

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

ОСОБЕННОСТИ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В СВЯЗИ С ЭКСТРАКЦИЕЙ В СУБКРИТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И НАПРАВЛЕННЫМ БИОСИНТЕЗОМ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

© Л.И. Тихомирова^{1*}, Н.Г. Базарнова¹, Т.Н. Ильичева²

¹Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия), e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 (Россия)

Техника получения экстрактов в субкритических условиях требует меньших временных и материальных затрат, процесс более экологичен, а полученный экстракт имеет достаточно высокое качество и не содержит токсичных примесей.

Получены экстракты из биотехнологического сырья *Potentilla longifolia* Willd., *Potentilla chrisantha* Trev., *Potentilla fruticosa* L., и *Iris sibirica* L., извлеченные водой и этиловым спиртом в традиционных (ТВЭ) и субкритических (СКЭ) условиях. Количество экстрактивных веществ у *I. sibirica* L. в 1.3 раза больше извлекалось водой в субкритических условиях. В экстрактах установлено наличие конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ, ксантонов, флавоноидов, кумаринов и других фенольных соединений, а также алкалоидов. Причем в субкритических условиях, по-видимому, происходит более полное извлечение. В нашем эксперименте антраценпроизводные извлекались только в субкритических условиях.

Продемонстрировано, что разработанная технология получения лекарственного растительного сырья *Iris sibirica* L. на основе гидропонии, сопряженной с клональным микроразмножением, позволяет в результате направленного биосинтеза увеличить в 2 раза содержание экстрактивных веществ у регенерантов (в сравнении с интактными растениями) при выращивании на средах с 2.5 мкМ 6-бензиламинопурина и в 1.3 раза увеличить содержание флавоноидов на средах с 7.5 мкМ 6-бензиламинопурина. Показано, что сырье для получения экстракта *I. sibirica* с противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса II типа необходимо выращивать на средах, содержащих 5.0–10.0 мкМ БАП + 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК.

Ключевые слова: экстракция в субкритических условиях, биотехнологическое растительное сырье, противовирусная активность, биологически активные соединения.

Введение

В современной химии одним из приоритетных направлений является использование экологически безопасных методов экстракции для получения физиологически активных субстанций из растительных источников. Существующие традиционные методы экстракции, используемые для получения БАС, характеризуются рядом недостатков: длительность процесса, трудоемкость, низкая селективность (избирательность) и/или низкие

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

Ильичева Татьяна Николаевна – доктор биологических наук, доцент, профессор базовой кафедры АлтГУ биоинжиниринга рекомбинантных препаратов, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

проценты извлечения. Помимо этого традиционными методами используются зачастую повышенные количества токсичных органических растворителей, требующих их последующей дорогостоящей утилизации. Методами экстракции на основе свойств суперкритических флюидов занимаются ученые всего мира. Суперкритическая флюидная экстракция в CO₂ (СКФЭ) и субкритическая экс-

* Автор, с которым следует вести переписку.

тракция (СКЭ) являются наиболее многообещающими процессами. Использование данных методов экстракции позволяет повышать селективность методов, снижать время экстракции и исключать использование токсичных органических растворителей.

В среде субкритической воды (вода, находящаяся в жидком состоянии в температурном диапазоне от 100 до 374 °С и давлении до 218 атм) [1] – в этом температурном диапазоне значительно изменяются такие важнейшие физико-химические характеристики воды, как константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость и константа ионизации. При этом с увеличением температуры воды выше 100 °С константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость уменьшаются, тогда как константа ионизации воды увеличивается и достигает максимума (на 3 порядка выше) в области 250–270 °С. Вода при таких температурах ведет себя подобно полярному органическому растворителю и при этом может выступать как кислотный или щелочной катализатор, с одной стороны, и как растворитель – с другой. Уникальной особенностью субкритической воды как растворителя является способность восстанавливать значения физико-химических параметров (константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость, константа ионизации) до обычных величин при охлаждении воды до комнатной температуры [2].

Наиболее изученными экстрактами, извлеченными субкритической водой, являются экстракты розмарина (*Rosmarinus officinalis* L.), чабера (*Satureja hortensis*) и мяты (*Mentha piperita*). Извлечение эфирного масла из растения фимбры колючей (*Thymra spicata*) также осуществляли в субкритических условиях. Субкритическая экстракция применялась для извлечения антиоксидантных соединений из микроводорослей *S. platensis*, каротиноидов из микроводорослей *Haematococcus pluvialis* и *Dunaliella salina* [1–3].

Разработана научно обоснованная технология получения лекарственного растительного сырья представителей *Iris* L. и *Potentilla* L. на основе гидропоники, сопряженной с клональным микроразмножением для получения биомассы (10.05–23.4 кг/м²), ее компонентов и продуктов метаболизма [4–7].

Род Ирис насчитывает около 300 видов [8], но большинство исследований было выполнено только на нескольких видах рода. Виды рода *Iris* богаты вторичными метаболитами, прежде всего флавоноидами и изофлавоноидами, флавонами, хинонами и ксантонами, фенолокислотами, такими как кофейная, коричная, п-кумаровая, феруловая, галловая, *n*-гидроксibenзойная, протокатехиновая, сиреневая, ванилиновая [9–11].

Род лапчатка (*Potentilla* L.) – один из больших и полиморфных родов семейства розоцветных флоры Западной Сибири и Горного Алтая [12]. Некоторые представители рода давно используются в народной и официальной медицине, однако их фитохимический состав недостаточно изучен. В настоящий момент лишь единичные представители рода *Potentilla* L., такие как лапчатка прямостоячая (*Potentilla erecta* L.) и трава лапчатки серебристой (*Potentilla argentea* L.), являются официальным сырьем [6].

В данной работе авторы преследовали две цели:

- получение экстрактов в субкритических условиях и фитохимическое изучение их в сравнении с экстрактами, полученными традиционным путем;
- изучение изменений качественных показателей (содержание экстрактивных и биологически активных соединений) и противовирусной активности экстрактов, полученных из биотехнологического сырья *Potentilla longifolia* Willd., *Potentilla chrisantha* Trev., *Potentilla fruticosa* L., *Iris sibirica* L., в зависимости от гормонального состава питательных сред.

Выявление научных закономерностей накопления физиологически активных соединений относится к актуальным вопросам биологии растений, поскольку может создать условия для бурного развития биотехнологических подходов. Наряду с использованием метода субкритической экстракции направленный биосинтез БАС способствует решению ряда экологических и экономических проблем, связанных с использованием растительного сырья. В связи с этим считаем актуальным и практически значимым изучение потенциала разработанной биотехнологии в аспекте направленного биосинтеза БАС в растительном сырье.

Экспериментальная часть

Растительный материал. В качестве объектов исследования использовали растения-регенеранты, полученные и выращенные в Отделе биотехнологии Алтайского государственного университета. Интактные растения заготавливали в окрестностях г. Новоалтайска Алтайского края в 2015 г.

Методика исследования

1. Для получения спиртового извлечения использовали спирт этиловый различной концентрации: 40, 60 и 90%. Кратность экстракции равна 3, время экстракции – по 60 мин, соотношение сырье – экстрагент – 1 : 15. Температура экстракции – 60–65 °С. Водный экстракт получали при тех же условиях, но температура экстракции 95–100 °С.

2. Процедуру извлечения биологически активных соединений в субкритических условиях проводили в соответствии с предложенной авторами методикой в работе [3]. Она состояла в следующем: навеску в 0.5 г сухого среднеизмельченного исходного сырья помещали в экстрактор (цилиндрический толстостенный сосуд из нержавеющей стали внутренним объемом 20 мл), в который добавляли 18 мл растворителя. Экстрактор герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф с заданной температурой 250 °С (точность термостатирования $\pm 1^\circ\text{C}$) на 1 ч. Затем экстрактор охлаждали до комнатной температуры в емкости с холодной проточной водой. Пробу экстракта фильтровали через складчатый бумажный фильтр. В качестве растворителя использовалась дистиллированная вода, а также водно-спиртовые растворы на основе этилового спирта (спирт медицинский – содержание этанола 96.4–97%).

Рассчитывали содержание экстрактивных веществ в % на абсолютно сухой вес (а.в.с.) и проводили качественные реакции по рекомендациям Р.А. Музычкиной и коллег [13].

3. Современная нормативная документация на лекарственное растительное сырье в качестве одного из важнейших показателей обязательно включает обнаружение и нормирование содержания основных биологически активных веществ. Для идентификации действующих веществ используют групповые цветные и осадительные химические реакции. На основании рекомендаций Р.А. Музычкиной и коллег [13] нами проведен экспресс-анализ и разработана система интерпретации результатов качественного определения некоторых групп БАВ (табл. 1). Это дает возможность обнаружения БАВ в короткие сроки при незначительных материальных затратах и в дальнейшем проводить полноценный количественный анализ найденных групп соединений.

Таблица 1. Система интерпретации результатов качественного определения некоторых групп БАВ

БАВ	Реакция	Ожидаемый эффект	Аналитический сигнал		
			слабый (+)	средний (++)	полный (+++)
1	2	3	4	5	6
Производные антрацена	с раствором аммиака	карминово-красный (<i>окисленные формы</i>)	розовое	красное	темно-красное
	с концентрированной серной кислотой	интенсивное синее окрашивание (<i>пара-расположенные ОН-группы</i>)	голубое	синее	темно-синее
Фенолы	с раствором ацетата свинца основного	появляется осадок или окрашивание: желтое или оранжевое (<i>фенолы, фенолокислоты, полифенолы, дубильные вещества</i>)	опалесценция	мелкие кристаллы	творожистый осадок
	Реакция Либермана	появляются различные окрашенные осадки и растворы соответствующих индофенолов	опалесценция	мелкие кристаллы	творожистый осадок
Флавоноиды	с концентрированной хлороводородной кислотой	появляется красное окрашивание (<i>халконы, ауроны</i>)	розовое	красное	темно-красное
	с 3–5% водным раствором борной кислоты	выпадает белый осадок (<i>реакция на орто-диоксигруппировку</i>)	опалесценция	мелкие кристаллы	творожистый осадок
Дубильные вещества	с бромной водой до появления запаха брома	выпадает осадок (конденсированные дубильные вещества, катехины)	опалесценция	мелкие кристаллы	творожистый осадок
	с 2 мл 10% уксусной кислоты и 1 мл 10% водного раствора соли ацетата свинца	появляется осадок (<i>гидролизуемые дубильные вещества</i>)	опалесценция	мелкие кристаллы	творожистый осадок
Ксантоны	с 5% спиртовым раствором хлорида алюминия	встряхивают, появляется зелено-голубое окрашивание в УФ-свете имеет абрикосовый цвет	голубой светло-желтый	зелено-голубой желтый	интенсивный зелено-голубой абрикосовый

Окончание таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Кумарины	с 10% раствором калия гидроксида с 1% спиртовым раствором хлорида железа окисного	появляется красное окрашивание (<i>фурукумарины</i>) появляется различное окрашивание для <i>кумаринов</i> и <i>изокумаринов</i>	розовое голубое	красное синее	темно-красное фиолетовое
Алкалоиды	Реактив Майера С пикриновой кислотой	выпадает осадок (все алкалоиды, кроме кофеина и колхицина) выпадает осадок желтого цвета (все алкалоиды, кроме кофеина, морфина, аконитина, теоброммина)	опалесценция опалесценция	мелкие кристаллы мелкие кристаллы	творожи-стый осадок творожи-стый осадок

4. Методика тестирования цитотоксической и противовирусной активности растительных экстрактов подробно описана в работе [14]. Оценку противовирусной активности экстрактов, извлеченных водой в субкритических условиях, проводили по методу измерения поглощения клетками прижизненного красителя – нейтрального красного (НК) [15].

Перевиваемую клеточную культуру почки зеленой марьши VERO рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты. После достижения 90%-ного монослоя питательную среду удаляли, вносили вирус простого герпеса II типа в дозе 100 ТЦИД₅₀/мл в объеме 50 мкл. Адсорбцию вируса проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 50–60 мин. По окончании инкубации вирус удаляли и вносили поддерживающую среду (среда MEM, 1% FBS, 50 мкг/мл гентамицин, Gibco) в объеме 200 мкл/луночку. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 48 ч.

По истечении 48 ч проводилась оценка противовирусной активности препаратов в тесте адсорбции нейтрального красного. Оценка жизнеспособности клеток по адсорбции ими нейтрального красного широко применяется в биомедицинских исследованиях. Метод основан на способности жизнеспособных клеток поглощать и накапливать суправитальный краситель нейтральный красный в лизосомах благодаря электростатическому притяжению. Повреждение лизосомальных мембран приводит к снижению накопления красителя, поэтому интенсивность окрашивания пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. Далее измеряли оптическую плотность содержимого лунок на ридере микропланшетном Model 680 при длине волны 490 нм с использованием программы Земфира 2.0.

Результаты и обсуждения

Разработанный нами способ получения лекарственного растительного сырья является сопряженным методом клонального микроразмножения и выращивания в условиях гидропонии [7].

Микроразмножение P. fragarioides, P. fruticosa, P. chrisantha, P. longifolia.

В качестве эксплантов использовали вызревшие семена из коллекции Южно-Сибирского ботанического сада. Перед стерилизацией семена промывали под проточной водой в течение 15–25 мин. Стерилизацию проводили в условиях ламинар-бокса 1% раствором сульфохлорантина 10 мин. Затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Этот способ стерилизации позволял получить 70% эксплантов стерильными и жизнеспособными. Питательные среды для этапа введения в культуру ткани готовили по прописи Мурасиге-Скуга (MS) без добавления фитогормонов.

Через 10–15 сут развившиеся побеги *P. fragarioides, P. fruticosa, P. longifolia* пересаживали на среды размножения MS с добавлением 1.0–0.5 мкМ кинетина, 0.25 мкМ ИМК (3-индолилмасляной кислоты) и 0.05 мкМ ГК (гибберелловой кислоты). Для *P. chrisantha* среду размножения готовили на основе MS с добавлением 1.0 мкМ БАП (6-бензиламинопурина) 0.5 мкМ ИМК и 0.05 мкМ ГК.

Образовавшиеся конгломераты микропобегов легко делились на одиночные. Их пересаживали на свежие среды каждые 30 сут. Для длительного выращивания активно пролиферирующей культуры необходимо использовать схему чередования сред с высоким и низким содержанием цитокинина через один пассаж. В результате получали стерильную культуру со стабильным коэффициентом размножения. Число побегов на один эксплант за один пассаж составляло от 2 до 15 штук. Укореняли побеги на среде Мурасиге-Скуга дополненной 1.0 мкМ ИМК.

Фитохимический анализ полученного сырья

Одним из экологически безопасных способов может быть экстракция в среде субкритической воды. Преимущество субкритической воды заключается в том, что для воды, находящейся в жидком состоянии, при повышенных температурах (100–374 °С) и давлении до 218 атм. значительно уменьшаются такие важные характеристики, как константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость [16–18].

Содержание экстрактивных веществ, извлеченных в субкритических условиях. Воздушно-сухие образцы биомассы растений-регенерантов и интактных растений ириса и лапчатки анализировали на содержание экстрактивных веществ. Для более полного извлечения нами использован метод экстракции водой в субкритических условиях. Так, у *I. sibirica* при традиционной экстракции извлекалось 5.1% на абсолютно сухой вес (а.в.с.). Содержание экстрактивных веществ, извлеченных водой в субкритических условиях, составляло 6.7% на а.с.в., что в 1.3 раза больше, чем при традиционной экстракции.

Для выяснения влияния гормонального состава питательных сред на содержание экстрактивных веществ биотехнологическое сырье ириса сибирского выращивали на питательных средах с разным содержанием 6-бензиламинопурина (БАП). Максимальный выход экстрактивных веществ определяли в растительной биомассе растений-регенерантов сорта Стерх при выращивании на средах с содержанием 2.5 мкМ БАП. Если в среды добавляли ауксины (1.0 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК), содержание экстрактивных веществ резко снижалось. Нужно отметить, что в листьях растений, выращенных в почвенных условиях (интактные), экстрактивных веществ содержалось в 2 раза меньше по сравнению с регенерантами. Для коммерческих целей мы рекомендуем использовать экстракт ириса сибирского, выращенного методами биотехнологии с добавлением 2.5 мкМ БАП (рис. 1).

Качественный анализ экстрактов, извлеченных в субкритических условиях, на содержание биологически активных соединений (БАС). Известно, что представители рода *Potentilla L.* содержат широкий спектр БАС, обеспечивающих разнообразие фармакологических эффектов, при этом наибольший интерес представляют БАС фенольной природы.

Биологически активные вещества в растениях-регенерантах *P. longifolia* и *P. chrisantha*, идентифицированные с помощью качественных реакций, идентичны биологически активным веществам интактных растений. В результате наших исследований установлено наличие конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ, ксантонов, флавоноидов, кумаринов и других фенольных соединений. Причем в субкритических условиях, по-видимому, происходит более полное извлечение.

На накопление антраценпроизводных влияют условия внешней среды, возраст и фаза развития растения. В ходе вегетативного развития растений происходит изменение в качественном и количественном отношении: осенью преимущественно накапливаются гликозиды антрахинонов, а летом и весной – свободные агликоны; в молодых растениях (в начале вегетации) преобладают восстановленные формы, а в старых (к концу вегетационного периода) – окисленные. Собранная весной кора крушины содержит преимущественно восстановленные формы производных антрацена, которые при использовании вызывают тошноту и рвоту. Поэтому кору крушины перед применением выдерживают в течение 1 г при обычных условиях хранения или в течение 1 ч при 100–105 °С в сушильном шкафу. При этом происходит окисление восстановленных форм производных антрацена. В нашем эксперименте антраценпроизводные извлекались только в субкритических условиях. В процессе микроклонального размножения растения-регенеранты находятся постоянно в состоянии активного роста. Можно предположить, что в растениях *P. longifolia* и *P. chrisantha* преобладают восстановленные формы антраценовых производных, характерные для фазы активного роста растений. Возможно, при извлечении в субкритических условиях происходит окисление восстановленных форм, и мы наблюдали яркое окрашивание в реакции с аммиаком, что является качественной реакцией на окисленные формы.

При этом следует отметить, что в ряде случаев растворитель в субкритических условиях позволяет извлечь большее количество фенолов, фенолокислот, полифенолов, дубильных веществ, халконов, ауранов, кумаринов и изокумаринов по сравнению с традиционным методом (табл. 2). В качественных реакциях мы наблюдаем полный аналитический сигнал.

*Содержание суммы флавоноидов в растениях-регенерантах *Iris sibirica L.* в зависимости от гормонального состава питательных сред.* Виды рода *Iris* в научной литературе признаны богатейшими источниками вторичных метаболитов, преимущественно за счет найденных флавоноидов. За последнее десятилетие были обнаружены и охарактеризованы более 90 флавоноидных компонентов, в том числе 38 новых соединений, у 15 видов ириса [19].



Рис. 1. Накопление экстрактивных веществ (% на а.с.в.) у растений-регенерантов *Iris sibirica* сорт Стерх в зависимости от количества БАП в средах выращивания, в экстрактах, извлеченных водой в субкритических условиях

Таблица 2. Результаты качественного анализа сырья растений-регенерантов *Potentilla longifolia* и *P. chrisantha* в соответствии с методическими рекомендациями Р.А. Музычкиной и коллег [13]

Группы веществ	Реакция	Вид лапчатки	традиционная экстракция этанолом			СКЭ спиртовые и водные извлечения			
			96%	70%	40%	96%	70%	40%	ВОД-ный
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Производные антрацена	с раствором аммиака (окисленные формы)	<i>P. longifolia</i>	-	-	-	+++	+++	++	-
		<i>P. chrisantha</i>	-	-	-	-	+++	+++	++
	с концентрированной серной кислотой (n-расположенные ОН-группы)	<i>P. longifolia</i>	-	-	-	+++	+++	++	-
		<i>P. chrisantha</i>	-	-	-	++	++	++	++
Фенолы	с раствором ацетата свинца основного (фенолы, фенолокислоты, полифенолы, дубильные вещества)	<i>P. longifolia</i>	++	+	+++	++	+++	+++	+
		<i>P. chrisantha</i>	++	+++	++	++	+++	++	+++
	Реакция Либермана (растворы соответствующих индофенолов)	<i>P. longifolia</i>	+	+	+	+++	+	+	+
		<i>P. chrisantha</i>	++	++	++	++	++	++	+++
Флавоноиды	с концентрированной хлороводородной кислотой (халконы, ауроны)	<i>P. longifolia</i>	-	++	+	+++	+++	-	-
		<i>P. chrisantha</i>	-	++	++	++	++	++	-
	с 3–5% водным раствором борной кислоты (реакция на о-диоксигруппировку)	<i>P. longifolia</i>	+	+	+++	++	+++	++	-
		<i>P. chrisantha</i>	++	+++	++	++	++	++	-
Дубильные вещества	с бромной водой до появления запаха брома (конденсированные дубильные вещества, катехины)	<i>P. longifolia</i>	++	+++	+	+++	+++	++	+
		<i>P. chrisantha</i>	+	++	++	++	+++	++	+
	с 2 мл 10% уксусной кислоты и 1 мл 10% водного раствора соли ацетата свинца (гидролизуемые дубильные вещества)	<i>P. longifolia</i>	++	+++	+	++	+++	++	-
		<i>P. chrisantha</i>	+	+++	++	++	+++	+++	-
Ксантоны	с 5% спиртовым раствором хлорида алюминия, в УФ-свете	<i>P. longifolia</i>	-	++	++	++	-	-	-
		<i>P. chrisantha</i>	-	-	-	-	-	-	-
		<i>P. longifolia</i>	++	-	-	+++	++	-	++
		<i>P. chrisantha</i>	++	-	-	++	++	++	++

Окончание таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Кумарины	с 10% раствором калия гидроксида (фурукумарины)	<i>P. longifolia</i> <i>P. chrisantha</i>	++ ++	++ +++	++ +++	++ ++	+++ +++	+ +++	+ +++
	с 1% спиртовым раствором хлорида железа окисного (для кумаринов и изокумаринов)	<i>P. longifolia</i> <i>P. chrisantha</i>	- -	++ ++	++ ++	+++ ++	+++ +++	++ ++	+++ +
Алкалоиды	реактив Майера	<i>P. longifolia</i> <i>P. chrisantha</i>	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +++	++ +++	+ +++
	с пикриновой кислотой	<i>P. longifolia</i> <i>P. chrisantha</i>	++ +++	++ +++	++ ++	+ +++	+++ +++	+ +++	- -

В траве ириса сибирского установлено присутствие следующих флавоноидов: рутин, кверцетрин и монозида мирицетина. Определено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин $1.97 \pm 0.23\%$ и содержание флавоноида мирицетина – $0.53 \pm 0.08\%$ [20, 21].

Разработанная нами методика определения флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии основана на способности флавоноидов образовывать комплексы с алюминия (III) хлоридом. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм. В качестве стандарта использовали раствор стандартного образца (СО) рутин (ФС 42-250-87) в 95% этиловом спирте.

Рассчитаны метрологические характеристики методики. Средняя изучаемая совокупность с 95%-ным уровнем вероятности находилась в интервале $2.39 \div 2.93\%$ на абсолютной сухой вес (а.с.в.) листьев интактных растений. Вероятность ошибочного заключения составляла 5%. Абсолютная ошибка средней $S_{\bar{x}} = 0.104$ г, относительная ошибка $\varepsilon = 3.9\%$. Как видно, относительная погрешность определения (ε) не превышала 5% (табл. 3).

Получены количественные данные суммы флавоноидов в сырье растений-регенерантов в зависимости от содержания БАП в питательных средах на а.с.в.: при 1 мкМ БАП – 1.03%, при 2.5 мкМ БАП – 1.88%, при 5.0 мкМ БАП – 2.16%, при 7.5 мкМ БАП – 3.53, при 10 мкМ БАП – 1.91%.

Таким образом, для максимального накопления суммы флавоноидов в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* необходимо в питательные среды добавлять БАП в количестве 7.5 мкМ на 1 л (рис. 2).

Противовирусная активность экстрактов биотехнологического сырья, извлеченных водой в субкритических условиях

Токсичность водных экстрактов *I. sibirica*, *P. longifolia*, *P. chrisantha*, *P. fruticosa* и их противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса II типа исследовали в перевиваемой клеточной культуре почки зеленой марышки VERO. За пятидесятипроцентную токсичную дозу, CD50, принимали концентрацию экстракта, при которой погибает 50% клеток. Пятидесятипроцентная эффективная доза, ED50, – концентрация экстракта, защищает 50% клеток от цитопатического действия вируса. Индекс селективности препаратов в отношении вируса герпеса, IS, или терапевтический индекс, – отношение токсичной дозы к эффективной.

Нами изучена биологическая активность экстрактов *P. fruticosa*, *P. chrisantha*, *P. longifolia*, полученных в субкритической воде. Нужно отметить, что для *P. fruticosa* и *P. chrisantha* только извлечения из биотехнологического сырья показали выраженную противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса (табл. 4).

Таблица 3. Метрологические данные определения суммы флавоноидов в сырье *Iris sibirica*

№	Навеска, г	D	x_i	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	S=0,319 $S_{\bar{x}} = 0.104$ $\Delta x = \pm 0.25$ $\varepsilon = 3.9\%$
1	1.0304	0.211	2.5	0.16	0.025	
2	1.0144	0.266	3.2	0.054	0.216	
3	1.0060	0.233	2.9	0.24	0.057	
4	1.0025	0.217	2.7	0.04	0.002	
5	1.0453	0.188	2.2	0.46	0.211	
6	1.0050	0.208	2.5	0.1	0.01	
Среднее значение $x_i = 2.66$						
Среднее значение $\sum (x_i - \bar{x})^2 = 0.521$						

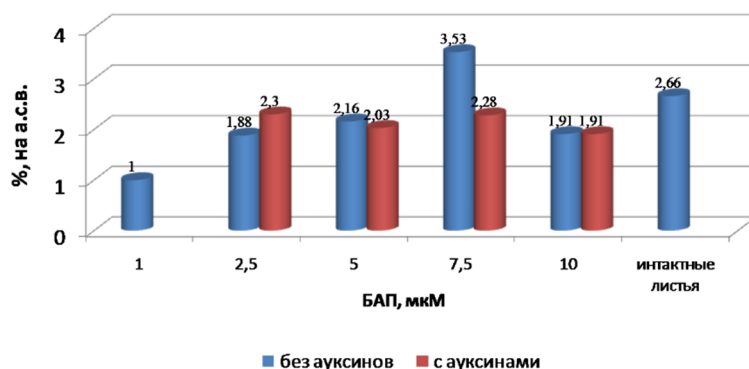


Рис. 2. Количественные данные суммы флавоноидов в сырье растений-регенерантов в зависимости от содержания БАП в питательных средах

Таблица 4. Токсичность и противовирусная активность растительных экстрактов, полученных в субкритической воде, представителей *Potentilla* L.

Сырье для экстракции, (растения)		Токсичность, CD ₅₀ (мкг/мл)	Эффективность, ED ₅₀ (мкг/мл)	Индекс селективности, IS
<i>P. longifolia</i>	растения-регенеранты	927,58	86,96	10,6
	интактные растения	1318,12	164,76	8
<i>P. chrisantha</i>	растения-регенеранты	2638,75	329,84	8
	интактные растения	противовирусная активность не выявлена		
<i>P. fruticosa</i>	растения-регенеранты	660,0	61,81	10,6
	интактные растения	противовирусная активность не выявлена		

Нами получены водные извлечения при традиционной экстракции (ТВЭ) из сырья *I. sibirica* сорт Стерх (интактные листья, растения-регенеранты). Проанализированные экстракты являются нетоксичными и обладают противовирусными свойствами. Наиболее сильное ингибирующее действие проявляет водный экстракт растений-регенерантов (IS=16). Сравнивая экстракты растений-регенерантов и интактных листьев, отметим, что для защиты 50% клеток от цитопатического действия вируса простого герпеса необходимо 1645 мкг/мл экстракта растений-регенерантов, т.е. в 2 раза меньше, чем экстракта интактных растений (3188 мкг/мл). При этом токсичность данных экстрактов одинаковая. Вероятно, это связано с содержанием действующих веществ, и в растениях-регенерантах их накапливается в 2 раза больше, чем в листьях шестилетних интактных растений (табл. 5). Природа БАС *I. sibirica* сорт Стерх, проявляющих биологическую активность в отношении вируса простого герпеса II типа, нам пока неизвестна. Работа в данном направлении будет продолжена.

Для извлечения наибольшего количества экстрактивных веществ нами получены водные экстракты в субкритических условиях. Нами установлено, что в субкритических условиях водой извлекается в 1,3 раза больше экстрактивных веществ независимо от способа получения растительного сырья. При этом, как видно из таблицы 5, для того чтобы погибло 50% клеток почки зеленой марьшанки VERO, достаточно 8375 мкг/мл экстракта СКВ, а экстракта ТВЭ – 25150 мкг/мл, то есть токсичность экстрактов СКВ в 3 раза выше. А эффективная доза (ED₅₀) двух типов экстрактов остается практически на одном уровне. Можно предположить, что при субкритической экстракции извлекаются токсические для данной клеточной культуры вещества, возможно алкалоиды [14], которых нет в извлечениях при традиционной водной экстракции.

В связи с полученными данными для приготовления экстрактов с биологической активностью в отношении вируса простого герпеса II типа мы рекомендуем использовать извлечения при традиционной водной экстракции из биотехнологического сырья *I. sibirica* сорт Стерх. При невысокой токсичности они имели относительно высокую противовирусную активность, и соответственно индекс селективности (IS=16). Экстракты СКФ показали довольно низкий индекс селективности (IS=4,0) в результате высокой токсичности, что не предполагает их дальнейшего изучения на животных (необходимо IS=10 и более).

Таблица 5. Токсичность и противовирусная активность экстрактов растительного сырья *I. sibirica* сорт Стерх при традиционной водной экстракции (ТВЭ) и в среде субкритической воды (СКВ)

Исследуемое сырье	Токсичность CD ₅₀ (мкг/мл)		Эффективность ED ₅₀ (мкг/мл)		Индекс селективности, IS	
	ТВЭ	СКВ	ТВЭ	СКВ	ТВЭ	СКВ
Растения-регенеранты	25150	8375	1645	2093	16	>4
Интактные листья	25100	8625	3188	2156	8	4

Для изучения влияния гормонального содержания питательных сред на противовирусную активность экстрактов проанализировано девять вариантов опыта. В опыте использовали следующие фитогормоны: 6-бензиламинопурин (БАП) 1.0–10.0 мкМ, α -нафтилуксусную кислоту (НУК) 1.0 мкМ и 3-индолилмасляную кислоту (ИМК) 0.1 мкМ. Извлечения в среде субкритической воды получали из биотехнологического сырья *I. sibirica* сорт Стерх, выращенного на питательных средах с разным содержанием фитогормонов. Данные экстракты анализировали на наличие противовирусной активности в отношении вируса герпеса. Все испытуемые экстракты показали противовирусную активность. При этом с увеличением концентрации БАП эффективность увеличивалась. Если в среды вносили ауксины (1.0 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК), значения эффективности и индекса селективности экстрактов возрастали в два и более раза по отношению к контролю и экстрактам растений, выращенных без ауксинов. Значения токсичности изменялись незначительно. Исключением являлись экстракты растений-регенерантов, выращенные на среде с 2.5 мкМ БАП + 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК. Возможно, это связано с содержанием действующих веществ, проявляющих биологическую активность в отношении вируса простого герпеса. Вероятно, с увеличением содержания БАП, а также введения ауксинов в питательные среды растения-регенеранты накапливают значительно больше действующих веществ и, соответственно, эффективная доза (концентрация экстракта, защищающая 50% клеток от цитопатического действия вируса) уменьшается, следовательно, эффективность от применения данного экстракта растет (табл. 6). Для получения экстракта *I. sibirica* с наибольшим терапевтическим индексом необходимо выращивать на средах, содержащих 5.0–10.0 мкМ БАП + 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК.

Таблица 6. Токсичность и противовирусная активность экстрактов, извлеченных водой в субкритических условиях, сырья *I. sibirica* сорт Стерх, выращенного на средах с разным содержанием БАП

№ опыта (мкМ БАП)	Токсичность, CD ₅₀ (мкг/мл)		Эффективность, ED ₅₀ (мкг/мл)		Индекс селективности, IS
	токсичность	к контролю	эффективность	к контролю	
Контроль (1.0)	10750		5375		>2
2/1 (2.5)	12650	<1.2	5060	>1.1	>2.5
3/1 (5.0)	7650	>1.4	3060	>1.75	>2.5
4/1 (7.5)	7550	>1.4	3020	>1.78	>2.5
5/1 (10.0)	7575	>1.4	3030	>1.77	>2.5
2/2 (2.5)+А	5625	>1.9	2812	>1.9	2
3/2 (5.0)+А	8375	>1.3	2093	>2.56	>4
4/2 (7.5)+А	8575	>1.3	2144	>2.5	>4
5/2 (10.0)+А	6400	>1.7	1600	>3.35	>4

Примечание. А – 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК.

Заключение

В результате проведенных лабораторных исследований получены экстракты из биотехнологического сырья представителей *Potentilla L.*, и *Iris sibirica L.*, извлеченные водой и этиловым спиртом в традиционных (ТВЭ) и субкритических (СКЭ) условиях. Количество экстрактивных веществ у *I. sibirica L.* в 1.3 раза больше извлекалось водой в субкритических условиях. В экстрактах установлено наличие конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ, ксантонов, флавоноидов, кумаринов и других фенольных соединений, а также алкалоидов. Причем в субкритических условиях, по-видимому, происходит более полное извлечение. В нашем эксперименте антраценпроизводные извлекались только в субкритических условиях.

Разработанная технология получения лекарственного растительного сырья *Iris sibirica L.* на основе гидропонии, сопряженной с клональным микроразмножением, позволяет в результате направленного биосинтеза увеличить в 2 раза содержание экстрактивных веществ у регенерантов (в сравнении с интактными растениями) при выращивании на средах с 2.5 мкМ 6-бензиламинопурина и в 1.3 раза увеличить содержание флавоноидов на средах с 7.5 мкМ 6-бензиламинопурина. А сырье для получения экстракта *I. sibirica* с противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса II типа необходимо выращивать на средах, содержащих 5.0–10.0 мкМ БАП + 1.0 мкМ НУК + 0.1 мкМ ИМК.

Список литературы

1. Галкин А.А., Лунин В.В. Вода в суб- и сверхкритическом состояниях – универсальная среда для осуществления химических реакций // Успехи химии. 2005. Т. 74, №1. С. 24–40.

2. Борисенко Н.И. Развитие методологии использования субкритической воды для получения физиологически активных субстанций на основе растительных метаболитов : дис. ... доктора. хим. наук. Ростов-на-Дону, 2014. 284 с.
3. Ветрова Е.В., Максименко Е.В., Борисенко С.Н., Лекарь А.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Экстракция антиоксидантов рутина и кверцетина из бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.) в среде субкритической воды // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. 2016. Т. 11, №4. С. 73–79.
4. Тихомирова Л.И., Ильичёва Т.Н., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Способ получения лекарственного растительного сырья лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) в условиях гидропоники // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2016031228.
5. Bazarnova N.G., Tikhomirova L.I., Frolova N.S., Mikushina I.V. Isolation and Analysis of Extractives from *Potentilla alba* L. Grown Under Different Conditions // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2017. Vol. 43, no. 7. Pp. 752–759. DOI: 10.1134/S1068162017070032.
6. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Фитохимический анализ биотехнологического сырья представителей рода *Potentilla* L. // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 145–154. DOI: 10.14258/jcprm.2018012734.
7. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц., Сеницына А.А. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) методами биотехнологии // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
8. Basser K., Demirci B., Orhan I.E. Composition of volatiles from three *Iris* species of Turkey // J Essent Oil Res. 2011. Vol. 23, no. 4. Pp. 66–71. DOI: 10.1080/10412905.2011.9700471.
9. Machalska A., Skalicka-Wozniak K., Widelski J. Screening for phenolic acids in five species of iris collected in Mongolia // Acta Chromatogr. 2008. Vol. 20. Pp. 259–267.
10. Kaššák P. Screening of the chemical content of several *Limniris* group *Iris*es // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014. N3. Pp. 11–14.
11. 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.
12. Курбатский В.И. Род *Potentilla* L. В горах южной Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 1984.
13. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Технология производства и анализ фитопрепаратов. Алматы, 2011. 360 с.
14. Базарнова Н.Г., Ильичёва Т.Н., Тихомирова Л.И., Сеницына 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.
15. Finter N.B. Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays // J. Gen. Virol. 1969. Vol. 5. Pp. 419–427.
16. Лекарь А.В., Филонова О.В., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Экстракция хлорогеновой кислоты из сабельника болотного *Comarum palustre* L. в среде субкритической воды // Химия растительного сырья. 2014. №3. С. 201–207. DOI: 10.14258/jcprm.1403201.
17. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Bugaeva A.F., Borisenko N.I., Minkin V.I. A Simple Way for the Preparation of Natural Antioxidant Quercetin from Rutin by Subcritical Water // Journal of Natural Science, Biology and Medicine. 2017. Vol. 8(2). Pp. 213–215. DOI: 10.4103/0976-9668.210009.
18. Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Хизриева С.С., Бугаева А.Ф. Изучение антиоксидантной активности апорфинового алкалоида глауцина и полученного в субкритической воде фенантренового алкалоида дес-глауцина // Химия растительного сырья. 2017. №1. С. 85–91. DOI: 10.14258/jcprm.2017011383.
19. Тарбеева Д.В. Полифенольные метаболиты *Iris pseudacorus* L. и его клеточной культуры: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 2016. 126 с.
20. Hui W., Yanmei C., Changqi Z. Flavonoids of the Genus *Iris* (Iridaceae) // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2010. Pp. 643–661. DOI: 10.2174/138955710791384027.
21. Антипова Е.А., Кудрикова Л.Е. Идентификация и количественное определение флавоноидов в траве ириса сибирского // Фармацевтические науки: от теории к практике. 2016. С. 110–112.

Поступила в редакцию 5 января 2019 г.

После переработки 1 апреля 2019 г.

Принята к публикации 7 апреля 2019 г.

Для цитирования: Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н. Особенности извлечений из биотехнологического растительного сырья в связи с экстракцией в субкритических условиях и направленным биосинтезом вторичных метаболитов // Химия растительного сырья. 2019. №3. С. 241–252. DOI: 10.14258/jcprm.2019035047.

Tikhomirova L.I.^{1*}, Bazarnova N.G.¹, Il'icheva T.N.² FEATURES EXTRACTS FROM BIOTECHNOLOGICAL PLANT MATERIALS IN CONNECTION WITH THE EXTRACTION IN SUBCRITICAL CONDITIONS AND THE DIRECTED BIOSYNTHESIS OF SECONDARY METABOLITES

¹Altay State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia)

²State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Koltsovo Novosibirsk Region 630559 (Russia)

The technique of obtaining extracts in subcritical conditions requires less time and material costs, the process is more environmentally friendly, and the resulting extract has a sufficiently high quality and does not contain toxic impurities.

As a result of laboratory studies, extracts from biotechnological raw materials *Potentilla longifolia*, *Potentilla chrisantha*, *Potentilla fruticosa*, and *Iris sibirica*, extracted by water and ethyl alcohol in traditional and subcritical conditions. The amount of extractive substances in the sub-critical conditions was 1.3 times more extracted by water. The extracts found the presence of condensed and hydrolyzed tannins, xanthones, flavonoids, coumarins and other phenolic compounds, as well as alkaloids. In our experiment, anthracene derivatives were extracted only under subcritical conditions.

The developed technology for the production of medicinal plant raw materials *Iris sibirica* L. on the basis of hydroponics conjugated with the clonal micro-multiplication allows to increase the content of extractive substances in the regenerants by 2 times as a result of directed biosynthesis in the cultivation of 2.5 μM of 6-benzylaminopurine, and 1.3 times increase the content of flavonoids in the media with 7.5 μM of 6-benzylaminopurine. And raw materials for the production of extract *I. sibirica* with antiviral activity against herpes simplex virus type II should be grown on media containing 5.0-10.0 μM BAP + 1.0 μM NAA + 0.1 μM IBA.

Keywords: extraction in subcritical conditions, biotechnological plant raw materials, antiviral activity, biologically active compounds.

References

- Galkin A.A., Lunin V.V. *Uspekhi khimii*, 2005, vol. 74, no. 1, pp. 24–40. (in Russ.).
- Borisenko N.I. *Razvitiye metodologii ispol'zovaniya subkriticheskoy vody dlya polucheniya fiziologicheskii aktivnykh substances na osnove rastitel'nykh metabolitov: dissertatsiya doktora khimicheskikh nauk*. [Development of a methodology for the use of subcritical water to obtain physiologically active substances based on plant metabolites: the dissertation of a doctor of chemical sciences]. Rostov-on-Don, 2014, 284 p. (in Russ.).
- Vetrova Ye.V., Maksimenko Ye.V., Borisenko S.N., Lekar' A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Sverkhkriticheskiye flyuidy. Teoriya i praktika*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 73–79. (in Russ.).
- Tikhomirova L.I., Il'ichova T.N., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2016031228 (in Russ.).
- Bazarnova N.G., Tikhomirova L.I., Frolova N.S., Mikushina I.V. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2017, vol. 43, no. 7, pp. 752–759. DOI: 10.1134/S1068162017070032.
- Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 145–154. DOI: 10.14258/jcprm.2018012734 7. (in Russ.).
- Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'icheva T.N., Martirosyan YU.TS., Sinitsyna A.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887. (in Russ.).
- Basser K., Demirci B., Orhan I.E. *J Essent Oil Res.*, 2011, vol. 23, no. 4, pp. 66–71. DOI: 10.1080/10412905.2011.9700471.
- Machalska A., Skalicka-Wozniak K., Widelski J. *Acta Chromatogr.*, 2008, vol. 20, pp. 259–267.
- Kaššák P. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2014, no. 3, pp. 11–14.
- Kukula-Koch W., Sieniawska E., Widelski J., Urjin O., Głowniak P., Skalicka-Wozniak K. *Phytochemistry Reviews*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 51–80.
- Kurbatskiy V.I. *Rod Potentilla L. v gorakh yuzhnoy Sibiri: avtoreferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk*. [Genus *Potentilla* L. In the mountains of southern Siberia: abstract of the dissertation of the candidate of biological sciences], Tomsk, 1984. (in Russ.).
- Muzychkina R.A., Korul'kin D.YU., Abilov ZH.A. *Tekhnologiya proizvodstva i analiz fitopreparatov*. [Production technology and analysis of herbal remedies], Almaty, 2011, 360 p. (in Russ.).
- 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. (in Russ.).
- Finter N.B. *J. Gen. Virol.*, 1969, vol. 5, pp. 419–427.
- Lekar' A.V., Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko Ye.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2014, no. 3, pp. 201–207. DOI: 10.14258/jcprm.1403201. (in Russ.).
- Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Bugaeva A.F., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2017, vol. 8(2), pp. 213–215. DOI: 10.4103/0976-9668.210009
- Vetrova Ye.V., Borisenko N.I., Khizriyeva S.S., Bugayeva A.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 1, pp. 85–91. DOI: 10.14258/jcprm.2017011383. (in Russ.).

* Corresponding author.

19. Tarbeyeva D.V. *Polifenol'nyye metabolity Iris pseudacorus L. i yego kletchnoy kul'tury: dissertatsiya kandidata khimicheskikh nauk*. [Polyphenolic metabolites of *Iris pseudacorus* L. and its cell culture: the dissertation of the candidate of chemical sciences], Vladivostok, 2016, 126 p. (in Russ.).
20. Hui W., Yanmei C., Changqi Z. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2010, pp. 643–661. DOI: 10.2174/138955710791384027.
21. Antipova Ye.A., Kudrikova L.Ye. *Farmatsevticheskiye nauki: ot teorii k praktike*, 2016, pp. 110–112. (in Russ.).

Received January 5, 2019

Revised April 1, 2019

Accepted April 7, 2019

For citing: Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Ilicheva T.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 241–252. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019035047.