

Е. А. Абизов¹, О. Н. Толкачёв²**ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ β -КАРБОЛИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ У ВИДОВ РОДА ЛОХ, ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**¹ ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия;² ГУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН, Москва, Россия

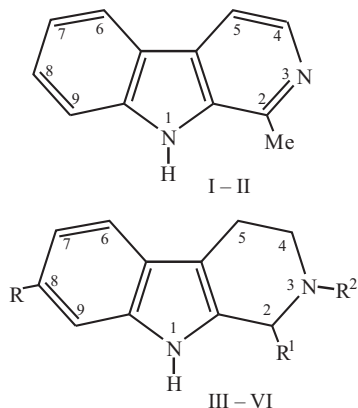
Исследована динамика накопления и распределения β -карболиновых алкалоидов у 6 видов рода лох (*Elaeagnus* L.), интродуцированных в Московской области по этапам онтогенеза, а также изучено накопление этих соединений в коре стеблей и корнях средневозрастных генеративных особей. Установлены возрастные этапы и фенологические фазы, в которых происходит максимальное накопление этих биологически активных веществ.

Ключевые слова: динамика накопления, β -карболиновые алкалоиды, род лох.

Лох (*Elaeagnus* L.) является наиболее многочисленным родом в семействе Elaeagnaceae Adans. и представлен более 40 видами, произрастающими, главным образом, на юге Европы, в умеренной и тропической Азии, Северной Америке и Австралии [1].

На сегодняшний день в России интродуцированы 7 представителей рода *Elaeagnus* L. листопадные: *Elaeagnus angustifolia* L. — лох узколистный; *E. orientalis* L. — л. восточный; *E. oxycarpa* Schlecht. — л. остроплодный; *E. umbellata* Thunb. — л. зонтичный; *E. argentea* Pursh. — л. серебристый; *E. multiflora* Thunb. — л. многоцветковый и вечнозелёный; *E. pungens* Thunb. — л. колючий [2].

Из лоха узколистного, л. восточного, л. зонтичного, л. многоцветкового и л. серебристого были выделены 6 производных β -карболина — гарман (I), дигидрогарман (4,5-дигидро-I) (II), тетрагидрогарман (элеагнин) ($R=R^2=H$, $R^1=Me$) (III), N-метил-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин ($R=R^1=H$, $R^2=Me$) (IV), тетрагидрогармол ($R=OH$, $R^1=Me$, $R^2=H$) (V) и N-метилтетрагидрогармол ($R=OH$, $R^1=R^2=Me$) (VI) [3].



Нейрофармакологический анализ синтетических β -карболинов, проведённый в работе [4], показал, что они являются универсальными модуляторами функций ГАМК и моноаминергических синапсов мозга.

Эндогенные β -карболины, в том числе гарман, содержание которого в ЦНС достигает десятков нано-

граммов на 1 г ткани, имеют экстранейрональное происхождение, так как образуются в результате превращений триптофана.

Эти соединения являются транс- и постсинаптическими модуляторами функций моноаминергических и (или) ГАМК-ергических синапсов, они усиливают импульсное высвобождение норадреналина, дофамина и серотонина, воздействуя на аксонные терминалы моноаминергических нейронов. Повышая внутрисинаптическую концентрацию названных аминов, β -карболины проявляют антидепрессивные свойства и воспроизводят фармакологические эффекты классических антидепрессантов (имипрамина, амитриптилина), способность которых нормализовать настроение (тимоаналептическое действие) используется в лечении депрессий и депрессивных состояний.

В официальной медицине препараты на основе синтетических β -карболинов (амбокарб и абекарнил) эффективно применяются в качестве корректоров настроения и уровня тревожности, а также противосудорожных средств [4, 5].

В настоящее время поиск природных источников сырья для получения этих соединений является актуальной задачей современной фармации.

Целью нашей работы являлось определение динамики накопления и распределения β -карболиновых алкалоидов у видов рода лох (*Elaeagnus* L.), интродуцированных в Московской области по этапам онтогенеза.

Экспериментальная часть

Объектами изучения являлись вегетативные органы ювенильных (*j*), имматурных (*im*), взрослых вегетативных (*v*), молодых (*g1*), средневозрастных (*g2*), старых генеративных (*g3*), субсенильных (*ss*) и сенильных растений (*s*) лоха узколистного, л. восточного, л. остроплодного, л. многоцветкового, л. зонтичного и л. серебристого, интродуцированных в условиях открытого грунта.

Материал для исследования был заготовлен в посёлке Рассудово Наро-Фоминского района Московской области.

Периодизация большого жизненного цикла, а также фенологических фаз охарактеризованы по классическим ботаническим методикам [6]. Из каждой возрастной группы сырья заготавливали с 5 особей.

Выделение суммы алкалоидов производили по модифицированной методике [7]: измельчённое сырьё в количестве 1 кг загружали в перколяторы и смачивали 10 % раствором аммиака, через 30 мин заливали дихлорэтаном 1:10. Дихлорэтановое извлечение через 24 ч сливали. Данную процедуру повторяли дважды. Из полученного экстракта алкалоиды извлекали 10 % соляной кислотой до отрицательной реакции с 1 % раствором кремне-вольфрамовой кислоты. Солянокислые извлечения фильтровали, фильтрат подщелачивали 25 % раствором гидрата окиси аммония до pH = 10 и алкалоиды исчерпывающе извлекали хлороформом. Хлороформные извлечения объединяли, затем отгоняли растворитель на роторном испарителе Watterbath-480 фирмы Büchi (Швейцария) под вакуумом при температуре водяной бани 60 – 90 °С. Сумму алкалоидов высушивали в эксикаторе над MgSO₄. Затем её растворяли в 5 % серной кислоте, нерастворившуюся часть отфильтровывали, фильтрат охлаждали до +4 °С и подщелачивали 20 % раствором едкого натра до pH = 10. Осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и высушивали в эксикаторе под вакуумом до постоянной массы (фракция 1). Раствор переносили в делительную воронку и исчерпывающе извлекали диэтиловым эфиром до по-

лучения бесцветных извлечений, дающих отрицательную реакцию с 1 % раствором кремне-вольфрамовой кислоты. Эфирные извлечения сушили безводным поташом и растворитель отгоняли (фракция 2). Затем проводили дальнейшее извлечение водно-щелочного раствора хлороформом (фракция 3).

Фракции алкалоидов были подвергнуты хроматографическому исследованию. Разделение суммы алкалоидов проводили методом препаративной двухмерной хроматографии.

Идентификация веществ проводилась с помощью ТСХ, в качестве свидетелей использовались синтетические β-карболины (гарман, дигидрогарман, тетрагидрогармол и N-β-метилтетрагидрогармол), а также данных ИК- и ¹H-ЯМР спектров.

Количественное определение алкалоидов производных β-карболина проводили спектрофотометрическим методом на регистрирующем спектрофотометре EP-3T фирмы Hitachi при длине волны 280 нм. Для этого 10 г измельчённого сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм (точная навеска), исчерпывающе экстрагировали 96 % этанолом в аппарате Сокслета, экстракт количественно переносили в мерную колбу на 200 мл и доводили до метки. Наносили 10 мл полученного раствора (в несколько приёмов) с помощью микропипетки на линию старта хроматографической пластинки фирмы Merck G-60-TLC на стеклянной подложке размером 10 × 10 см по 3 полосы, высушивали на воздухе, хроматографировали восходящим способом в системе 3 % раствора метанола в хлороформе; высушивали и просматривали в УФ-свете при длине волны 280 нм. Отмеченные зоны алка-

Таблица 1

Динамика накопления и распределения суммы β-карболиновых алкалоидов (производных гармана) (в %) по этапам жизненного цикла у представителей рода *Elaeagnus* L., интродуцированных в условиях открытого грунта Московской области

Возрастное состояние	<i>E. angustifolia</i> L.		<i>E. orientalis</i> L.		<i>E. oxycarpa</i> Schlecht.		<i>E. multiflora</i> Thunb.		<i>E. umbellata</i> Thunb.		<i>E. argentea</i> Pursh.	
	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень
Ювенильные растения (<i>j</i>)	–	следы	–	следы	–	следы	–	следы	–	следы	–	следы
Иматурные растения (<i>im</i>)	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Взрослые вегетативные растения (<i>v</i>)	0,57 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,68 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,59 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,20 ± 0,02
Молодые генеративные растения (<i>gl</i>)	0,47 ± 0,05	0,15 ± 0,03	0,56 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,46 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,06 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,11 ± 0,03
Средневозрастные генеративные растения (<i>g2</i>)	0,32 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,35 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,33 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Старые генеративные растения (<i>g3</i>)	0,15 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Субсенильные растения (<i>ss</i>)	0,05 ± 0,02	следы	0,06 ± 0,02	следы	0,05 ± 0,02	следы	0,03 ± 0,01	следы	0,05 ± 0,02	следы	0,02 ± 0,01	следы
Сенильные растения (<i>s</i>)	следы	н/о*	следы	н/о	следы	н/о	н/о	н/о	следы	н/о	н/о	н/о

* Не обнаружено

Динамика накопления и распределения суммы β -карболиновых алкалоидов (производных гармана) (в %) по фенологическим фазам у средневозрастных генеративных особей лоха в Наро-Фоминском районе Московской области

Фенологическая фаза	<i>E. angustifolia</i> L.		<i>E. orientalis</i> L.		<i>E. oxycarpa</i> Schlecht.		<i>E. multiflora</i> Thunb.		<i>E. umbellata</i> Thunb.		<i>E. argentea</i> Pursh.	
	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень	кора стебля	корень
Распускание почек — начало вегетации	0,29 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Бутонизация — начало цветения	0,32 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Цветение — начало образования плодов	0,29 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Созревание плодов	0,27 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Конец вегетации (листопад)	0,19 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01

лоидов собирали в приёмник, элюировали 25 мл 96 % этанола при 40–50 °С, фильтровали через стеклянный фильтр № 4 и определяли оптическую плотность растворов.

Расчёт содержания алкалоидов в сырье производили по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot l \cdot m \cdot V}$$

где D — оптическая плотность растворов алкалоидов; V_1 — объём исследуемого раствора (мл); V_2 — объём спирта, использованного для элюирования алкалоидов с хроматограммы (мл); l — толщина кюветы (см); m — навеска (г); V — количество раствора, нанесённого на пластинку (мл).

Учитывая тот факт, что в области рабочих концентраций (10–60 мг/мл) поглощение элюатов подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бэра, для расчёта нами был использован удельный показатель поглощения.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что максимальное накопление и локализация алкалоидов у большинства растений, в том числе и видов лоха, происходит в корнях, а также в коре стеблей [8].

Были изучены растения, находившиеся в 8 возрастных состояниях, кроме проростков и всходов — из-за недостатка семенного материала и, как следствие, нехватки биомассы для проведения статистически достоверных исследований.

Растительный материал был получен в схожих условиях (почва, микроклимат, уход). Первичную обработку и сушку сырья осуществляли по ОФС ГФ XI на кору, а также корни. Содержание гармана, дигидрогармана, тетрагидрогармана проводили по вышеописанной методике отдельно — в коре стеблей и корней.

Результаты изучения динамики накопления и распределения суммы β -карболиновых алкалоидов по этапам большого жизненного цикла у представителей рода *Elaeagnus* L., интродуцированных в условиях открытого грунта Московской области, представлены в табл. 1.

Динамика накопления и распределения суммы β -карболиновых алкалоидов по фенологическим фазам у средневозрастных генеративных особей 6 видов лоха, культивируемых в Наро-Фоминском районе Московской области, приведены в табл. 2

В ходе изучения выявлена общая тенденция к плавному увеличению содержания алкалоидов во всех органах растений в виргинильный этап онтогенеза. Максимум накопления обнаружен в коре молодых генеративных растений. В конце генеративного периода выход суммы β -карболиновых алкалоидов заметно снижается. У иматурных растений содержание алкалоидов в надземных и подземных органах примерно равно. При дальнейшем развитии растений наблюдается увеличение выхода продукта из коры стеблей исследованных видов лоха.

Установлено, что алкалоидоносность лоха восточного превышает этот показатель у других видов. Лох узколистный и л. остроплодный по содержанию суммы β -карболиновых алкалоидов примерно равны.

В подземной части обнаружена тенденция к резкому снижению алкалоидов при переходе надземных побегов в генеративное состояние (см. табл. 2).

У особей, находившихся на финитивной стадии виргинильного периода развития (1 год вегетации — взрослые вегетативные растения (v)), обнаружено самое высокое содержание суммы гармана, дигидрогармана и тетрагидрогармана (элеагнина) в фазу вегетации.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Л. Витковский, *Плодовые растения мира*, Санкт-Петербург (2003), сс. 242–244.

2. В. Д. Иванов, Е. А. Абизов, "Биологическое разнообразие. Интродукция растений", Материалы IV международной научной конференции, Санкт-Петербург (2007), сс. 264 – 266.
3. О. Н. Толкачёв, Е. А. Абизов, Е. В. Абизова, С. Д. Мальцев, *Хим.-фарм. журн.*, **42**(11), 27 – 29 (2008).
4. В. И. Дуленко, И. В. Комиссаров, А. Т. Долженко, Ю. А. Николукин, *β-карболины. Химия и нейробиология*, Наукова Думка, Киев (1992), сс. 4 – 192.
5. В. С. Бабаскин, Е. А. Абизов, О. Н. Толкачёв, Е. В. Абизова, *XIV Российский национальный конгресс "Человек и лекарство"*, Тез. докл., 16 – 20 апреля 2007, Москва (2007), с. 52.
6. А. А. Уранов, *Биол. науки*, № 2, 7 – 34 (1976)
7. А. Г. Николаева, А. П. Прокопенко, П. Е. Кривенчук, *Химия природ. соедин.*, № 6, 708 – 711 (1970).
8. М. Я. Ловкова, *Биосинтез и метаболизм алкалоидов в растениях*, Наука, Москва (1981), сс. 17 – 23.

Поступила 16.02.10

DYNAMICS OF ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF β -CARBOLINE ALKALOIDS IN *ELAEAGNUS* SPECIES CULTIVATED IN MOSCOW REGION

E. A. Abizov¹ and O. N. Tolkachev²

¹ Sechenov State Medical Academy, Moscow, Russia.

² All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, Russia.

Dynamics of the accumulation and distribution of β -carboline alkaloids in six species of *Elaeagnus* genus cultivated in Moscow region have been studied in various phases of ontogenesis and the accumulation of these alkaloids in the stem bark and roots of medium-age plants has been evaluated. Age stages and phenological phases of the maximum accumulation of biologically active substances in plants have been established.

Key words: β -carboline alkaloids, accumulation dynamics, *Elaeagnus* species