

УДК 615.322

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ СУШКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА БИОМАССЫ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЖЕНЬШЕНЯ

Н.И. Лаевская^{1*}, Ю.С. Селютина², И.Е. Каухова², Н.С. Пивоварова²

Резюме. На данный момент актуальной остается задача получения высокоэффективных препаратов растительного происхождения широкого спектра действия для использования в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. В статье изучено влияние параметров процесса сушки на показатели качества биомассы женьшеня: состав биологически активных веществ (БАВ) и антиоксидантную активность (АОА). Установлено, что антиоксидантная активность спиртоводных извлечений из биомассы клеточной культуры женьшеня увеличивается при повышении температуры сушки исходного сырья. Проведенные качественный и количественный анализы показали подлинность биомассы по отношению к контролю, которым послужила настойка корня женьшеня.

Ключевые слова: биомасса женьшеня, влажность, антиоксидантная активность, спектрофотометрический метод, тонкослойная хроматография (ТСХ), гликопептидный комплекс (ГПК).

STUDYING OF DRYING CONDITION IMPACT ON GINSENG TISSUE CULTURE BIOMASS QUALITY INDICATOR

N.I. Laevskaia¹, Y.S. Selyutina², I.Ye. Kaukhova², N.S. Pivovarova²

Abstract. At the moment the task of obtaining high-efficient plant medicinal with wide range of action to be used for pharmaceutical, cosmetic, food industry as a biologically active additives remains valid. The ginseng tissue culture drying parameters impact on the biomass quality (chemistry of biologically active substances and antioxidant activity) is studied in this article. It was identified that increasing temperature and decrease the drying time of ginseng tissue increases antioxidant activity. Qualitative and quantitative analyses confirmed authenticity of the biomass compared to the control (ginseng root tincture).

Keywords: ginseng, moisture, antioxidant activity, spectrophotometric method, thin layer chromatography (TLC), glycopeptide complex (GPC).

1 – ООО «Химико-биологическое объединение при РАН «Фирма Вита», 192148, Россия, г. Санкт-Петербург, Старопутиловский вал, 7, к. 2, лит. А

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14

1 – CHEMICAL & BIOLOGICAL ASSOCIATION at RAS «FIRM VITA» Ltd., 7/2, lit. A, Staroputilovsky val, Saint Petersburg, 192148, Russia

2 – St. Petersburg state chemical-pharmaceutical Academy, 14, Professor Popov str., Saint Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: proizvodstvo4@preobrajenie.com

Тел.: +7(911) 950 07 49

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых безопасных адаптогенных средств, повышающих общую неспецифическую резистентность организма к различным неблагоприятным факторам (стресс, повышенная радиация, гипоксия и др.), является актуальной задачей современной фармакологии. Известно успешное применение с этой целью адаптогенов растительного происхождения – женьшеня, родиолы розовой и других.

На фармацевтическом рынке РФ представлены следующие препараты женьшеня: «Гинсана», «Доппельгерц женьшень», «Гербион женьшень», «Теравит антистресс», «Геримакс женьшень»; БАДы «Геримакс энеджи», «Витамакс»; настойки женьшеня производства Тверской, Ивановской, Тульской фармацевтических фабрик, ЗАО «Вифитех», ООО «Камелия НПП» и др. [1].

Препараты из биомассы культуры ткани женьшеня представляют интерес в качестве источника лекарственного сырья и обладают широким пределом безопасности [2].

В литературных данных показана достаточно выраженная антиоксидантная активность фитoadаптогенов семейства аралиевых, которую связывают с антиатерогенным [3] и антигипоксическим действием препаратов биомассы клеточной культуры женьшеня [4].

Значительное число публикаций посвящено изучению физиологических свойств препаратов биомассы клеточной культуры женьшеня [2, 3, 4].

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния режимов сушки на уровень антиоксидантной активности извлечений из биомассы клеточной культуры женьшеня.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась измельченная высушенная биомасса женьшеня. Биомассу получают методом культивирования культуры клеток на твердой агаровой питательной среде. Питательной средой являлась модифицированная среда Мурасиге – Скуга. Культивацию проводят по стандартной методике [5]. На 28–30-й день культивирования в темноте при 25–27 °С биомассу снимают с питательной среды и высушивают на бумажных поддонах до воздушно-сухого состояния в сухожаровых шкафах при определенных температурах. После чего биомассу растирают в ступке, отбирают фракцию 0,0–0,5 мм (измельчают до порошкообразного состояния). Заливают растворителем (40% этанол), настаивают (24 ч). В извлечении из биомассы определяют уровень АОА.

1. Для количественной оценки АОА извлечений из сухой биомассы использовали метод спектрофотометрии с орто-дианизидином и рибофлавином при длине волны 460 нм [6].

Для приготовления контрольной пробы готовят раствор рибофлавина R4500 3,76 мкг/мл. Навеску 0,0244 г орто-дианизидина D3252 растворяют в 5 мл воды + 5 мл спирта этилового 96%. Далее 1,4 мл 0,2 М фосфатного буфера с рН 7,8, 40 мкл раствора орто-дианизидина, 300 мкл рибофлавина переносят в пробирки объемом 8 мл.

Опытная и контрольная пробы стоят при комнатной температуре 6 минут.

В опытную пробу добавляют 10 мкл исследуемого препарата. Для приготовления пробы извлечение тщательно перемешивают и отбирают 10 мкл автоматической пипеткой.

Опытные и контрольную пробы подвергают УФ-облучению в течение 10 мин на расстоянии 100 мм от источника облучения, затем измеряют оптическую плотность образцов на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 460 нм.

По измеренной оптической плотности рассчитывают АОА в условных оптических единицах по формуле:

$$AOA = D_{460} \times 1000 / 10,$$

где D_{460} – величина оптической плотности при 460 нм; 10 – объем пробы в мкл; 1000 – пересчет на 1 мл пробы.

2. Определение влажности сырья проводили в соответствии с ГФ XIII (ОФС.1.5.3.0007.15), т. 2, стр. 413 [7].
3. Качественный анализ биомассы проводили методом тонкослойной хроматографии (ГФ XIII, т. 1., С. 482, ОФС.1.2.1.2.0003.15). В работе использовали пластины Silufol. Контроль: настойка женьшеня

(25 мл, корни женьшеня, ЗАО «ВИФИТЕХ», партия 020909, годен до 2017 г.). Система растворителей: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:5); Детектирование: 0,1% раствор нингидрина в спирте этиловом 96% при нагревании до 105–110 °С 10 минут.

4. Количественное содержание ГПК проводили по оригинальной методике [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния температурного режима сушки биомассу женьшеня сушили при температуре 60 °С, 80 °С и 90 °С в течение 60 минут, затем определяли влажность и АОА образцов (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние режимов сушки на антиоксидантную активность извлечений из биомассы женьшеня

Температурный режим	№ образца	Масса сухой ткани, г	Влажность, %	Σ, среднее, %	АОА, у.е.	Σ, среднее, у.е.
60 °С	1	0,5	1,52	1,89	50,57	75,03
	2	0,5	1,82		86,04	
	3	0,5	2,34		88,49	
80 °С	4	0,5	0,68	0,80	92,01	80,86
	5	0,5	0,92		82,46	
	6	0,5	0,81		68,10	
90 °С	7	0,5	0,64	0,74	83,13	88,82
	8	0,5	0,77		89,78	
	9	0,5	0,80		93,55	

Результаты качественного анализа биомассы женьшеня представлены на рисунке 1 в виде схемы хроматограммы.

Установлено, что во всех извлечениях присутствуют углеводы (R_f 0,1–0,11), гликозиды тритерпеновых сапонинов (R_f 0,2–0,7), эфиры олеаноловой кислоты (R_f 0,8–0,85), β-ситостерин (R_f 0,9–0,99).

По данным хроматографического исследования можно сделать вывод, что в образцах 2, 3 и 4 содержатся такие же БАВ, что и в контроле 1.

Таким образом, при увеличении температуры сушки биомассы женьшеня уменьшается количественное содержание ГПК в извлечении почти вдвое, возможно это связано с частичным разрушением комплекса БАВ.

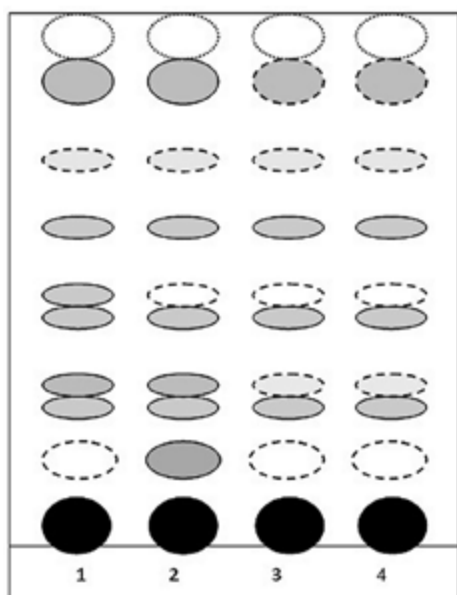


Рисунок 1. Схема хроматограммы качественного анализа БАВ 40% спиртовых извлечений

1 – контроль (настойка женьшеня корня на 40% этиловом спирте); 2 – спиртовое извлечение из биомассы женьшеня, высушенной при 60 °С; 3 – спиртовое извлечение из биомассы женьшеня, высушенной при 80 °С; 4 – спиртовое извлечение из биомассы женьшеня, высушенной при 90 °С

Таблица 2.

Результаты хроматографического анализа БАВ 40% спиртовых извлечений

Вещество	Значения R _f			
	Контроль №1	Извлечение №2	Извлечение №3	Извлечение №4
β-ситостерин	0,99	0,99	0,99	0,99
Олеаноловая кислота	0,84	0,82	0,84	0,84
Гликозид Rh ₂	0,71	0,70	0,73	0,73
Гликозид Rh ₁	0,61	0,60	0,62	0,62
Гликозид Rg ₁	0,52	0,52	0,51	0,51
Гликозид Rf	0,47	0,46	0,47	0,47
Гликозид Rd	0,39	0,38	0,38	0,38
Гликозид Rc	0,31	0,32	0,31	0,31
Гликозид Rb	0,22	0,21	0,21	0,21
Полисахариды	0,11	0,10	0,11	0,11

Таблица 3.

Влияние режимов сушки на содержание ГПК в извлечениях из биомассы женьшеня

Экстрагент	Содержание ГПК, %		
	60 °С	80 °С	90 °С
40% этиловый спирт	0,139±0,010	0,064±0,003	0,064±0,003

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование влияния режимов сушки биомассы женьшеня показало, что при повышении температуры до 80–90 °С содержание ГПК в извлечении уменьшается, но при этом увеличивается АОА. Такой температурный режим является предпочтительным при разработке адаптогенных препаратов на основе биомассы клеточной культуры женьшеня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России: РЛС. Энциклопедия лекарств. Инструкция, применение, описание. URL: <http://www.rlsnet.ru>. (дата обращения 07.02.2017).
2. Р.Н. Аляутдин, Ф.П. Крендаль. Оценка безопасности биотехнологического женьшеня в эксперименте // Биомедицина. 2011. № 3. С. 112–115.
3. А.Н. Рябков, А.А. Слепнев. Изучение антиатерогенных свойств препаратов из биомассы клеточных культур женьшеня и полициаса папоротниколистного // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2013. № 2. С. 66–70.
4. А.Н. Рябков. Влияние препарата из биомассы культуры ткани женьшеня на биохимические параметры эритроцитов при экспериментальной гипоксии // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2014. № 1. С. 66–71.
5. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Под ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1991. 273 с.
6. ТУ 9154-060-49011274-2006. Культуры растительных тканей для производства косметических средств.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, 2. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/ (дата обращения 15.02.2017).
8. Н.С. Кузьмина, Л.И. Слепян, А.Л. Марченко. Гликопептидный комплекс (ГПК) листьев *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey, корней и препаратов женьшеня *Panax ginseng* C.A. Mey и биомассы клеток этих растений // Растительные ресурсы. 2008. Т. 44. Вып. 4. С. 155–164.
9. Н.Л. Наумова. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2014. Т. 2. № 1. С. 5–8.