

КОМПЛЕКС ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ ЛУБА КОРЫ БЕРЕЗЫ *BETULA PENDULA ROTH*: ВЫДЕЛЕНИЕ И СОСТАВ

Н.В. Гарынцева, А.В. Левданский, В.А. Левданский

Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Проведен сравнительный анализ выходов проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы (*Betula pendula* Roth) водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Средний выход проантоцианидинов при экстракции луба коры березы составил, соответственно, при экстракции водой 1,20 %; 15 %-ным водно-спиртовым раствором – 1,44 % и этилацетатом в аппарате Сокслета – 1,46 %. Методами УФ-, ИК- и ^{13}C ЯМР – спектроскопии изучен состав проантоцианидинов, выделенных 15 % водно-спиртовым раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Показано, что в составе полученных проантоцианидинов присутствует галлоильная группа, что увеличивает антирадикальную активность полученных веществ. Установлено, что проантоцианидины луба коры березы в основном состоят из процианидина и продельфинидина.

Ключевые слова: луб коры березы, экстракция, этилацетат, проантоцианидины, процианидин, продельфинидин, галловая кислота

Введение

В настоящее время наиболее успешно и широко среди антиоксидантов применяются комплексы олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ), которые считаются одними из наиболее важных биологически активных добавок [1]. В основе данных комплексов лежат две мономерные единицы – катехин и (-)-эпикатехин, а также их галлоильные производные. Благодаря способности этих соединений образовывать полимерные структуры из двух и более субъединиц, формируются КОПЦ [2].

Проантоцианидины представляют значительный интерес для современной медицины как группа биологически активных веществ, обладающих разнообразной фармакологической активностью: антиоксидантной, противовоспалительной, антиаритмической, гипотензивной и антирадикальной [3-5]. Они способны эффективно инактивировать радикалы, превосходя в этом в несколько раз витамины С и Е.

Источниками промышленного получения КОПЦ являются косточки винограда (*Vitis Sinifera*) и кора сосны (*Pinus maritima*). Несмотря на то, что КОПЦ встречаются во многих растениях, их содержание в подавляющем большинстве достаточно низкое и даже при оптимальных условиях экстракции выход конечного продукта не превышает 0,1 - 0,5 % от массы сухого исходного сырья, поэтому конечный продукт имеет высокую цену [6].

Это делает актуальным поиск новых источников сырья для получения КОПЦ. Работы, опубликованные нами ранее, были посвящены выделению и изучению проантоцианидинов коры деревьев хвойных пород - пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb), сосны обыкновенной (*Pinus Sylvestris* L.) и кедра сибирского (*Pinus sibirica*) [7-9]

Анализ литературных данных показал, что большинство работ, посвящены получению проантоцианидинов из коры хвойных пород деревьев, а также из пищевого сырья фруктов, ягод, виноградных косточек, из отходов (отжим) производств соков калины и других подобных отходов [10]. Широкий спектр биологической активности проантоцианидинов стимулирует поиск новых распространенных и дешевых растительных источников, а также разработку новых эффективных способов их выделения. Береза относится к числу основных лесообразующих пород деревьев средней полосы России. При её механической обработке образуется значительное количество отходов березовой коры, которые до настоящего времени не находят квалифицированного применения и чаще всего сжигаются.

Однако, в березовой коре содержится ряд ценных химических веществ, что стимулирует исследование по разработке эффективных и экономически приемлемых методов их извлечения. Березовая кора состоит из внешнего слоя (бересты) и внутреннего слоя (луба), которые значительно отличаются друг от друга по механическим характеристикам и химическому составу. Береста содержит большое количество тритерпеновых соединений (до 35 мас.%), среди которых преобладает бетулин [11]. Луб березовой коры содержит много полифлаваноидов, из которых наиболее ценными являются проантоцианидины.

В патентах [12-14] нами впервые было предложено осуществлять выделение проантоцианидинов из луба коры березы, из коры березы без предварительного разделения на бересту и луб наряду с выделением бетулина извлекать и проантоцианидины, а также получать проантоцианидины из бересты после извлечения из неё бетулина.

Целью работы являлось проведение сравнительного анализа выходов ПЦ, выделенные из луба коры березы с использованием различных растворителей и изучение их флавоноидного состава.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовали луб коры березы повислой (*Betula pendula Roth*), заготовленный в июне 2023 г. в Емельяновском районе Красноярского края. Образцы коры отбирали с одновозрастных (45-50 лет) берез на расстоянии 1-2 м от комля. Перед использованием кору высушивали при температуре 100 ± 5 °С в течение 5–6 ч, измельчали. После просеивания отбирали фракцию 1-3 мм и досушивали ее до постоянного веса. Химический состав луба березы определяли по общепринятым в химии древесины методикам [15]. Содержание основных компонентов луба березы (% от массы а.с. коры): полисахариды – 48,9, из них легкогидролизуемые полисахариды – 25,4, трудногидролизуемые полисахариды – 23,1, лигнинные вещества – 34,9, водорастворимые вещества – 13,9, минеральные вещества – 3,4.

Выделение проантоцианидинов луба коры березы проводили двумя способами. Первый способ – выделение проантоцианидинов экстракцией луба водой и 15% водно-этанольным раствором. Второй способ выделения проантоцианидинов – экстрагированием луба этилацетатом в аппарате Сокслета.

Для изучения химического состава полученных проантоцианидинов их превращали в антоцианидины известным методом – нагреванием в этаноле в присутствии соляной кислоты [16,17]. Для разделения смеси антоцианидинов применяли колоночную хроматографию на полиамидном сорбенте. Элюирование проводили 96% этанолом, содержащим 0.01 соляной кислоты. По ходу движения элюента по колонке наблюдали две четко выраженные зоны окрашивания. После отбора фракций, их анализировали методом УФ-спектроскопии, затем концентрировали до сухого состояния и определяли выход.

Электронные спектры поглощения полученных антоцианидинов записывали на сканирующем УФ-спектрометре Leki SS2109-UV (Leki Instruments, Финляндия) в 1 см кварцевой кювете в диапазоне длин волн 600–450 нм. Термостатирование (± 0.1 °С) проводили с помощью термостата Naake K15, оснащенного контроллером Naake DC10, при температуре 20 °С. Спектры образцов были сняты одномоментно при выделении из колонки без дополнительной очистки. Все спектры образцов были получены в этаноле с содержанием воды не более 10%.

ИК-спектры проантоцианидинов снимали с использованием ИК-Фурье спектрометра IR Tracer-100 (Shimadzu, Япония) в области длин волн 400–4000 см⁻¹. Обработку спектральной информации проводили по программе OPUS (версия 5.0). Твердые образцы для анализа готовили в виде таблеток в матрице KBr (2 мг образца / 1000 мг KBr).

ЯМР ¹³С-спектры проантоцианидинов регистрировали с использованием спектрометра Bruker Avance III 600 МГц при температуре 25 °С с привязкой к дейтериевому резонансу растворителя - (CD₃)₂DO.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены данные о выходе проантоцианидинов из луба коры березы при экстракции водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Максимальный выход проантоцианидинов наблюдается при экстракции луба коры этилацетатом в аппарате Сокслета: 1,57 мас.%.

Строение проантоцианидинов, полученных из луба коры березы 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета, изучено методами УФ, ИК и ^{13}C ЯМР спектроскопии.

Таблица 1

Выход проантоцианидинов при экстракции луба коры березы водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета

№ опыта	вода	15% водно-этанольный раствор	этилацетат в аппарате Сокслета
1	1,19	1,43	1,59
2	1,20	1,45	1,56
3	1,21	1,44	1,57
среднее значение	1,20 \pm 0,01	1,44 \pm 0,01	1,57 \pm 0,02

В ИК спектрах проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы независимо от способа их выделения, присутствуют все полосы поглощения характерные для проантоцианидинов в области 3374, 2930, 1703, 1613, 1515, 1447, 1374, 1228, 1172, 1157, 1102, 1073, 1043, 896, 825, 760. Присутствие в ИК спектре полосы поглощения в области 1703 см^{-1} , принадлежащей С=О группе означает наличие в положении 3 кольца С флавоноида *галлоильной группы* [18].

В ^{13}C ЯМР спектрах проантоцианидинах луба коры березы (рис.1) присутствуют сигналы всех атомов углерода, определяющих основную структуру флавоноида, а их положения соответствуют литературным данным [16].

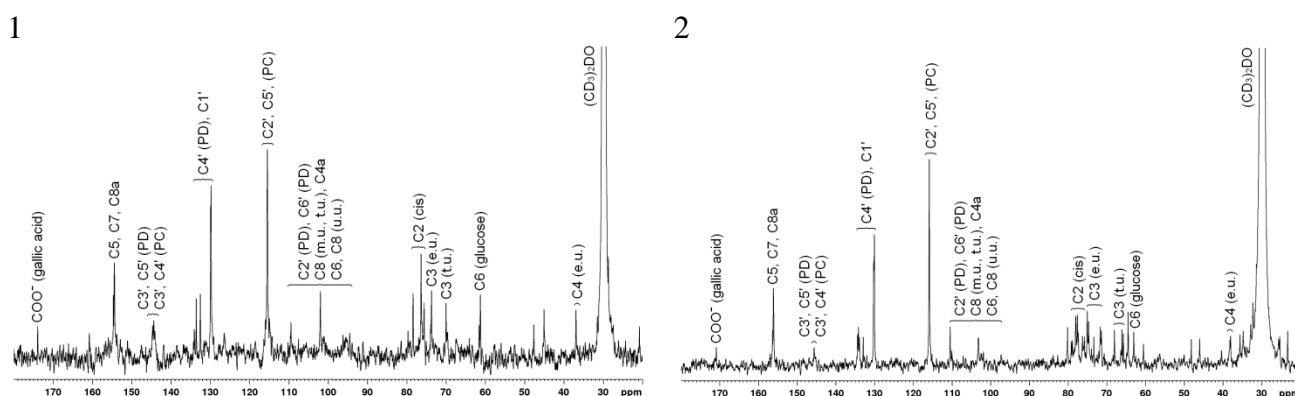


Рис. 1. ^{13}C ЯМР-спектр проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы 15 % водно-этанольным раствором (1) и этилацетатом в аппарате Сокслета (2) (РС – процианидины, PD – продельфинидины, m.u. – среднее звено, t.u. – концевое звено, e.u. – удлиняющее звено, u.u. – верхнее звено)

В области 173.2–174.0 м.д. присутствует сигнал атома углерода сложноэфирной группы (–O–C=O) галлокатехина. В области 154.0–157.0 м.д. сигналы атомов углерода C5, C7 кольца А. Сигналы атомов углерода кольца В трудноразличимы и находятся в ^{13}C ЯМР-спектре в области 148.9 м.д. для процианидина и в области 144.4 м.д. для продельфинидина. Сигналы при 115.5 м.д. (C2', C5'), 112–115.3 м.д. (C6') и 144.4 м.д. (C3', C4') принадлежат кольцу В. Известно [16], что область 70–90 м.д. чувствительна к стереохимии кольца С флавоноидов поэтому сигнал в области 76.0–79.0 м.д. относят к C2 цис (эпикатехин/эпигаллокатехин) стереоизомерам, а сигнал при 78.0–82.0 м.д. к C2 транс (катехин/галлокатехин) стереоизомерам. Как видно из ^{13}C ЯМР-спектров (рис. 2) интенсивный сигнал в области 76.0–79.0 м.д. указывает на то, что в проантоцианидинах луба коры березы присутствуют цис-стереоизомер, состоящий в основном из звеньев эпикатехина и производных. По данным работы [16] в области 61.0–63.0 м.д. – атому углерода C6 глюкозидного остатка.

Анализ флавоноидного состава проантоцианидинов луба коры березы осуществляли после их превращения в красные антоцианидины. Подтверждением того, что антоцианидины луба коры березы в основном состоят из цианидина и дельфинидина является их способность образовывать устойчивые комплексы с Fe^{3+} , Al^{3+} , Sn^{4+} с углублением окраски и смещением максимума поглощения в видимой области УФ спектра батохромно на 15-35 нм [3,7].

Методом колоночной хроматографии антоцианидины луба коры березы разделены на цианидины и дельфинидины. В таблице 2 приведены спектральные и хроматографические характеристики цианидинхлоридов, полученных при обработке проантоцианидинов луба коры березы соляной кислотой в этаноле.

Таблица 2

Спектральные и хроматографические характеристики антоцианидинхлоридов луба коры березы

Вещество	Окраска	Значения R_f ($\times 100$)*	λ_{max} видимой области электронного спектра, нм		$\Delta\lambda$, нм
			этанол	этанол + AlCl_3	
Цианидинхлорид	ярко-малиновая	51	547	569	22
Дельфинидинхлорид	розовато-сиреневая	33	556	581	25

УФ-спектр цианидина имеет максимум поглощения в видимой области $\lambda_{\text{max}}=547$ нм, а дельфинидина – $\lambda_{\text{max}}=556$ нм, при взаимодействии в растворе этанола с хлоридом алюминия их максимумы поглощения смещаются в более длинноволновую область для цианидина к 569 нм, а дельфинидина к 581 нм. Полученные данные показывают, что основными проантоцианидинами луба коры березы являются процианидин и продельфинидин.

Заключение

Сопоставлен выход проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Показано, что выход проантоцианидинов при экстракции луба коры березы водой и 15% водно-этанольным раствором соответственно составляет 1,44 и 1,57 %, при экстракции этилацетатом в аппарате Сокслета выход проантоцианидинов достигает 1,60 %. Методами УФ-, ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопии установлено, что полученные проантоцианидины в основном состоят из процианидина и продельфинидина и их состав не зависит от способа выделения. Установлено присутствие галлоильной группы в составе выделенных проантоцианидинов.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-23-00336, <https://rscf.ru/project/23-23-00336/> с использованием оборудования Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Библиографический список

1. Кузьмичева Н.А., Бузук Г.Н., Курлюк О.В. Содержание проантоцианидинов в коре ив в зависимости от проточности увлажнения почвы // Вестник фармации. 2016. Т. 71, №1. С. 72–75.
2. Осипов В.И., Поляков Н.А., Сидельников А.Н., Хазиева Ф.М. Проантоцианидины корней и корневищ *Potentilla alba* (Rosaceae) // Растительные ресурсы. 2017. Т. 53, №1. С. 114–125.
3. Sprygin V.G., Kushnerova N.F. A method for evaluation and standardization of oligomeric proanthocyanidin com-plexes isolated from various raw plant materials // Pharm. Chem. J. 2002. V. 36, N. 3. P. 139–143.
4. Chang Q., Zhu M., Zuo Z., Chow M., Ho W.K.K. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of Hawthorn active components in rat plasma // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 2001. V. 760, N. 2. P. 227–235.
5. Kim S.H., Kang K.W., Kim K.W., Kim N.D. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasore-laxation in rat aorta // Life Sciences. 2000. V. 67, N. 2. P. 121–131.
6. Sprygin V.G., Kushnerova N.F. A method for evaluation and standardization of oligomeric proanthocyanidin complexes isolated from various raw plant materials // Pharm. Chem. J. 2002. V. 36, N. 3. P. 139–143.

7. Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Выделение и изучение проантоцианидинов коры кедра *Pinus sibirica* // Хим. растит. сырья. 2022. № 4. С. 101–107.
8. Левданский В.А., Королькова И.В., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Выделение и изучение проантоцианидинов коры сосны *Pinus sylvestris* L. // Хим. растит. сырья. 2020. № 4. С. 227–233.
9. Levdansky V.A., Kondrasenko A.A., Levdansky A.V., Lutoshkin M.A. Isolation and study of abies bark proanthocyanidins // J. Sib. Fed. Univ. Chem. 2019. V. 12, N. 4. P. 604–613.
10. Neto R.T., Santos S.A.O., Oliveira J., Silvestre A.J.D. Biorefinery of high polymerization degree proanthocyanidins in the context of circular economy // Ind. Crops Prod. 2020. V. 151. 112450
11. Amiri S., Dastghaib S., Ahmadi M. Mehrbod P., Khadem F., Behrouj H., Aghanoori M.-R., Machaj F., Ghamsari M., Rosik J., Hudecki A., Afkhami A., Hashemi M., Los M.J., Mokarram P., Madrakian T., Ghavami S. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects // Biotechnol. Adv. 2020. V. 38. 107409.
12. Патент №2363486 (РФ). Способ получения биологически активных веществ из коры березы / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов. – 2009.
13. Патент №2367460 (РФ). Способ получения проантоцианидинов из луба коры березы / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов. – 2009.
14. Патент №2381031 (РФ) Способ получения биологически активных веществ из бересты / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов. – 2010.
15. Дейнеко И.П. Фаустова Н.М. Элементный и групповой химический состав коры и древесины осины // Хим. растит. сырья. 2015. № 1. С. 51–62.
16. Diouf P.N., Tibirna C.M., García-Pérez M.-E., Royer M., Dubé P., Stevanovic T. Structural elucidation of condensed tannin from *Picea mariana* bark. // JBNB. 2013. V. 4, N. 3A. P. 1–8.
17. Ku C.S., Mun S.P. Characterization of proanthocyanidin in hot water extract isolated from *Pinus radiata* bark. // Wood Sci. Technol. 2007. V. 41, N. 3. P. 235–247.
18. Takahashi T., Nagatoishi S., Kuroda D., Tsumoto K. Thermodynamic and computational analyses reveal the functional roles of the galloyl group of tea catechins in molecular recognition // PLoS One. 2018. V. 13, N. 10. e0204856.