растительного сырья *Iris sibirica* L. // Химия растительного сырья. 2017. №4. С. 137–144. DOI: 10.14258/jcprm.2017042741.
23. Мызникова О.А., Кудрикова Л.Е. Количественное определение флавоноидов в ириса сибирского листьях // Актуальные проблемы фармакологии и фармации. Вып. XII. Барнаул, 2015. С. 122–127.
24. Наземцева Е.А., Кудрикова Л.Е. Изучение фенольных соединений в траве ириса солелюбивого // Актуальные проблемы фармакологии и фармации. Вып. XII. Барнаул, 2015. С. 128–134.
25. Wang Y.Q., Tan J.J., Tan C.H., Jiang S.H., Zhu D.Y. Halophilols A and B, two new stilbenes from *Iris halophila* // Planta Med. 2003 Vol. 69, no. 8. Pp. 779–781. DOI: 10.1055/s-2003-42792.
26. Kukula-Koch W., Sieniawska E., Widelski J., Urjin O., Głowniak P., Skalicka-Wozniak K. Major secondary metabolites of *Iris* spp. // Phytochemistry Reviews. 2015. Vol. 14, no. 1. Pp. 51–80.
27. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г. Биотехнологии получения растительной биомассы в контролируемых условиях // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы научной конференции. Бийск, 2017. С. 325–329.
28. Лютиков М.Н., Туров Ю.П. Исследование компонентного состава ягод местной дикорастущей брусники (*Vaccinium vitisidaea* L.) // Химия растительного сырья. 2011. №1. С. 145–149.

29. Антипова Е.А., Кудрикова Л.Е. Идентификация и количественное определение флавоноидов в траве ириса сибирского // Фармацевтические науки: от теории к практике: материалы научно-практической конференции с международным участием. Астрахань, 2016. С. 110–112.

Поступила в редакцию 15 декабря 2018 г.

После переработки 26 марта 2019 г.

Принята к публикации 1 апреля 2019 г.

**Для цитирования:** Антипова Е.А., Кудрикова Л.Е., Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Чепрасова М.Ю., Харнуртова Е.П. Оценка содержания полифенолов в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх в сравнении с интактными растениями // Химия растительного сырья. 2019. №2. С. 239–250. DOI: 10.14258/jcrpm.2019024799.

*Antipova E.A.<sup>1\*</sup>, Kudrikova L.E.<sup>1</sup>, Tikhomirova L.I.<sup>2</sup>, Bazarnova N.G.<sup>2</sup>, Cheprasova M.Yu.<sup>2</sup>, Kharnutova E.P.<sup>2</sup>* ASSESSMENT OF THE CONTENT OF POLYPHENOLS IN BIOTECHNOLOGICAL RAW MATERIAL *IRIS SIBIRICA* L. STAR VARIETY IN COMPARISON WITH INTACT PLANTS

<sup>1</sup>*Altai State Medical University, pr. Lenina, 40, Barnaul, 656038 (Russia)*

<sup>2</sup>*Altay State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: L-tichomirova@yandex.ru*

Cultivation of plant raw materials in artificial conditions will inevitably lead to a change in the qualitative and quantitative composition of secondary metabolites in comparison with the composition of plants obtained in soil conditions. The study of the metabolic profile of such plants is very important on the one hand for our understanding of temporal (ontogenetic) and spatial changes in the metabolome of plants, on the other hand in the applied plan to obtain an alternative quality medicinal plant raw materials. In this regard, the aim of this study was to study the content of phenolic compounds in biotechnological raw materials *Iris sibirica* Grade Стерх in comparison with intact plants.

As objects of study used plants propagated mikrokanale (regenerants), which were further grown under conditions of hydroponics (hydroponic). Intact plants were harvested in the field at the age of six years. As a result of research in raw materials *Iris sibirica* Grade Стерх, grown under different conditions, were found following a group of biologically active compound (БАС), corresponding to the genus *Iris* L.: ferulic acid (Komarova and ferulic acid and their derivatives), flavonoids (glycosides of apigenin, apigenin-7-O-glycoside), isoflavones, and phenolic acids (vanillic acid), neytralizuyaya flavonoid-glycosides (glycosides of kaempferol and apigenin), stilbene. The qualitative composition of biologically active compounds of *Iris sibirica* Стерх depended on the growing conditions, while the biotechnological raw materials (hydroponic plants) are the closest to intact plants in terms of the content of biologically active compounds. This allows us to consider the biotechnology of obtaining the raw material *Iris sibirica* L. based on hydroponic cultivation coupled with the micropropagation in an alternative way.

**Keywords:** *I. sibirica* L., secondary metabolites, regenerated plants, hydroponic plants, the intact plants, biotechnology for the production of medicinal plants.

---

\* Corresponding author.

## References

1. Tarbeyeva D.V. *Polifenol'nyye metabolity Iris pseudacorus L. i yego kletchnoy kul'tury: dissertatsiya kandidat khimicheskikh nauk*. [Polyphenolic metabolites of *Iris pseudacorus* L. and its cell culture: dissertation candidate of chemical sciences]. Vladivostok, 2016, 126 p. (in Russ.).
2. Borisova G.G., Yermoshin A.A., Maleva M.A., Chukina N.V. *Osnovy biokhimii vtorichnogo obmena rasteniy*. [Fundamentals of biochemistry of the secondary metabolism of plants]. Yekaterinburg, 2014, 128 p. (in Russ.).
3. Minina S.A., Abu Skhela G.R., Astakhova T.V., Pryakhina N.I., Zenkevich I.G., Kosman V.M. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 1999, no. 4, pp. 40–42. (in Russ.).
4. Minina S.A., Pryakhina N.I. *Rastitel'nyye resursy*, 2003, no. 3, pp. 99–105. (in Russ.).
5. Wei Y., Shu P., Honga J. *Pall. Phytochem Anal.*, 2012, vol. 23, pp. 197–207. DOI: 10.1002/pca.1343.
6. Seki K., Tomihari T., Haga K. *Phytochemistry*, 1994, no. 36, pp. 433–438.
7. Marchishin S.M., Kozachok S.S. *Meditsina i obrazovaniye Sibiri*, 2013, no. 4, [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1101](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1101) (in Russ.).
8. Georgiyevskiy V.P., Konev F.A. *Tekhnologiya i standartizatsiya lekarstv*. [Technology and standardization of drugs]. Kharkov, 1996, 784 p. (in Russ.).
9. Grinkevich N.I. *Lekarstvennyye rasteniya*. [Medicinal plants]. Moscow, 1991, 420 p. (in Russ.).
10. Nosov A.M. *Perspektivy fitobiotekhnologii dlya uluchsheniya kachestva zhizni na Severe*. [Prospects for phytobiotechnology to improve the quality of life in the North]. Yakutsk, 2018, pp. 17–18. (in Russ.).
11. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'icheva T.N., Martirosyan YU.TS., Afanasenkova I.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 235–245. DOI: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018043887> (in Russ.).
12. Aslanyants J.K., Marshavina Z.V., Kazaryan A.G. *Rastitel'nyye resursy*, 1988, vol. 24, pp. 107–110. (in Russ.).
13. Bagdasarova Z.M., Aslanyants J.K., Uzunyan L.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1988, vol. 24, pp. 774–778. (in Russ.).
14. Kaššák P. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2014, no. 3, pp. 11–14.
15. Sedel'nikova L.L., Kukushkina T.A. *Uchonyye zapiski Zabaykalskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 123–128. (in Russ.).
16. Akashi T., Ishizaki M., Aoki T., Ayabe S.I. *Plant Biotechnol.*, 2005, vol. 22, no. 3, pp. 207–215. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.207.
17. Boltenev E.V., Rybin V.G., Zarembo E.V. *Chem. Nat. Compd.*, 2005, vol. 41, no. 5, pp. 539–541.
18. Ritzdorf I., Bartels M., Kerp B., Kasel T., Klonowski S., Mamer F.J. *Phytochemistry*, 1999, vol. 50, no. 6, pp. 995–1003.
19. Kharlampovich T.A. *Fitokhimicheskoye izucheniye i standartizatsiya donnika lekarstvennogo travy, proizrastayushchego na territorii Altayskogo kraya: dissertatsiya kandidata farmatsevticheskikh nauk*. [Phytochemical studying and standardization of the tributary of the medicinal grass growing on the territory of the Altai Territory: dissertation of the candidate of pharmaceutical sciences]. Perm, 2014, 19 p. (in Russ.).
20. Bazarnova N.G., Il'ichova T.N., Tikhomirova L.I., Sinitsina A.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 49–57. DOI: 10.14258/jcprm.2016031227 21. (in Russ.).
21. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Khalyavin I.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 2, pp. 119–126. DOI: 10.14258/jcprm.2017021517 (in Russ.).
22. Bazarnova N.G., Tikhomirova L.I., Sinitsyna A.A., Afanasenkova I.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 4, pp. 137–144. DOI: 10.14258/jcprm.2017042741 (in Russ.).
23. Myznikova O.A., Kudrikova L.Ye. *Aktual'nyye problemy farmakologii i farmatsii. Vyp. XII*. [Actual problems of pharmacology and pharmacy]. Issue XII. Barnaul, 2015, pp. 122–127. (in Russ.).
24. Nazemtseva Ye.A., Kudrikova L.Ye. *Aktual'nyye problemy farmakologii i farmatsii. Vyp. XII*. [Actual problems of pharmacology and pharmacy]. Issue XII. Barnaul, 2015, pp. 128–134. (in Russ.).
25. Wang Y.Q., Tan J.J., Tan C.H., Jiang S.H., Zhu D.Y. *Planta Med.*, 2003, vol. 69, no. 8, pp. 779–781. DOI: 10.1055/s-2003-42792
26. Kukula-Koch W., Sieniawska E., Widelski J., Urjin O., Głowniak P., Skalicka-Wozniak K. *Phytochemistry Reviews*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 51–80.
27. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G. *Tekhnologii i oborudovaniye khimicheskoy, biotekhnologicheskoy i pishchevoy promyshlennosti: materialy nauchnoy konferentsii*. [Technologies and equipment of chemical, biotechnological and food industries: materials of a scientific conference]. Biysk, 2017, pp. 325–329. (in Russ.).
28. Lyutikov M.N., Turov YU.P. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2011, no. 1, pp. 145–149.
29. Antipova Ye.A., Kudrikova L.Ye. *Farmatsevticheskiye nauki: ot teorii k praktike: materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem*, [Pharmaceutical Sciences: from theory to practice: materials of the scientific-practical conference with international participation]. Astrakhan, 2016, pp. 110–112. (in Russ.).

Received December 15, 2018

Revised March 26, 2019

Accepted April 1, 2019

**For citing:** Antipova E.A., Kudrikova L.E., Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Cheprasova M.Yu., Khanutova E.P. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 2, pp. 239–250. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019024799.