

На правах рукописи

Маняхин Артем Юрьевич

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis Georgi*) на юге
Приморского края (интродукция, состав флавоноидов,
биологическая активность)

03.02.14 – биологические ресурсы

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток
2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Горнотаежной станции им.
В.Л. Комарова Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Зориков Петр Семенович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН
Васьковский Виктор Евгеньевич

кандидат биологических наук
Ухваткина Ольга Николаевна

Ведущая организация: Федеральное Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
Дальневосточный государственный аграрный
университет, г. Благовещенск

Защита диссертации состоится "12" мая 2010 г. в 10 часов на заседании диссертационного
совета Д 005.005.02 в Учреждении Российской академии наук Тихоокеанском институте
биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690022, г.
Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН.

Тел.: 8(4232)31-14-09
Факс: 8(4232)31-40-50
E-mail: komand@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО
РАН (библиотеке Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН г.
Владивосток, пр-т. 100 лет Владивостоку, 159). Текст автореферата размещен на сайте
совета <http://www.piboc.dvo.ru>

Автореферат разослан

_____ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук, доцент

Н.А. Командрова

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы. Известно, что из произрастающих на Земле высших растений лишь около 10-15 % исследовано на наличие биологически активных веществ. Такие исследования требуют серьезного вложения материальных средств. Поэтому первостепенное значение приобретают анализ информации уже накопленной в академической и народной медицине о растениях; разработка системного подхода к изучению лекарственного растительного сырья, рациональное использование дикорастущих и культивируемых растений. Требуется реализация новых подходов в создании фитопрепаратов, внедрение современных физико-химических методов их стандартизации [Завражнов, 1993].

В современной фармацевтической науке существует ряд критериев для оценки лекарственного растительного сырья. С одной стороны, научные исследования химического состава растений показывают широкие возможности получения веществ или лекарственных препаратов с различной фармакологической активностью. С другой стороны, используемая технология переработки растительного сырья, как правило, ориентирована на получение только одного целевого продукта. Сложившаяся на сегодняшний день практика промышленной переработки сырья очень часто не отражает степень его изученности. Преодоление этого противоречия, возможно путем внедрения новых подходов к оценке качества сырья и использования комплексных ресурсосберегающих технологий. Предпосылкой для внедрения таких технологий является изучение химического состава лекарственных растений, условий их произрастания, основных физико-химических свойств биологически активных соединений, разработка наиболее подходящих методик экстракции этих веществ.

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi, сем. *Lamiaceae*) является одним из примеров нерационального использования сырья. Истощение запасов природного сырья, массовое исчезновение популяций дикорастущего растения под антропогенным прессом, постоянный рост спроса промышленности и населения на сырье этого растения вызывает необходимость введения сырья в культуру и более полного и комплексного его использования. [Бухашеева, Асеева, 2002].

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось изучение биологических особенностей *S. baicalensis* в условиях культивирования и природной популяции с оценкой перспективы его выращивания в условиях юга Приморского края как источника растительных полифенолов, а также разработка методов определения качественного и количественного содержания биологически активных веществ и максимального извлечения суммы флавоноидов из сырья.

Для достижения поставленной цели исследования были определены следующие задачи:

- 1) изучить биоморфологические особенности и ритм сезонного развития *S. baicalensis* в условиях культивирования на юге Приморского края;
- 2) сравнить биоморфологические показатели, семенную продуктивность и биопроductивность растений из природных популяций и выращенных в условиях интродукции;
- 3) изучить особенности накопления байкалина и других полифенольных соединений в подземных и надземных органах растения при выращивании в условиях юга Приморского края и природных популяциях;
- 4) определить оптимальные условия экстракции флавоноидов из корней (способ экстракции, тип растворителя, соотношение сырье - экстрагент, температура и продолжительность экстракции);
- 5) определить качественный и количественный состав флавоноидов в экстрактах;
- 6) исследовать биологическую активность флавоноидов культивируемого *S. baicalensis* на экспериментальных животных.

Научная новизна работы.

Впервые проведено изучение состояния агропопуляции *S. baicalensis* на юге Приморского края (Хасанский район, окрестности пос. Краскино) и показано, что растение характеризуется высоким содержанием байкалина и других полифенольных соединений. Изучены биологические и морфологические особенности развития интродуцента (семенная продуктивность и урожайность). Изучена динамика накопления и распределения по органам растения полифенолов в условиях юга Приморского края и научно обоснованы оптимальные сроки заготовки сырья. Впервые исследована возрастная структура природной популяции (Октябрьский район, окрестности с. Чернятино).. Исследована биологическая активность полифенолов культивируемого сырья.

Практическая ценность. Разработаны методы интродукции *S. baicalensis* на юге Приморского края. Даны рекомендации по выращиванию и использованию интродуцента. Разработана схема экстракции без использования токсичных растворителей.

Материалы диссертации используются в технологической схеме культивирования *S. baicalensis*, образовательном процессе при решении вопросов экологического воспитания и образования школьников и студентов края, а также для организации просветительной работы с населением. На основании проведенных исследований, решением Государственной комиссии РФ по испытанию и охране селекционных достижений, *S. baicalensis* включен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию как «Шлемник байкальский Муссон».

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на Всероссийской научной конференции «Состояние лесов Дальнего Востока и актуальные проблемы лесопользования» [Хабаровск, 2009]; 10-й международной очно-заочной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых исследователей «Интеллектуальный потенциал вузов - на развитие Дальневосточного региона и стран АТР» [Владивосток, 2008], 2-ой международной конференции «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» [Казахстан, 2007]; всероссийской конференции молодых ученых «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи» [Улан-Удэ, 2007], 11-ой всероссийской конференции «Экосистемы, организмы, инновации» [Москва, 2009].

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.

Структура и объем

Работа изложена на 134 страницах, содержит 22 рисунка, 18 таблиц и 6 приложений. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, списка используемой литературы (259 источников, в том числе 162 на русском языке и 97 на иностранных).

Глава 2. Материалы и методы

Полевые исследования по интродукции популяции *S. baicalensis* проводились на базе открытого акционерного общества «Юбиком» (Приморский край, Хасанский район). Природная популяция изучалась в окрестностях с. Чернятино Октябрьского района Приморского края общепринятыми методами [Зайцев, 1972; Кузнецова, 1974; Миркин и др., 2000; Морозова и др., 1997; Муравьева, 1991; Пименова и др., 1998].

Изучение семенной продуктивности и урожайности проводили как описано в литературе [Методические..., 1980; Положий и др., 1988].

Экстракты готовили с использованием воды и различных концентраций этилового спирта (0-96 %), варьировали параметры времени, температуры, соотношения сырье : экстрагент, степени измельчения сырья. По окончании экстрагирования экстракт оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Для проведения ультразвуковой экстракции нами использовалась УЗ ванна «Сапфир» с термостатом. Время воздействия ультразвука - 15 мин первичного озвучивания для активного проникновения экстрагента в сырье и непосредственное время ультразвуковой экстракции в течение 20; 30; 40 минут, при комнатной температуре. Вакуум-фильтрацию проводили на установке ПВФ 47/4 (Россия). Полученные экстракты высушивали с помощью сублимационной сушки Martin Christ Alpha 1-2 (Германия).

Количественное определение байкалина и других полифенольных соединений в сухом экстракте проводили методом обращено-фазовой высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu LC-10VP (Япония). Идентификацию пиков байкалина проводили, сравнивая время удержания стандарта с хроматограммами испытуемых растворов образца. Концентрацию байкалина определяли по стандартной программе для хроматографа с учетом влажности стандарта и образцов.

Методы исследования биологической активности экстрактов *S. baicalensis* на экспериментальных животных. В работе использовали 80 белых беспородных половозрелых мышей-самцов массой 20-25 г, 63 беспородных крыс-самцов с исходной массой тела 140-160 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария на стандартном пищевом рационе, при свободном доступе к воде и естественном световом режиме с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах [Европейская..., 1986] и разрешения комиссии по биомедицинской этике при Горнотаежной станции ДВО РАН. При разделении животных на группы проводили ранжирование по массе тела и возрасту.

Влияние техногенного загрязнения моделировали на мышах. Для этого добавляли в их пищу в течение 20 дней по 1 г на особь в день измельченных листьев липы (*Tilia amurensis* Rupr.) из двух районов г. Владивостока с различным уровнем техногенного загрязнения (ТЗ). Уровень загрязнения в районе с минимальной техногенной нагрузкой (Ботанический сад) составлял по значению индекса загрязнения атмосферы (ИЗА) величину 2,58, тогда как в районе с максимальной техногенной нагрузкой (Луговая, г. Владивосток) ИЗА составлял 6,3 [Ежегодный..., 2008]. Животные были разделены на 4 группы по 10 особей в каждой. В 1-ой (фоновое техногенное загрязнение) группе животным в пищу добавляли листья липы из района с минимальным техногенным загрязнением; во 2-й (максимальное техногенное загрязнение) группе – в пищу добавляли листья липы из района с максимальным техногенным загрязнением; в 3-й опытной группе – в пищу добавляли листья липы из района с максимальным техногенным загрязнением + сухой экстракт шлемника (10 мг/кг); 4-й опытной группе в пищу добавляли листья липы из района с максимальным техногенным загрязнением + препарат сравнения - 1 мл/кг ранее изученного в нашей лаборатории экстракта патринии скабиозолистной (ЭПС) (*Patrinia scabiosifolia* Fisch. ex Link) [Зорикова, Хасина, 2005].

Алкогольный гепатит вызывали у крыс контрольной и опытной групп введением в желудок 40% этилового спирта по 0,7 мл на 100 г массы крыс 1 раз в сутки в течение 21 дня [Мансурова, Олимова, 1985]. Животным опытной группы вводили в желудок сухой

экстракт шлемника байкальского (СЭШБ) в дозе 10 мг/кг в водном растворе объема 1мл, 1 раз в день на протяжении 21 дня. Интервал между введениями СЭШБ и этанола соответствовал 5-6 часам. Животные интактной группы получали в соответствующем объеме дистиллированную воду.

О степени антиоксидантной эффективности СЭШБ судили по следующим показателям: активность перекисное окисление липидов (ПОЛ) контролировали посредством определения содержания малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови и гомогенате печени по методу И. Д. Стальной и Г. Г. Гаришвили [1977], каталазную активность сыворотки крови определяли методом Г. А. Бабенко, М. Н. Гайнацкого [1976] на 7, 14 и 21-е сутки эксперимента. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием критерия Стьюдента.

Физиологические методы исследования СЭШБ в дозе 10 мг/кг в водном растворе объема 1мл, вводили животным (группа 3) в желудок через зонд. Контрольные группы мышей получали соответствующий объем дистиллированной воды (группа 1 и 2) или препарат сравнения (группа 4) – жидкий экстракт патринии скабиозолистной (ЭПС) в дозе 1 мл/кг по аналогичной схеме.

Для исследования ориентировочно-двигательной активности (ОДА) применяли тест «открытое поле» (ОП) Время наблюдения за поведением мыши - 5 минут. В поведении животного выделяли следующие визуально идентифицируемые поведенческие акты: пересечение диаметров (пробеги), пересечение окружностей (переходы), число актов груминга и замирания, число стоек с опорой на стенки и без опоры. После 5 минут исследования животное возвращали в клетку и тщательно протирали пол после каждого теста.

Метод исследования поведения в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) основан на безусловно-рефлекторном страхе падения с высоты и открытых пространств у грызунов [Dawson, Tricklebank, 1995]. Время, проведенное в открытых рукавах ПКЛ, обратно пропорционально уровню тревожности. Таким образом, чем выше показатель предпочтения открытых рукавов лабиринта закрытым, тем ниже уровень тревоги у животных и наоборот. В ходе эксперимента животное помещали на центральную площадку лабиринта и в течение 5 минут визуально регистрировали его поведенческие акты. Рассчитывали индексы тревожного поведения. Эти показатели являются стандартными в методике оценки тревожности лабораторных животных. Чем ниже показатели, тем выше тревожность и наоборот [Воронина, Островская, 1998].

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Условия интродукции.

Интродукционные площадки располагались в Хасанском районе Приморского края, окрестности пос. Краскино (42° 44' с.ш., 130° 46' в.д.). Для агрохимической характеристики смешанных образцов почвы были выполнены следующие анализы: содержание гумуса, актуальная кислотность, обменная кислотность, гидролитическая кислотность, содержание подвижных форм фосфора и калия.

Все определения выполнены для трех проб почвы. В табл. 1 представлены средние значения агрохимических характеристик. Пробы 1, 2, 3 соответствуют интродукционным участкам: 1 – уклон 3°, высокий уровень грунтовых вод; 2 – уклон до 6°, высокая минерализация почвы; 3 – отсутствие уклона, средний уровень грунтовых вод.

Таблица 1

Агрохимические показатели почв

Образец	Гигроскопическая влажность, %	Гумус, %	Гк мэкв/100г почвы	рН		K ₂ O мг/100 г почвы	P ₂ O ₅
				H ₂ O	KCl		
Проба 1	3,52	4,68	12,06	5,24	3,97	15,98	0,13
Проба 2	5,15	0,27	3,12	6,12	4,21	6,33	0,11
Проба 3	3,41	4,46	12,97	5,11	3,96	6,90	0,16

3.2. Биологические и морфологические особенности развития интродуцента

При подзимнем сроке посева проростки появляются в середине апреля, при весеннем – в третьей декаде апреля, на 14-16 день после посева.

Опадание семядолей означает переход особей шлемника в ювенильное стояние. Для ювенильных особей характерно наличие одного осевого побега, несущего 5-6 пар настоящих листьев, не отличающихся по морфологическим особенностям от листьев проростков и взрослых растений, но увеличивающихся по размерам в акропетальной последовательности. В ювенильном состоянии побег достигает 10-12 см высоты. Стержневой корень проникает в почву на глубину 3-5 см. Главный побег продолжает моноподиальное нарастание, достигает 25-40 см высоты и несет до 18-20 пар листьев. Число боковых побегов 1-го порядка увеличивается до 6-8 пар. На боковых побегах 1-го порядка, образовавшихся из почек, находившихся 4-5-й пары листьев, формируются побеги 2-го порядка. В течение первого года жизни 100% особей переходят из прегенеративного состояния в генеративное. Однолетние особи зацветают в конце лета (в августе), образуют полноценные семена. Осенью, к концу сентября, на корневой шейке закладываются почки возобновления, из которых в следующем году развиваются новые побеги.

Двулетние особи несут вегетативные и генеративные почки, которые трогаются в рост рано весной. Массовое отрастание отмечено в третьей декаде апреля. Из почек развиваются однолетние побеги, несущие одну весенне-летне-осеннюю генерацию листьев. В конце апреля молодые побеги достигали длины 5-7 см с 4-6 парами листьев, длиной 4,0-1,2 см, ширины 0,15-1,3 см. В последующем наблюдается интенсивный рост побегов и формирование растения. Через месяц растения достигали 30-40 см высоты, а диаметр - 50-60 см, количество побегов было в пределах 40-60 шт. Цветение начиналось 15-20 июля, т.е. в среднем через 70 дней после массового отрастания. Массовое цветение отмечено в конце июля (27.07.), в эту фазу особи достигли максимальной высоты до 60 см. Распускание цветков происходило в акропетальном направлении с центрального побега, вслед за которым распускались цветки из соцветий на боковых побегах 1 порядка, а затем и 2 порядка. Продолжительность цветения *S. baicalensis* составляла 60-70 дней. Период созревания семян отмечен в конце августа. Фаза созревания семян не зависит от возраста генеративных растений. Возраст генеративных растений не влияет на сроки наступления и прохождения фенологических фаз, в то время как метеорологические условия вегетационного периода могут сдвинуть сроки прохождения отдельных фаз развития. Вслед за распусканьем цветков на центральном побеге распускаются цветки соцветий на боковых побегах 1-го порядка, затем 2-го порядка. Длительность цветения одного цветка 2-5 дней, фаза цветения около 60-70 дней.

Период образования семян и их созревания примерно равен периоду цветения (55-65 дней). Длительность фазы созревания семян не зависит от возраста генеративных растений и сроков посева (подзимнего и весеннего). Форма и положение чашечки цветка в период созревания семян не меняются по сравнению с фазой цветения, окраска же ее становится темно-фиолетовой. Из четырех эрем, находящихся в ценобиях, созревают от 2 до 4. К концу октября, с наступлением заморозков, побеги вместе с листьями отмирают. В таком состоянии растения зимуют. Вегетационный период длится 225-300 дней.

3.3. Семенная продуктивность и урожайность *S. baicalensis* в культуре и природной популяции

В вегетационный сезон 2008 г. было проведено обследование агро- и природной популяций *S. baicalensis*. У культивируемых растений зафиксированы следующие показатели: среднее число семян в коробочке $2,7 \pm 0,005$, среднее число генеративных побегов на 1 растение $6,73 \pm 0,03$. Потенциальная семенная продуктивность на 1 генеративный побег составляет $251,25 \pm 14,6$ шт., реальная – $168,99 \pm 11,9$ шт. Наличие полноценных семян – один из основных показателей соответствия условий произрастания биологическим потребностям вида. Это положение подтверждается высоким

коэффициентом семенной продуктивности интродуцента, который равен 67%, что свидетельствует о хорошей адаптации вида к условиям культивирования.

В природной популяции *S. baicalensis* в вегетационный период 2008 г среднее число семян в коробочке было равно $2,2 \pm 0,005$, число генеративных побегов на 1 растение - $4,32 \pm 0,03$. Потенциальная семенная продуктивность растения составляет $123,76 \pm 10,3$ шт., реальная – $64,8 \pm 15,7$ шт. Коэффициент семенной продуктивности в природной популяции несколько ниже, чем в культуре и составляет 52,4%.

Качество семян определяется размерами, массой 1000 штук и проверкой на всхожесть. В результате исследования природной популяции оказалось: величина семян составляет $1,8 \pm 0,01$ мм; масса 1000 семян $1,27 \pm 0,05$ г. Для культивируемых растений аналогичные показатели равны, соответственно: $2,35 \pm 0,01$ мм и $1,83 \pm 0,03$ г. Установлено, что в результате интродукции линейные размеры семян возросли на 30,6 %, вес – 44,1 %.

Для установления ценности полученных при культивировании семян как посевного материала проведены опыты по определению лабораторной всхожести семян. При температуре 25° С прорастание семян начиналось на 3 сутки после закладки. Энергия прорастания семян на 5 день в группе без периода покоя составила 37%, у семян годовой выдержки - 32%, лабораторная всхожесть на 10-е сутки равнялась, соответственно 52 и 41%. Анализ значений энергии прорастания и всхожести семян *S. baicalensis* показал, что при хранении указанные показатели несколько снижаются, приближаясь к показателям природных популяций.

Нами была определена урожайность надземных и подземных частей *S. baicalensis* на трех интродукционных площадках и в дикой популяции (табл. 2). Наибольшая плотность генеративных особей отмечена на площадке 3, но при этом эксплуатационный запас корней на данном участке является самым низким. Максимальная урожайность корней приходится на площадку 2 при минимальной плотности посадки.

Таблица 2.

Сырьевые ресурсы *S. baicalensis* в условиях интродукции и природной популяции

Модельная площадка	Плотность роста, экз/ м ²	Эксплуатационный запас корня, кг/га	Эксплуатационный запас травы, кг/га
Интродукционная площадка 1	18,6	3200	1143,2
Интродукционная площадка 2	13,4	7475,3	3280,0
Интродукционная площадка 3	21,6	712,8	1468,8
Природная популяция	4,4	954,4	2553,1

3.4. Накопление флавоноидов в условиях культивирования и в природной популяции

Результаты исследования корней растений 2-го года культивирования хроматографическим методом показали, что в течение сезона качественный состав фенольных соединений остается постоянным, хотя количественно их характеристики изменяются. Количественная ВЭЖХ показала изменение содержания основного флавоноида – байкалина по фенологическими фазами. Максимальное содержание его (14,9 % от абс. сух. сырья) приходилось на весенний период. В фазу цветения (июль-август) содержание байкалина в корнях значительно снижалось – до 5,5 %. В начальный осенний период, в фазе формирования семян, количество байкалина несколько увеличивалось (8,3%), и по мере созревания семян продолжало возрастать, хотя и не достигло максимума. В конце октября, к завершению вегетационного цикла, содержание флавоноида в корнях еще более увеличивалось, и приближалось к максимальным значениям (12,5 %).

Определение возрастной динамики накопления флавоноидов проведено на образцах сырья 2- и 3-го года интродукции. Результаты анализа, отраженные в таблице 3, выявили, что на фоне сезонной изменчивости, описанной выше, видно увеличение содержания флавоноидов с возрастом растений.

Для растений 3-го года содержание байкалина в фазы начала вегетации на 23,4 %; цветения – 26,8 %; диссеминации – 46,8 %; конца вегетации – 36,5 % больше, чем в соответствующие фазы растений 2-го года вегетации. Для минорных флавоноидов, в аналогичные фазы, увеличение составляло 14,7 %; 44,3 %; 42,1 %; 21,9 % соответственно. Накопление суммы флавоноидов на 3-м году интродукции по сравнению с показателями 2-го года возросло на 19,7 %; 34,0 %; 44,7 %; 30,3 % в соответствии с фенофазами.

Таблица 3
Динамика накопления флавоноидов *S. baicalensis* в условиях интродукции (% , w/w)

	Скутеллярин	Байкалин	Норвогин	Орозиллин	Вогонин-7-G	Байкалеин	Вогонин	Хризин	Общ. минорн
2- год, начало вегетации	3,3	23,9	2,1	1,1	5,8	3,9	2,6	1,0	19,8
3-год, начало вегетации	3,8	31,2	2,6	2,0	7,0	3,9	2,7	1,0	23,2
2-й год, цветение	1,8	12,6	0,9	1,0	0,3	2,3	0,3	0,2	6,8
3-й год, цветение	2,7	17,2	1,3	1,2	4,1	2,3	0,4	0,2	12,2
2-й год, диссеминация	2,7	15,8	1,5	1,2	4,1	2,9	0,5	0,2	13,1
3-й год, диссеминация	3,7	29,7	2,8	2,0	6,7	4,0	2,6	0,9	22,6
2-й год, конец вегетации	3,9	19,3	2,4	1,7	0,7	5,5	2,3	1,1	17,5
3-й год, конец вегетации	3,7	30,4	2,7	2,3	5,9	4,2	2,6	1,2	22,4

Результаты изучения содержания флавоноидов в различных органах растений свидетельствуют о различиях отдельных частей растений по составу и содержанию этих соединений. Исследование распределения флавоноидов по органам *S. baicalensis* проводили на сырье, собранном в фазу диссеминации, когда количество флавоноидов в корнях растений приближается к максимальным значениям. Исследование показало (рис. 1), что главный флавоноид – байкалин – в основном содержится в подземных органах, ценным сырьем является как основной корень, так и его нижние и верхние мелкие боковые корни, которые часто удаляют при заготовках сырья.

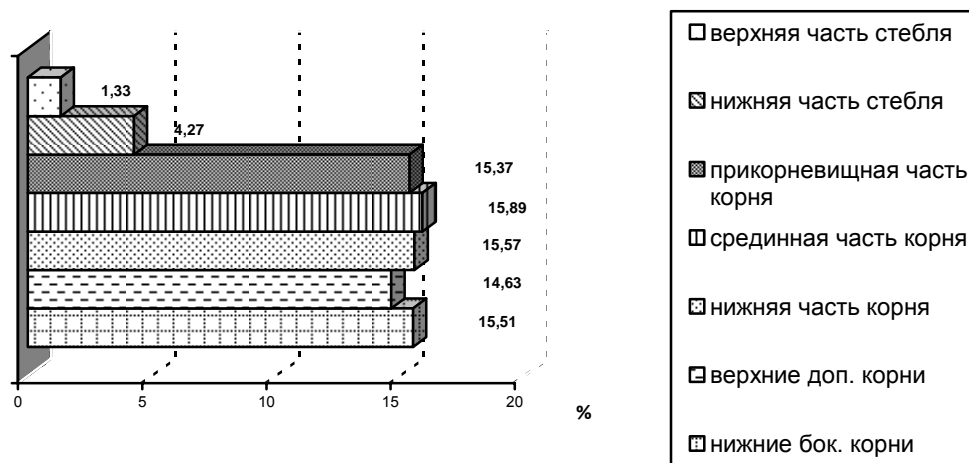


Рис. 1. Содержание байкалина в органах растения, % от сух. сырья

Так как в стеблях содержание байкалина достаточно мало, их использование в качестве сырья не представляется рациональным.

Приведенные данные по анализу культивируемых растений показали, что наибольшее количество флавоноидов в корнях *S. baicalensis* наблюдается в фазах начала и завершения вегетации у растений 3-го года вегетации. Накопление основного флавоноида – байкалина происходит в подземной части растения, причем во всех частях корня.

Сумма флавоноидов в природном сырье составляет 18,4% от сухого веса, минорных флавоноидов – 10,3%. Таким образом, сопоставляя эти данные с показателями для растений в фазе цветения, можно видеть, что в условиях культуры накопление основного флавоноида – байкалина, возрастает более чем в два раза, тогда как на накопление минорных флавоноидов процесс интродукции оказал менее выраженное воздействие.

3.5. Изучение процесса экстракции корней шлемника байкальского и получение сухого экстракта

С целью установления оптимальных параметров процесса экстракции сырья – корней интродуцированного шлемника байкальского и максимально полного извлечения целевых веществ провели исследование процесса экстракции в различных режимах. Экспериментально установленные оптимальные параметры (табл. 4) были применены для получения сухого экстракта корня *S. baicalensis*.

Сухой экстракт шлемника байкальского (СЭШБ) представляет собой коричневый порошок с характерным запахом и горьковато-вяжущим вкусом. Порошок гигроскопичен, при влажности экстракта выше 4% теряется сыпучесть и начинается комкование.

Таблица 4.

Оптимальные параметры экстракции сырья корня *S. baicalensis*

Параметр	Значение
Степень измельчения сырья	0,5 – 1 мм
Тип экстрагента	очищенная вода
Соотношение сырье : экстрагент	1:20
Температура экстракции	60-70° С
Время экстракции	3 часа

Для определения качественного и количественного состава СЭШБ применяли метод ВЭЖХ. Результаты показаны в табл. 5. Экстракт содержал 16% целевого вещества – байкалина, что превышает стандартные требования к качеству экстрактов из природного сырья – 10 % [Лекарственное..., 2006], полный набор минорных флавоноидов составлял 11,9 % и общая сумма флавоноидов – 27,9 %.

Таблица 5

Содержание флавоноидов (байкалина и минорных) в сухом экстракте корня культивированного шлемника байкальского (%w/w)

	Скутеллярин	Байкалин	Норвогонин	Орозиллин	Вогонин-7-G	Байкалин	Вогонин	Хризин	Общ. минорные
СЭШБ	2,7	16,0	1,1	1,6	0,5	3,7	1,6	0,7	11,9

Масса сухого экстракта (сумма экстрактивных веществ), полученная из 30 г корня составляла 12,81 г, это соответствует 42,7 % от взятой для экстрагирования навески. Этот показатель превосходит стандартные требования по извлечению из корней шлемника не менее 30 % экстрактивных веществ [Лекарственное..., 2006].

Ультразвуковой (УЗ) метод экстракции показал результаты, сходные с традиционным методом. Содержание байкалина составило 16,2 % – 16 % при экстракции. Степень извлечения минорных флавоноидов так же близка к полученной при обычной экстракции (11,9 %). Это свидетельствует о пригодности УЗ метода экстракции, бесспорным преимуществом которого является существенное снижение времени экстракции – с 4 часов до 40–60 минут.

3.6 Технологическая схема получения сухого концентрата флавоноидов из шлемника байкальского, выращенного на юге Приморского края

С любезного предложения технологической лаборатории Unigen Korea, дочерней фирмы корпорации Esonet, была предоставлена для апробации на выращенном сырье технологическая схема получения концентрата флавоноидов (рис. 2).

Все ранее подобранные оптимальные параметры процесса экстракции были введены в основу балансовой загрузки, на основании которой проводилась апробация предложенной схемы.

Экстрагирование и выделение суммы флавоноидов из водного экстракта корней *S. baicalensis* проводилось по следующей схеме:

- Измельчение растительного сырья
- Получение суммы экстрактивных веществ
- Получение целевого концентрата

В результате переработки 1050 г измельченного сырья было получено 220 г сухого концентрата флавоноидов, что достаточно близко к расчетным показателям – 234,96 грамм.

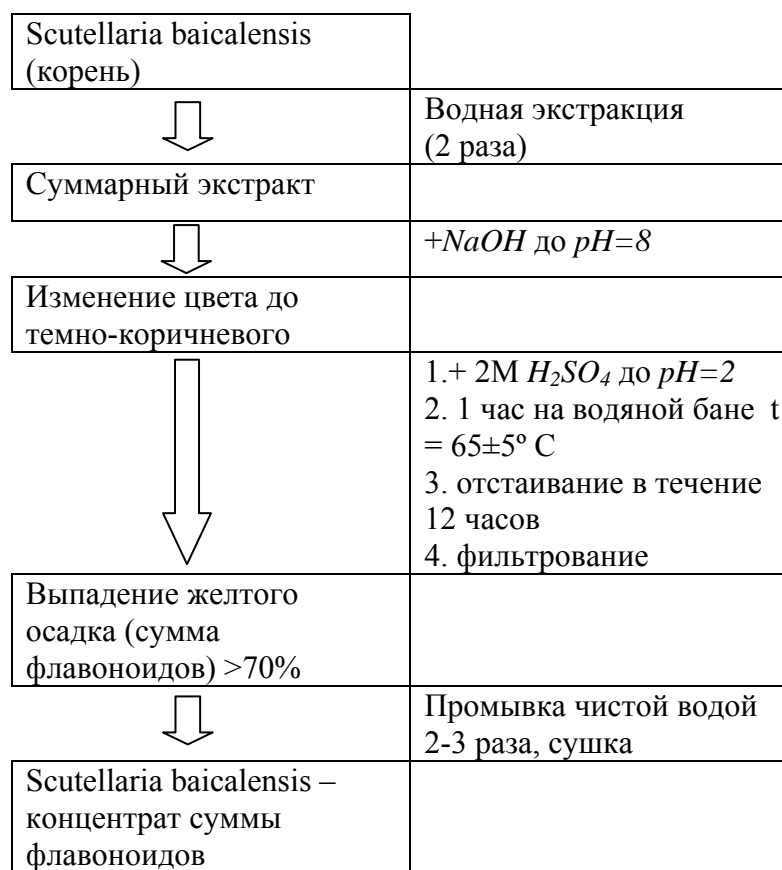


Рис. 2. Схема процесса выделения суммы флавоноидов из корней шлемника байкальского

Сухой концентрат флавоноидов представляет собой зеленовато-желтый порошок без запаха, с горьким вкусом. Порошок гигроскопичен, комкуется. Исследование качественного и количественного состава концентрата (табл. 6), показало наличие всего спектра идентифицируемых флавоноидов, как гликозилированных, так и агликонов. Количество суммарных флавоноидов составляет 94,7% для образца 1, и 94,8% для образца 2, что говорит о высокой чистоте полученного продукта. При этом, содержание байкалина в обоих случаях составляло не менее 70%.

Таблица 6

Содержание флавоноидов (байкалин и минорные) в концентрате флавоноидов корня шлемника байкальского (% w/w)

Год вегетации	Скутеллариин	Байкалин	Норвогонин	Орозин	Вогонин-7-G	Байкалеин	Вогонин	Хризин	Общ. Минорные
2- год, начало вегетации	1,9	77,5	1,7	2,4	6,1	3,3	1,2	0,3	16,9
3-год, начало вегетации	1,9	78,1	1,7	2,5	6,1	3,3	1,0	0,2	16,7

Применение технологии, предложенной «Unigen Korea», показало, что сырье выращенное в Хасанском районе Приморского края на базе ОАО «Юбиком», окрестности пос. Краскино, содержит достаточное количество целевых соединений (флавоноидов) и пригодно для создания концентратов высокого качества. Разработанная нами технология на базе корейской с оптимизацией некоторых стадий процесса позволяет практически исчерпывающе извлекать биологически активные вещества из сырья, что, несомненно, способствует рациональному использованию биоресурсов, и, косвенно, сохранению природных популяций *S. baicalensis*.

3.7. Биологическая активность сухого экстракта шлемника байкальского из интродуцированного сырья

Методом «открытого поля» (ОП) исследовали влияние экстракта шлемника байкальского (ЭШБ) на интегративные этологические реакции лабораторных мышей. Как видно из данных, представленных в табл. 7, введение ксенобиотиков вызывает у особей 2-й контрольной группы – максимальное техногенное загрязнение (МТЗ) достоверное изменение всех этологических показателей.

Таблица 7.

Действие ЭШБ при сочетанном действии с ТЗ на этологические реакции в «открытом поле»

Показатели ДА	Группы животных			
	Фоновое ТЗ	Максимальное ТЗ (МТЗ)	МТЗ+ СЭШБ	МТЗ+ ЭПС
Пробежки	19,7±0,50	7,9±0,23*	21,4±0,84**	21,0±0,40**
Переходы	6,4±0,20	1,9±0,80*	6,1±0,44**	5,5±0,03**
Заглядывания в лунки	7,4±0,42	2,7±0,50*	7,3±0,80**	6,9±0,40**
Стойки	5,4±0,50	1,2±0,72*	5,5±0,33**	5,5±0,02**
Грумминг	5,7±0,22	12,1±3,47 *	6,1±0,30**	5,8±0,07**
Дефекация	1,9±0,35	3,8±0,47 *	1,5±0,02**	1,5±0,10**

* $p < 0,005$ по сравнению с фоновым уровнем ТЗ

** $p < 0,005$ по сравнению с максимальным уровнем ТЗ

Горизонтальная поисковая (пробежки, переходы) и вертикальная исследовательская (заглядывания в лунки, стойки) активность животных группы МТЗ

значимо понижается соответственно на 60 и 70,3 % для первых и 63,5 и 77,8 % для вторых групп показателей. Угнетение поисковой и исследовательской активности свидетельствует о сужении сферы когнитивного поведения, что характерно для стрессовых ситуаций. Эмоциональная активность животных группы МТЗ увеличилась в два раза, как для числа актов груминга (108,6%), так и для числа дефекационных болюсов (100%). Увеличение уровня дефекации и частоты груминга отражают усиление тревожности мышей. Сочетание понижения уровня исследовательской активности животных и развитие эмоциональной реакции страха отражает возрастание тревожности. Подавление двигательной поисковой (пробежки и переходы) и исследовательской (заглядывания и стойки) активности одновременно с эмоциональным возбуждением (дефекационные болюсы и груминг), свидетельствуют о происшедшем под действием техногенного загрязнения (ТЗ) сдвиге эмоционально-мотивационного статуса животных и повышении уровня неспецифической возбудимости. Коррекцию нарушений, вызванных введением ксеноагентов, проводили СЭШБ и, в качестве препарата сравнения, ЭПС. Как видно из данных, представленных в таблице 7, все исследуемые параметры в обоих случаях достоверно отличались от показателей группы «максимального загрязнения».

Поисковая двигательная активность, проявляемая в пробежках, активизировалась на 270 и 265 % у групп с коррекцией СЭШБ и ЭПС, проявляемая в переходах - на 321% у группы СЭШБ и 289% при коррекции ЭПС.

Исследовательская активность в результате коррекции практически нормализовалась. Число вертикальных актов возросло в 2,7 и 2,55 раза (заглядывания) для групп с коррекцией СЭШБ и ЭПС 40%, и в 4,58 раза (стойки) для той и другой группы. Для эмоциональной составляющей поведенческих реакций, оцениваемых по количеству актов автогруминга и дефекаций, наблюдалось снижение активности в 2 и 2,5 раза соответственно для обеих групп. Таким образом, снижение уровня названных показателей, свидетельствует о снижении тревожности и ослаблении стрессорной реакции.

Проведенные исследования показали, что СЭШБ из выращенного сырья, введенный в пищевой рацион лабораторных животных, а также ЭПС в качестве препарата сравнения, обладают свойством нормализовать паттерн поведения, изменившийся на фоне введения ксеноагентов. При этом наблюдается повышение поисковой и исследовательской активности с одновременным снижением уровня эмоционального напряжения, что можно рассматривать как понижение уровня неспецифической возбудимости. Таким образом, экспериментальные исследования показали, что препарат

из, полученного при выращивании сырья, обладает выраженной биологической активностью.

Метод приподнятого крестообразного лабиринта позволяет более подробно оценить действие стресс-агентов и препарата на психофизиологическое состояние мышей.

Поведение в ПКЛ оценивали по следующим показателям: двигательная активность (время пребывания и число выходов в открытые рукава лабиринта); исследовательская активность (стойки, дипинг); эмоциональная активность (автогруминг, дефекационные болюсы). Результаты эксперимента с использованием данного теста отражены в таблице 8.

Таблица 8

Действие препаратов растений при сочетанном действии с ТЗ на поведенческие реакции в ПКЛ

Показатели	Группы животных			
	Фоновое ТЗ	Максимальное ТЗ (МТЗ)	МТЗ+ СЭШБ	МТЗ+ ЭПС
Время в ОР, сек	19,7±0,58	1,7±0,63*	20,1±0,50**	19,6±0,40**
Выходы в ОР	4,0±0,25	0,4±0,02*	4,2±0,56**	3,8±0,35**
Стойки	4,5±0,40	2,1±0,41*	5,1±0,60**	4,9±0,50**
Дипинг	3,0±0,26	0,7±0,30*	3,5±0,33**	2,7±0,32**
Груминг	7,8±0,20	12,7±0,90*	7,1±0,30**	7,9±0,14**
Дефекация	0,4±0,05	1,6±0,07*	0,5±0,02**	0,9±0,04

Прим. * $p < 0,005$ по сравнению с фоновым уровнем ТЗ;

** $p < 0,005$ по сравнению с максимальным уровнем ТЗ

Из данных, представленных в таблице 8, видно что, при воздействии максимальных ТЗ отмечается значимое уменьшение, по сравнению с группой фонового уровня, таких показателей поведенческой активности, как время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта в 11,6 раза и выходы в открытый рукав 10 раз.

Показатели вертикальной исследовательской активности (число стоек) в группе МТЗ достоверно снижались практически в 2 раза. Необходимо отметить, что показатель оценки риска - «дипинг» в группе МТЗ также более чем в 3 раза снижался по сравнению с аналогичным показателем фонового стресс-фактора, что свидетельствует о сужении поля когнитивного восприятия вследствие действия стрессора.

Эмоциональная активность у животных при действии стрессора проявилась в усилении груминга (в 1,6 раза) при одновременном увеличении уровня дефекации (в 4 раза), по сравнению с фоновым стрессором. Повышение уровня названных показателей, свидетельствует о возрастании уровня стрессорных гормонов, повышении тревожности и нарастании стрессорной реакции при действии урбанистических ксеноагентов.

Продолжая анализ данных табл. 8, можно видеть, что при сочетанном действии стрессора и растительных экстрактов (шлемника байкальского и патринии скабиозолистной) такой показатель поведенческой активности, как время пребывания

животных в открытых рукавах лабиринта, превышает соответственно в 11,8 и 11,5 раз показатели группы максимального стресса (МТЗ). Аналогичные изменения наблюдаются и в показателе выходов в открытый рукав, который возростал практически в 10 раз в обоих случаях. Также возрастает уровень исследовательской активности, что выражается в увеличении числа стоек с опорой на стенки (в 2,4 и 2,3 раза соответственно) и частоты дипинга (в 5 и 3,8 раза соответственно). Снижение эмоционального напряжения у животных при сочетанном действии стрессора и препаратов выразилось в уменьшении количества актов груминга (в 1,7 и 1,6 раз соответственно) и дефекации (в 3,2 и 1,8 раз соответственно). Снижение уровня названных показателей свидетельствует о снижении уровня стрессорных гормонов, уменьшении тревожности и ослаблении стрессорной реакции.

Под действием препаратов СЭШБ и ЭПС показатели двигательной, исследовательской и эмоциональной активности достоверно приближались к фоновым показателям, что свидетельствует о нормализации психо-эмоционального состояния животных.

Полученные данные позволяют рассчитать индексы тревожности животных: I_t – показатель индекса по времени пребывания в открытых рукавах; I_n - показатель индекса по числу выходов в открытые рукава. Эти показатели являются стандартными в методике оценки тревожности лабораторных животных. Соотношение показателя индекса и уровня тревожности выражается обратной пропорцией. Индексация уровня тревожности изучаемых групп животных представлена на рис. 3.

Для группы МТЗ индекс тревожности по времени нахождения был в 19,3; 20,3 и 19,5 раз меньше, чем в группах фонового загрязнения и МТЗ+СЭШБ и МТЗ+ЭПС, индекс тревожности по числу выходов был меньше в 2,5 раза по сравнению со всеми группами.

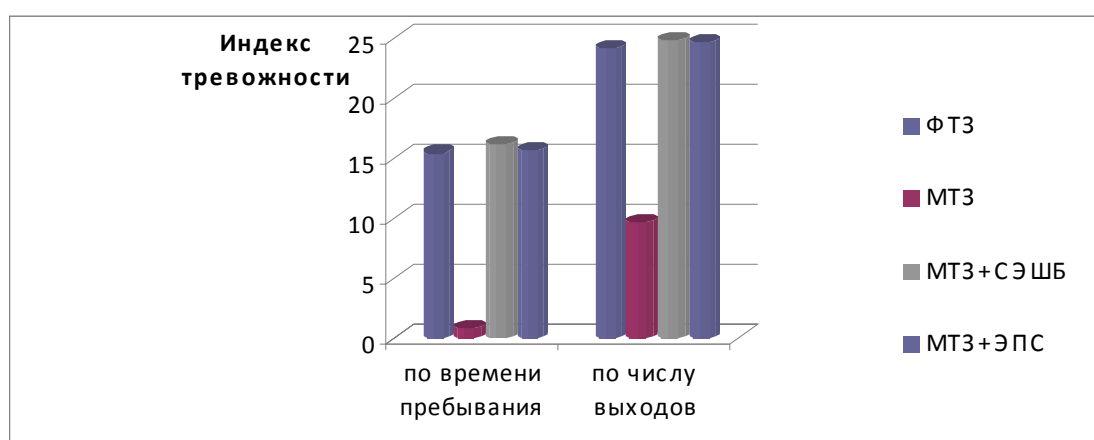


Рис. 3. Действие сухого экстракта шлемника байкальского и экстракта патринии скабиозолистной при сочетанном действии с техногенным загрязнением на индекс тревожности в ПКЛ.

Исходя из данных, представленных на рисунке, следует, что у животных группы, в пищу которых вводили листья липы из района с максимальным уровнем ТЗ, уровень тревожности достоверно был выше по сравнению с фоновой группой.

В ПКЛ животные групп сочетанного действия МТЗ+СЭШБ и МТЗ+ЭПС успешно преодолевали действие стрессора. У животных этих групп по сравнению с группой максимального ТЗ наблюдается достоверное увеличение индексов тревожности, что свидетельствует о нормализации психосоматического состояния лабораторных животных, и наличии выраженной биологической активности у изучаемого препарата.

3.7.2. Антиоксидантная активность сухого экстракта шлемника байкальского при этаноловом гепатите

На модели этанолового гепатита показано, что СЭШБ обладает антиоксидантным действием, которое предотвращает повреждение печени этанолом, реализуемое гармоничным сочетанием действующих биологически активных веществ, способных подавлять ПОЛ и предупреждать деструкцию мембран. Введение СЭШБ в дозе 10 мг/кг значительно уменьшало токсическое действие этанола, о чем свидетельствуют достоверное снижение интенсивности ПОЛ в печени. На это указывает понижение содержания МДА в гомогенате ткани печени и сыворотке крови крыс, получавших наряду с этанолом СЭШБ, на 46% и 31% соответственно по сравнению с аналогичными показателями у крыс контрольной группы. В 2,3 раза повышается каталазная активность сыворотки крови, что свидетельствует об увеличении потенциала антиокислительной активности сыворотки крови.

Выводы

1. Выращенный в культуре шлемник байкальский в условиях юга Приморского края проходит полный цикл развития с образованием полноценных семян с первого года вегетации. Семенная продуктивность при этом на 14,6 % выше, чем в природных популяциях, что свидетельствует о хорошей адаптации вида к условиям выращивания.
2. Эксплуатационный запас культивируемых растений зависит от плотности посадки, при минимальной плотности урожайность культивируемого *S. baicalensis* в 7,8 раза превосходит урожайность природной популяции.
3. Наибольшее количество флавоноидов в корнях культивируемых растений наблюдается в фазах начала и завершения вегетации у растений 3-го года интродукции. В условиях культуры накопление основного флавоноида – байкалина возрастает более чем в два раза. Накопление минорных флавоноидов возросло на 18,4 %. Накопление байкалина в корнях природной популяции растения на 52,9 %, а общее содержание флавоноидов на 37,4 % меньше, чем в культивированных.

4. Оптимальные условия экстрагирования сырья: измельчение до размера частиц в диапазоне 0,08 – 0,5 мм, оптимальный экстрагент – очищенная вода, соотношение сырья и экстрагента – 1:20, время экстракции – 3 часа при температуре 65±5° С. Они обеспечивают полное извлечение веществ из сырья и позволяют получить максимальное количество флавоноидов в пересчете на байкалин. УЗ экстракция позволяет существенно (в 3 раза) сократить время процесса.

5. Сухой экстракт из корней выращенных в культуре растений показал наличие биологической активности, что выразилось в нормализации психосоматического состояния животных, подвергнутых действию ксенобиотических агентов. Выявлено антиоксидантное действие экстракта, которое предотвращает повреждение печени этанолом.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

Зорикова, С.П., Маняхин, А.Ю. Сравнительный анализ надземной и корневой частей *Patrinia scabiosifolia* Fisch. ex Link // Экология в современном мире: взгляд научной молодежи : мат. Всерос. конф. молодых ученых, Улан-Удэ, 24–27 апр. 2007 г. Улан-Удэ : ГУЗРЦМП МЗ РБ, 2007. С. 259-260.

Зорикова, С.П., Маняхин, А.Ю., Зорикова, О.Г. Семенная продуктивность *Scutellaria baicalensis* Georgi // Естественные и технические науки. 2009. №3 (41). С. 156-158.

Зорикова, С.П., Маняхин, А.Ю., Зорикова, О.Г. Коррекция нарушений, индуцируемых техногенным загрязнением, препаратами *Scutellaria baicalensis*, *Lespedeza bicolor* и *Patrinia scabiosifolia* // Состояние лесов Дальнего востока и актуальные проблемы лесопользования: тез. Всерос. конф. с междунар. участием, Хабаровск, 6-8 окт. 2009 г. Хабаровск : Б.И., 2009. С. 198-200.

Зорикова, С.П., Маняхин, А.Ю., Черняк, Д.М. Антиоксидантная активность экстрактов из дальневосточных растений // Естественные и технические науки, 2009. №5 (43). С.121-124.

Маняхин, А.Ю. Динамика накопления флавоноидов шлемника байкальского, интродуцированного на юге Приморского края // Экосистемы, организмы, инновации: тез. 11-ой Междунар. конф., Москва, 24 июня. 2009 г. М. : МГУ, 2009. С. 43.

Маняхин, А.Ю. Разработка технологий выделения биологически активных веществ // X Междунар. очно-заочная науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых исследователей. Интеллектуальный потенциал вузов - на развитие Дальневосточного региона и стран АТР.– Владивосток, 24 апр. 2008 г. Владивосток : ВГУЭС, 2008. кн. 2. С. 46-47.

Маняхин, А.Ю., Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Динамика накопления флавоноидов в корнях шлемника байкальского *Scutellaria baicalensis* Georgi // Естественные и технические науки, 2009. №3 (41). С. 159-163.

Маняхин, А.Ю., Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Динамика накопления и распределение флавоноидов в органах шлемника байкальского *Scutellaria baicalensis* Georgi // Вест. КрасГАУ., 2009. № 11. С. 79-83.

Маняхин, А.Ю., Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Растительные препараты как корректоры влияния электромагнитных излучений // Состояние лесов Дальнего востока и актуальные проблемы лесопользования : тез. Всерос. конф. с междунар. участием, Хабаровск, 6-8 окт. 2009 г. Хабаровск : Б.И., 2009. С. 217-219.