

УДК 631.81+631.86

АНАЛИЗ СЕЗОННОЙ ДИНАМИКИ СОДЕРЖАНИЯ ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ В ХВОЕ *PICEA ABIES* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Е.В.Ожимкова¹, Е.М.Короткова², И.П.Ущановский³,
Э.М.Сульман¹

¹Тверской государственной технической университет, Тверь

²Abo Akademi University, Turku, Finland

³ФГБНУ ВНИИМЛ, Тверь

Общеизвестным фактом является то, что хвоя является уникальным возобновляемым ресурсом для получения биологически активных веществ, а продукты ее переработки успешно используются в медицине, сельском хозяйстве, косметологии и т.д. Исследование сезонной динамики изменений химического состава хвои *Picea abies* направлено на определение целесообразных сроков заготовки хвои как сырья для получения шикимовой кислоты.

Ключевые слова: экстракция, биологически активные вещества, шикимовая кислота, *Picea abies*.

DOI 10.26456/vtchem2019.1.16

Шикимовая кислота - ключевое метаболическое промежуточное соединение пути биосинтеза ароматических аминокислот, обнаруженного у микроорганизмов и растений. В последнее десятилетие исследования шикимовой кислоты проводятся особенно активно, поскольку именно она используется в качестве исходного материала для синтеза препарата - ингибитора нейраминидазы, который используется для лечения и профилактики различных вирусов гриппа. Кроме того, производные шикимовой кислоты обладают многими фармакологическими эффектами: антикоагулирующими, противовоспалительными, антиоксидантными [1,2]. В сельском хозяйстве производные шикимовой кислоты могут использоваться в качестве гербицидов и антибактериальных средств, так как они способны блокировать шикиматный путь у растений и бактерий, не нанося вреда животным и человеку, у которых данный метаболический путь отсутствует [3].

На сегодняшний день существуют три основных промышленных подхода к получению шикимовой кислоты: выделение из растительного сырья, микробиологический и химический синтезы [1-4]. Многие растения содержат шикимовую кислоту, поскольку это важный метаболит в биохимических синтезах таких аминокислот как

фенилаланин и триптофан, а также алкалоидов, танинов, флавоноидов и лигнина [5]. Тем не менее, лишь немногие растения могут быть рентабельным сырьем для промышленного производства шикимовой кислоты. Китайский звездный анис (*Illicium Verum*) и бадьян анисовый (*Illicium anisatum L*), произрастающие в горных районах южного Китая, являются самым известным на сегодняшний день промышленно используемым растительным сырьем, содержащим более 3% шикимовой кислоты в сухих семенах. Однако промышленное производство шикимовой кислоты экстракцией из данных растений ограничено и не удовлетворяет огромный спрос на это соединение [6].

К перспективным возобновляемым источникам биологически активных веществ, в том числе, и шикимовой кислоты, можно отнести хвою различных видов хвойных деревьев, которая представляет собой отход заготовки и переработки древесины. Уникальный химический состав хвои позволяет ее использовать в производстве медицинских препаратов, всевозможных экстрактов, парфюмерии, экологически безопасных удобрений и т.д. [7]. По литературным данным [8,9] хвоя ели и сосны содержит от 1,5-2,5% шикимовой кислоты.

Однако для промышленной переработки хвои существуют определенные сложности, например, сезонные изменения содержания определенных химических соединений. Изучение сезонных изменений химического состава хвои позволит в дальнейшем определить эффективные пути ее переработки с целью получения соединений, востребованных в различных отраслях промышленности.

Поскольку шикимовая кислота является промежуточным продуктом биосинтеза в пути ароматических аминокислот, ее концентрация в хвое изменяется или остается постоянной в течение некоторого времени в зависимости от типа и интенсивности метаболических процессов, ведущих к синтезу ароматических соединений. Следовательно, анализ сезонных изменений содержания шикимовой в хвое позволит обоснованно установить календарные сроки сбора для данного вида растительного сырья. Изменение концентрации шикимовой кислоты в растениях в зависимости от сезона описано в нескольких работах [3,8]. Например, при изучении корневищ *Iris pseudoacorus* было установлено, что концентрация шикимовой кислоты снизилась с 739 мкг/г свежей массы в мае до 545 мкг/г свежей массы в июне. Вероятно, это связано с тем, что концентрация шикимовой кислоты значительно сокращается после образования у *Iris pseudoacorus* листьев [8].

Для извлечения шикимовой кислоты из хвои в качестве экстрагентов могут быть использованы как полярные органические растворители, так и вода [1,4,8,9]. Однако с учетом экономических критериев и экологических требований к промышленным производствами использование больших объемов органических

растворителей зачастую является невыгодным. В представленной работе для получения экстрактов из древесной зелени использовалась вода, т.к. это наиболее доступный, безопасный и довольно эффективный экстрагент.

Хвоя *Picea abies* для экспериментов была собрана в экологически чистой зоне Калининского района Тверской области в сухую погоду и только от здоровых, хорошо развитых, не повреждённых насекомыми или микроорганизмами растений. Для обезвоживания древесной зелени использовалась воздушно-тенивая сушка растительного сырья. Сушка в помещении протекает медленнее, чем на открытом воздухе или при повышенной температуре, однако обеспечивает сырье лучшего качества. Поскольку хвоя содержит эфирные масла, сушка сырья до постоянного веса проводилась при комнатной температуре ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) и в отсутствие прямых солнечных лучей. Перед экстракцией высушенная древесная зелень измельчалась в лабораторной мельнице до порошкообразного состояния ($d_{\text{частиц}} = 0,2-0,4$ мм). Экстракцию проводили при гидромодуле 1:20 в течение 24 часов при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и в отсутствие прямых солнечных лучей. После окончания экстрагирования смесь фильтруют от взвешенных частиц через обеззоленный фильтр. В полученных экстрактах идентифицировали шикимовую кислоту методом хроматомасс-спектрометрии. Типичная хроматограмма водного экстракта хвои *Picea abies* представлена на рисунке 1.

Для хроматографического анализа полученный экстракт древесной зелени выпаривался досуха под вакуумом, а затем силилировался N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом и триметилхлорсиланом в пиридине (реакционная смесь выдерживалась при 70°C в течение 30 минут). Силилированный образец анализируется с помощью газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором (Clarus 500, PerkinElmer, Inc.); колонки: две параллельные 25 м x 0.20 мм, 0.11 мкм – HP-1 и HP-5 (Agilent Technologies, Inc.).

Отдельные компоненты идентифицируются с помощью хроматомасс-спектрометрии силилированных образцов с помощью прибора HP 6890-5973 (Hewlett-Packard), оборудованного аналогичной 25-метровой колонкой HP-1 GC. Идентификация основывается на сравнении с соединениями, обнаруженными в спектральных библиотеках, или на ручной интерпретации масс-спектров. Содержание шикимовой кислоты в пробах анализировали по методу внешнего стандарта с использованием точных навесок стандарта шикимовой кислоты (содержание основного вещества не менее 99,0%). Полученные данные подтверждают сложный химический состав хвои ели обыкновенной. В экстрактах идентифицированы такие соединения как ксилит, сорбит, различные органические кислоты (яблочная, хинная и другие), углеводы и т.д.

Для исследования сезонной динамики содержания шикимовой кислоты в хвое *Picea abies* были проанализированы образцы растительного материала, собранного в различные месяцы года. Полученные результаты представлены на диаграмме (рисунок 2).

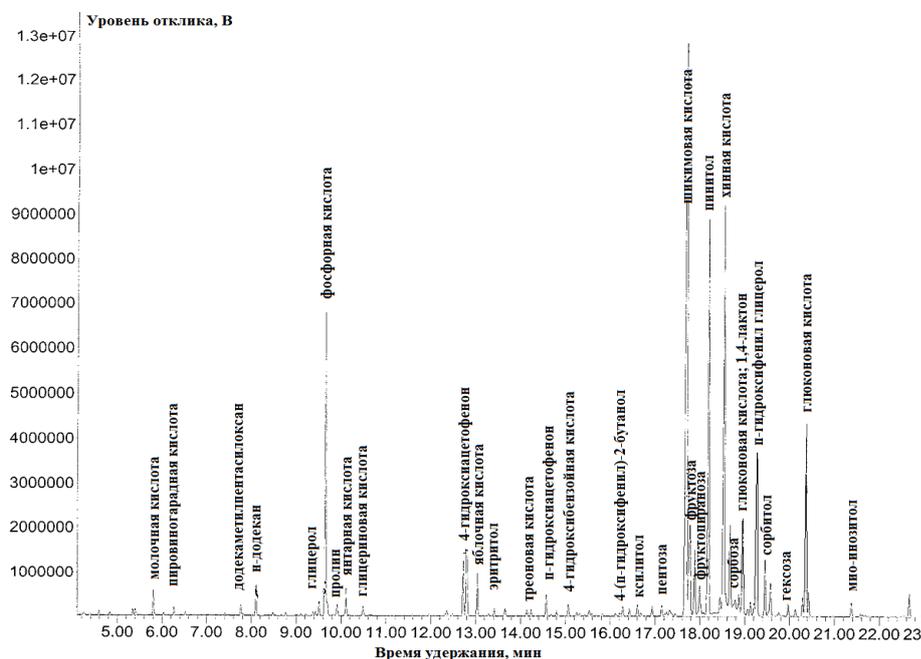


Рис. 1. Типичная хроматограмма экстракта древесной зелени ели обыкновенной

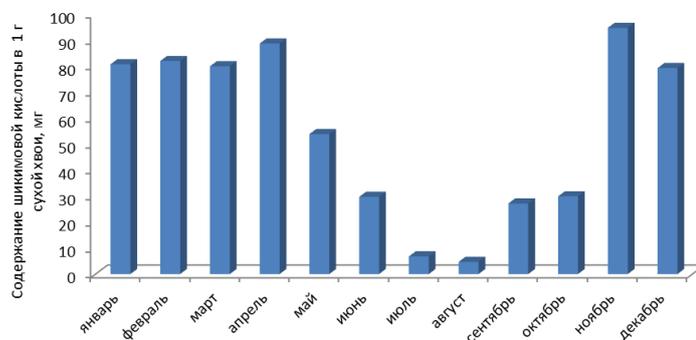


Рис. 2. Содержание шикимовой кислоты в древесной зелени ели европейской в различные месяцы года

Анализ содержания шикимовой кислоты в полученных экстрактах хвои *Picea abies* позволяет рассматривать этот отход лесозаготовительных предприятий в качестве промышленно важного возобновляемого ресурса для получения данного соединения.

Наибольшее количество шикимовой кислоты обнаружено в образцах хвои, собранной с ноября по апрель, следовательно, именно этот период можно рекомендовать для заготовки хвои как сырья для получения этого востребованного в различных отраслях соединения.

Список литературы

1. Бочков Д.В., Сысолятин С.В., Калашников А.И., Сурмачёва И.А., Ламберова А.А., Буянова А.С., Ламберова М.Э. // Химия растительного сырья. 2011. №3. С. 81–87.
2. Tripathi P., Rawat G., Yadav S., Saxena R.K. // Journal of Microbiology. 2015. V. 107, Issue 2. P. 419–431.
3. Rawat G, Tripathi P, Saxena // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. №97. P. 4277–4287.
4. Rawat G, Tripathi P, Firdaus J, Saxena // Appl Biochem Biotechnol. 2013. №169. P.2290–2302.
5. Knaggs A. R. // Nat. Prod. Rep. 1999, V. 16 (4). P. 525.
6. Johansson L. et al.// Biotechnol. Bioeng. 2005, V. 92 (5). P. 541.
7. Медведев С.О., Безруких Ю.А., Мохирев А.П. // Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика. 2015. № 2–1 (13-1) , С. 400–403.
8. Bochkov D.V. et al. // J.Chem Biol. 2012, V. 5. P. 5–17.
9. Ruohong Sui // Chem. Eng. Technol. 2008, V. 31, Issue 3, P. 469–473.

ANALYSIS SEASONAL DYNAMICS OF SHIKIMIK ACID CONTENT IN NEEDLES OF PICEA ABIES BY CHROMATOMASS SPECTROMETRY

E.V. Ozhimkova¹, E.M.Korotkova², I.V. Uschapovsky³, E.M. Sulman¹

¹Tver State Technical University, Tver

²Åbo Akademi University, Turku, Finland

³All-Russian Research and Engineering Institute of Flax Growing Mechanization
Russian Academy of Agriculture Science, Tver

The well-known fact is that the needles are a unique renewable resource for obtaining biologically active substances, and the products of its processing are successfully used in medicine, agriculture, cosmetology, etc. The study of seasonal dynamics of changes in the chemical composition of *Picea abies* needles is aimed at determining the appropriate time for harvesting needles as raw materials for the production of shikimic acid.

Keywords: extraction, biologically active substances, shikimic acid, *Picea abies*.

Об авторах:

ОЖИМКОВА Елена Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии и химии, ФГБОУ ВПО Тверской государственный технический университет, e-mail: eozhimkova@mail.ru

КОРОТКОВА Екатерина Михайловна – научный сотрудник, университет Турку, e-mail: sulman@online.tver.ru.

УЩАПОВСКИЙ Игорь Валентинович – Всероссийский научно-исследовательский институт механизации льноводства Российской Академии сельскохозяйственных наук, e-mail: uschapovsky@mail.ru

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой Биотехнологии и химии, ФГБОУ ВПО Тверской государственный технический университет, e-mail: sulman@online.tver.ru.

Поступила в редакцию 11 декабря 2018 года