



ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА
АЛЛАНТОИНА В КОРЕ МОЛОДЫХ И ПРОШЛОГОДНИХ
ПОБЕГОВ ОБЛЕПИХИ ВИДА *HIPPORHAE RHAMNOIDES L.*
СОРТОВ LEIKORA И HERGO

С.А. Воронцов, студент гр. 15-ПБ /б,
механико-технологический факультет, ФГБОУ ВО
«Калининградский государственный технический университет»,
e-mail: stas13061337@gmail.com

О.Я. Мезенова, д.т.н., профессор, зав. кафедрой пищевой
биотехнологии ФГБОУ ВО «Калининградский государственный техниче-
ский университет», e-mail: mezenova@klgtu.ru;

Й.-Т. Мёрзель, д.е.н., профессор, Берлинский технический
университет (TU Berlin), e-mail: thomas.moersel@ubf-research.com

Показаны результаты исследования биопотенциала облепихи крушиновидной *Hipporhae rhamnoides L.* и количественного содержания аллантаина в коре молодых (2018) и прошлогодних (2017) побегов облепихи крушиновидной *Hipporhae rhamnoides L.* на примере сортов Лейкора (Leicora) и Херго (Hergo), произрастающих на территории Германии. В работе модифицирована методика определения аллантаина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с предварительной водно-спиртовой экстракцией. Результаты показывают, что кора и молодые стебли облепихи могут быть использованы для дальнейшей вторичной переработки с целью получения аллантаина в виде готового продукта, применяемого в медицине и косметологии. Установлены рациональные значения рН и соотношения воды и спирта в растворе для экстракции аллантаина из сырья. Показано, что сорт облепихи Херго содержит большее количество аллантаина, чем сорт Лейкора. Актуально его выделение по обоснованным параметрам и использование в биотехнологии, косметической и медицинской промышленности.

аллантаин, облепиха, Hipporhae rhamnoides L., кора, молодые побеги, ВЭЖХ

ВВЕДЕНИЕ

Облепиха является источником ценного сырья для получения концентратов поливитаминов и важных лечебных препаратов в связи с присутствием в ее плодах, листьях и корнях ценных биологически активных веществ (БАВ): легкоусвояемых сахаров, органических кислот, каротина, витаминов (С, Р, В₁, В₂, В₉), дубильных и красящих веществ, минеральных солей [1].

В мякоти, коже и косточках плодов облепихи содержатся липиды, которые успешно используются в лечебной практике. Известно, что в листьях и коре облепихи содержится редкое биологически активное вещество – аллантаин, являющееся продуктом окисления мочевой кислоты [2]. Аллантаин применяется в биотехнологии и медицине, как специализированная добавка к БАДам и лекарственным препаратам, а также он один из основных компонентов в производстве косметических кремов [2].

Одним из важнейших направлений развития человечества на сегодняшний день является здравоохранение, направленное на повышение качества жизни человека. Вследствие этого за последние 20 лет активно разрабатываются и внедряются новые лекарственные препараты, получаемые синтетическим путем, которые в большинстве случаев проявляют строго определённую активность [3].

Поскольку организм человека представляет собой сложную саморегулирующуюся систему, то лечение монолекарствами оказывает воздействие не только на больные, но и на здоровые органы, что приводит к подавлению и снижению общих защитных свойств ор-

ганизма [3]. Из-за этого иммунитет человека падает, а опасные бактерии и вирусы, находящиеся под постоянным действием лекарств, мутируют и вырабатывают иммунитет, в результате чего лекарства перестают оказывать должное влияние.

Данные факторы объясняет возросший интерес к лекарственным препаратам из растений. Одним из таких растений является облепиха, прежде всего, ее плоды, которые известны в качестве противовоспалительного, отхаркивающего, болеутоляющего, противоожогового средства, традиционно применялись при ревматизме, заболеваниях желудка и язвенной болезни [1].

Между тем листья облепихи изучены не достаточно хорошо. Известно, что в листьях и коре облепихи содержатся дубильные вещества, небольшое количество нейромедиатора серотонина, а также аллантаина, обладающего анестетическими, вяжущими и противовоспалительными свойствами.

В связи актуальностью проблемы целью настоящего исследования являлось изучение количественного состава аллантаина в коре молодых (2018) и прошлогодних (2017) побегов облепихи вида *Hippophae rhamnoides L.* сортов Лейкора (Leikora), произрастающего в своей основной массе на побережьях Германии вдоль Балтийского моря, и Херго (Hergo), распространенного по всей территории Германии.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить биопотенциал облепихи вида *Hippophae rhamnoides L.*
2. Исследовать кору молодых и прошлогодних побегов зелёных веточек облепихи на содержание растительного аллантаина.
3. Установить рациональные значения рН и соотношения воды и этилового спирта в экстракционном растворе при выделении аллантаина из сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по извлечению аллантаина из старых (коричневых) и молодых (зелёных) веточек облепихи проводились в экспериментальной биохимической лаборатории Научно-консультационного исследовательского центра UBF – Untersuchungs-, Beratungs-, Forschungs-Laboratorium GmbH (Германия, г. Берлин). Испытания проводили в 2018 г. с конца мая до середины августа.

В исследовании использовались молодые и прошлогодние побеги облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides L.* и её кора двух различных сортов. Сорт Лейкора (Leikora) произрастает в своей основной массе на побережьях Германии вдоль Балтийского моря, сорт Херго (Hergo) наиболее распространен на всей территории Германии.

Первоначально был изучен и определен наиболее рациональный метод экстракции аллантаина из коры молодых побегов облепихи. Экстракты анализировались на содержание аллантаина методом ВЭЖХ на высокопроизводительном жидкостном хроматографе с установленными на нём помпой LC10AD фирмы «SHIMADZU», детектором диодной матрицы SPD-M10A «SHIMADZU», системным контроллером SCL-10A фирмы «SHIMADZU», автосемплером серии 1050 от фирмы «Hewlett Packard», дегазатором с моделью D6-1210 фирмы «Uniflows» [4].

Первоначально кору от побегов прошлогодних и молодых веточек облепихи отделяли и измельчали с помощью кофемолки со скоростью вращения рабочих органов 500-700 об/мин. После высушивания облепиховую смесь взвешивали на аналитических весах с массой навески 2 г ($\pm 0,0005$ г), ссыпали в мерные колбы объёмом 25 мл и доводили до метки водным раствором с различным рН.

Для экстракции использовали два раствора с рН 7 (процентное соотношение воды и этанола 100:0, 75:25 и 50:50) и рН 5 (процентное соотношение воды и 0,1 н раствора ацетата аммония 100:0, 75:25 и 50:50).

После соединения облепиховой массы и экстрагируемого раствора их тщательно перемешивали с помощью УЗ-бани серии RK100H «SONOREX» при температуре (20...25°C) на 15 мин.

По завершении экстракции полученные взвеси фильтровали через бумажный фильтр, после чего раствор переносили в специальные колбы объёмом 2 мл для последующего анализа методом ВЭЖХ.

Предварительно необходимо было подготовить раствор подвижной фазы хроматографа и стандартные растворы аллантаина, которые необходимы для корректной работы ВЭЖХ.

При подготовке подвижной фазы смешивали дистиллированную воду, метанол и ацетонитрил в соотношении 50:30:20, смесь помещали в УЗ-баню при комнатной температуре (22°C) на 15 мин.

Время обработки каждой пробы с аллантаином в хроматографе заняло более 30 мин для каждого из образцов [5]. Таким образом, на анализ всех экспериментальных проб, включая стандартные растворы и время смены подвижной фазы, понадобилось более суток реального времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены полученные данные по анализу образцов облепихи, экстрагированных водным раствором с кислотностью pH7.

Таблица 1 – Количественные данные по содержанию аллантаина в водно-спиртовых экстрактах из коры облепихи сортов Лейкора (Lekora) и Херго (Hergo), экстрагированных при pH=7

pH7							
Lekora				Hergo			
время сбора	процентное соотношение вода : этанол	C* [мг/10мл]	Х**	время сбора	процентное соотношение вода : этанол	C [мг/10мл]	Х
Июль	100:0	59,38	34658979,5	Июль	100:0	40,84	24146494,5
	75:25	87,51	50601544,5		75:25	57,40	33534184
	50:50	41,94	24770405		50:50	37,48	22244262,5
Август	100:0	40,84	24146494,5	Август	100:0	16,81	10531125
	75:25	57,40	33534184		75:25	19,04	11792118
	50:50	37,48	22244262,5		50:50	12,78	8244722,5

Примечание: C* - концентрация аллантаина в растворе при экстракции из облепихи за июль - август 2017 г. при pH=7.

Х** - среднее арифметическое высоты пиков ВЭЖХ растворов экстракции аллантаина.

Из данных табл. 1 можно сделать вывод, что растворы экстракции из коры облепихи вида *Hipporhae rhamnoides L.* сорта Лейкора (Lekora) содержат в себе большее количество аллантаина, чем экстракты из коры облепихи сорта Херго (Hergo). Наибольшее количество аллантаина экстрагируется спиртовым раствором при соотношении вода: этанол, как 75:25%, далее по убыванию – растворами с соотношением воды и этанола 100:0 и 50:50% соответственно.

После получения результата был проведён анализ данных о содержании аллантаина в экстрактах коры облепихи и количественного состава аллантаина в экспериментальных навесках облепихи. Для этого было необходимо высчитать концентрацию аллантаина в образце (мг/10 мл), которую рассчитывали на основе уравнения линейной регрессии стандартной кривой площади пика поглощения (РА) при длине волны 210 нм.

Далее производили перерасчёт навески экспериментальной пробы из 25 мл на 10 мл:

$$2 \text{ г}/25 \text{ мл} = 0,08 \text{ г}/\text{мл}, \quad (1)$$

$$0,08 \text{ г}/\text{мл} \times 1000 = 80 \text{ мг}/\text{мл}, \quad (2)$$

$$80 \text{ мг}/\text{мл} \times 10 = 800 \text{ мг}/10 \text{ мл}. \quad (3)$$

Для получения информации о содержании аллантаина в экспериментальных пробах необходимо было найти среднее арифметическое значение значений C и, основываясь на полученных данных, установить количество аллантаина в исследуемой навеске.

$$\bar{X}(pH7) = \frac{\sum(A_{pH7} + B_{pH7} + C_{pH7} + \dots)}{N}, \quad (4)$$

$$\bar{X}(pH5) = \frac{\sum(A_{pH5} + B_{pH5} + C_{pH5} + \dots)}{N}. \quad (5)$$

Если сравнивать содержание аллантина в навесках (показатели \bar{X} и ω), то можно заметить, что наибольшее количество приходится на облепиху сорта Лейкора, в то время как в облепихе сорта Херго эта цифра ниже при всех условиях экстракции (табл. 2).

Таблица 2 - Содержание аллантина в облепиховом сырье и водно-спиртовых экстрактах из коры облепихи сорта Лейкора (Lekora), экстрагированных при pH=7

Lekora					
Июль			Август		
процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность
100:0	0,074	±0,001	100:0	0,051	±0,001
75:25	0,109	±0,001	75:25	0,072	±0,001
50:50	0,052	±0,001	50:50	0,047	±0,001
\bar{X}^*	0,079		\bar{X}	0,057	
ω^{**} , мг%	0,393		ω , мг%	0,285	

Примечание: \bar{X}^* - средняя арифметическая концентрация аллантина в растворах экстракции облепихи;

ω^{**} - содержание аллантина в облепиховом сырье, мг%.

Из данных табл. 2 видно, что наибольшее содержание аллантина установлено в образцах, собранных в июле (0,393 мг%): в 1,39 раза больше, чем в образцах, собранных месяцем позже (0,285 мг%).

Подобную зависимость в содержании аллантина мы видим в табл. 3, показывающей, что процентное содержание аллантина сорта Херго составило 0,101 мг%, в то время как в июльских образцах этот показатель был равен 0,158 мг%.

Таблица 3 - Содержание аллантина в облепиховом сырье и водно-спиртовых экстрактах из коры облепихи сорта Херго (Hergo) при pH=7

Hergo					
Июль			Август		
процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность
100:0	0,025	±0,001	100:0	0,021	±0,001
75:25	0,038	±0,001	75:25	0,024	±0,001
50:50	0,032	±0,001	50:50	0,016	±0,001
\bar{X}	0,032		\bar{X}	0,020	
ω , мг%	0,158		ω , мг%	0,101	

Примечание: см. пояснения к табл. 2.

По результатам анализа образцов облепихи крушиновидной, экстрагированной растворами с кислотностью pH5, были также подготовлены табл. 5-6.

Из данных табл. 4 можно сделать вывод, что из коры облепихи вида *Hipporhae rhamnoides* L. сорта Лейкора (Lekora) также экстрагируется большее количество аллантина, чем из коры облепихи сорта Херго (Hergo) при всех условиях экстракции при pH 5.

Зависимость, установленная выше в экспериментах с кислотностью pH 7, подтвердилась и в данных экспериментах, проводимых в кислой среде (pH 5): наибольшее количество аллантина было экстрагировано с помощью раствора вода : этанол в соотношении 75:25%, далее эффективность извлечения убывала при концентрации этанола 0 и 25% соответственно. При этом важно отметить, что при pH5 извлечение аллантина осуществляется более эффективно, чем при pH7, не зависимо от состава экстракционного раствора.

Таблица 4 - Количественное содержание аллантиина в экстракте из коры облепихи сортов Лейкора (Leikora) и Херго (Hergo), экстрагированного при pH=5

pH5							
Leikora				Hergo			
время сбора	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	\bar{X}	время сбора	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	\bar{X}
Июль	100:0	75,86	43998581	Июль	100:0	49,43	24744473
	75:25	123,10	70773662,5		75:25	80,74	40838214
	50:50	83,20	48158975		50:50	76,92	39895072,5
Август	100:0	41,89	29017326,5	Август	100:0	47,28	27797481,5
	75:25	70,28	46765863		75:25	86,92	50266068
	50:50	68,62	44599107,5		50:50	59,00	34444024

Примечание: см. пояснения к табл. 1.

Из данных табл. 5 можно сделать вывод, что наибольшее количество аллантиина приходится на раствор экстракта из коры облепихи сорта Лейкора, собранной в июле, при проведении спиртовой экстракции при pH=5. Определенное количество составляет 0,588 мг% в июльском и 0,431 мг% в августовском сырье.

Таблица 5 - Содержание аллантиина в облепиховом сырье и экстракте из коры облепихи сорта Лейкора (Leikora), экстрагированного при pH=5

Leikora					
Июль			Август		
процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность
100:0	0,095	±0,001	100:0	0,062	±0,001
75:25	0,154	±0,001	75:25	0,101	±0,001
50:50	0,104	±0,001	50:50	0,096	±0,001
\bar{X}	0,117		\bar{X}	0,086	
ω , мг%	0,588		ω , мг%	0,431	

Примечание: см. пояснения к табл. 2

Аналогичный вывод можно сделать по данным табл. 6, в которой приведены данные анализа коры облепихи сорта Херго в зависимости от времени сбора при pH 5: количество аллантиина в сырьевых образцах, собранных в июле, составило 0,376 мг%, при этом в августовских образцах этот показатель был несколько ниже – 0,403 мг%.

Таблица 6 - Содержание аллантиина в облепиховом сырье и экстрактах из коры облепихи сорта Херго (Hergo), экстрагированных при pH=5

Hergo					
Июль			Август		
процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность
100:0	0,052	±0,001	100:0	0,059	±0,001
75:25	0,088	±0,001	75:25	0,109	±0,001
50:50	0,086	±0,001	50:50	0,074	±0,001
\bar{X}	0,075		\bar{X}	0,080	
ω , мг%	0,376		ω , мг%	0,403	

Примечание: см. пояснения к табл. 2

Обобщая представленные выше данные, можно сделать вывод, что выход аллантиина из коры облепихи крушиновидной вида *Hippophae rhamnoides L.* при экстрагировании водно-спиртовыми растворами этанола выше у сорта Лейкора (Leikora), чем у сорта Херго (Hergo). При этом экстракция в среде с pH=5 во всех сортах облепихи, независимо от времени сбора и состава водно-спиртового раствора, осуществляется более эффективно, чем при pH=7 (табл. 7 и 8).

Таблица 7 - Количественные данные о содержании аллантиина в водно-спиртовых экстрактах из коры и молодых побегов облепихи сорта Лейкора (Lekora) при pH=7 и pH=5

Кора				Побеги			
кислотность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	Х	кислотность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	Х
pH7	100:0	96,01	34658979,5	pH7	100:0	79,11	34658979,5
	75:25	159,83	50601544,5		75:25	134,63	50601544,5
	50:50	145,62	24770405		50:50	119,68	24770405
pH5	100:0	90,59	34658979,5	pH5	100:0	77,90	34658979,5
	75:25	99,07	50601544,5		75:25	83,17	50601544,5
	50:50	94,85	24770405		50:50	77,62	24770405

Примечание: см. пояснения к табл. 1

Кора облепихи крушиновидной вида *Hippophae rhamnoides L.* сорта Лейкора (Lekora) содержит в себе большее количество аллантиина, чем молодые побеги вместе с корой того же вида (табл. 7). При этом можно говорить о следующей зависимости: наибольшее количество аллантиина экстрагируется с помощью 25%-ного водного раствора этанола, в котором соотношение «вода : этанол» составляют 75:25%.

Таблица 8 - Содержание аллантиина в облепиховом сырье и экстрактах из коры облепихи сорта Лейкора (Lekora), проводимой в кислой (pH 5) и нейтральной водно-спиртовых средах (pH 7)

Lekora Кора					
pH7			pH5		
процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность	процентное соотношение вода : этанол	С [мг/10мл]	погрешность
100:0	0,120	±0,001	100:0	0,113	±0,001
75:25	0,200	±0,001	75:25	0,124	±0,001
50:50	0,182	±0,001	50:50	0,119	±0,001
Х	0,167		Х	0,119	
ω, мг%	0,837		ω, мг%	0,593	

Примечание: см. пояснения к табл. 2

Из данных табл. 8 видно, что наибольшее содержание аллантиина при экстрагировании из коры облепихи сорта Лейкора переходит в экстракт при pH 7 и составляет 0,837 мг%, что в 1,4 раза выше, чем при проведении процесса при pH=5.

Аналогичная зависимость может быть констатирована по результатам экстракции, приведенным в табл. 9: в нейтральной среде концентрация аллантиина, экстрагированного из облепихового сырья, составила 0,695 мг%, что в 1,39 раза меньше, чем при экстрагировании в кислой сред при pH=5 (0,495 мг%).

Таблица 9 - Содержание аллантиина в облепиховом сырье и водно-спиртовых экстрактах из молодых побегов облепихи сорта Лейкора (Lekora) при проведении экстракции в кислой и нейтральной средах

Lekora Молодые побеги					
pH7			pH5		
процентное соотношение вода : этанол	С [mg/mg]	погрешность	процентное соотношение вода : этанол	С [mg/mg]	погрешность
100:0	0,099	±0,001	100:0	0,097	±0,001
75:25	0,168	±0,001	75:25	0,104	±0,001
50:50	0,150	±0,001	50:50	0,097	±0,001
Х	0,139		Х	0,099	
ω, мг%	0,695		ω, мг%	0,495	

Примечание: см. пояснения к табл. 2.

ВЫВОДЫ

Содержание аллантиина в коре облепихи крушиновидной вида *Hippophae rhamnoides L.* у сорта Лейкора (Leikora) выше, чем в молодых побегах. Экстрагирование аллантиина из образцов коры и молодых побегов водно-спиртовым раствором этанола при pH=7 проходит эффективнее, чем в кислой среде при pH=5.

Рациональной концентрацией этанола в водном растворе при извлечении аллантиина из коры молодых и прошлогодних побегов облепихи является величина 25% (вода и этанол берутся в соотношении 75:25).

В количественном анализе сорт облепихи Херго менее эффективен по содержанию и извлечению аллантиина, чем сорт Лейкора, независимо от pH экстрагируемого водно-спиртового раствора.

В свежей коре облепихи аллантиина содержится практически в 1,5 раза больше, чем в образцах, хранившихся год или более, независимо от вида облепихи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельник, А. В. Облепиха – источник здоровья / А. В. Мельник // Наука и жизнь. – 2018. – №10. – С. 2-4.
2. Орасмяэ-Медер, Т. Биохимические свойства аллантиина / Т. Орасмяэ-Медер, О. Шатрова // Наука красоты: Из чего на самом деле состоит косметика. – 2016. – 376 с.
3. Рахимов, И. Ф. Биохимический состав и фармакологические свойства масел облепихи и каперсов колючих, произрастающих в Таджикистане: дис.... д-ра мед. наук: 14.00.25: защищена 22.01.06: утв. 15.07.06 / Рахимов Исматулло Фатхуллоевич. – Душанбе, 2006. – 5-9 с.
4. Компания производитель «Шимадзу»: руководство по эксплуатации: жидкостная хроматография. – 2016. – С. 25-34, 112-115. [Электронный ресурс]. – Режим доступа к электрон. журн.: https://www.shimadzu.ru/sites/default/files/application_handbook_hplc.pdf / Корпорация Шимадзу: пер. с англ [Shimadzu manufacturer: Liquid Chromatography, 2016, p. 25-34, 112-115].
5. Клауде, М. Научная хроматография: руководство ВЭЖХ / М. Клауде, А. Йарди: пер. с нем. [(Hand book of HPLC)]. – 1998. – Т. 78. – Рр. 325-333.

INVESTIGATION OF QUANTITATIVE COMPOSITION OF ALLANTOINE IN BARK AND YOUNG BRANCHES OF 2017 AND 2018 *HIPPOPHAE RHAMNOIDES L.*, OF THE VARIETIES LEIKORA AND HERGO

S.A. Vorontsov, student
stas13061337@gmail.com

O.Ya. Mezenova, Dr. of Techn. Sciences, Professor,
mezenova@klgtu.ru

Kaliningrad State Technical University

The results of the biopotential research of the sea buckthorn *Hippophae rhamnoides L.* and the quantitative content of allantoin in the bark of the young (2018) and last year (2017) shoots of the sea buckthorn and the buckthorn *Hippophae rhamnoides L.* are shown using the example of Leikora and Hergo. In this paper, the method of determination of allantoin was modified using high-performance liquid chromatography (HPLC) with preliminary water-alcohol extraction. The results show that the bark and young stalks of sea buckthorn can be used for further recycling in order to obtain allantoin in the form of a finished product used in medicine and cosmetology. Established rational pH values and the ratio of water and alcohol in solution for the extraction of allantoin from raw materials. It is shown that this variety of sea-buckthorn Hergo contains a larger amount of al-

lantoin than the Leikora variety. It is relevant to isolate it according to reasonable parameters and use in the biotechnology, cosmetic and medical industries.

allantoin, sea-buckthorn, Hippophae rhamnoides L, bark, young branches, HPLC, extraction