

УДК 582.93

DOI: 10.31040/2222-8349-2020-0-4-40-45

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО СОСТАВА
ПЛОДОВ ДЕРЕЗЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*LYCIUM BARBARUM* L.)
И ДЕРЕЗЫ РУССКОЙ (*LYCIUM RUTHENICUM* MURR.)**

© М.А. Секинаева, С.В. Кривошеков, О.Н. Денисенко, Б.Н. Житарь

Изучен полисахаридный комплекс плодов трех образцов дерезы: коммерчески доступной, интродуцированной дерезы обыкновенной и дикорастущей дерезы русской. Выход ПСК из плодов *Lycium barbarum* составил 1.9 и 1.7% против 3.1% из *Lycium ruthenicum*. В мажорном количестве уроновые кислоты представлены во фракции водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществах дерезы русской, $60.0 \pm 2.2\%$ и $58.0 \pm 3.1\%$ соответственно. В наибольшем количестве во всех ПСК плодов представлена арабиноза (более 43%). Вторым по количественному содержанию мономером является галактоза. Молекулярная масса «кислых» и «нейтральных» полисахаридов изучаемых видов дерезы значительно отличается.

Ключевые слова: *Solanaceae*, *Lycium barbarum*, *Lycium ruthenicum*, полисахаридный комплекс, уроновые кислоты.

Дереза обыкновенная (*Lycium barbarum* L.) и дереза русская (*Lycium ruthenicum* Murr.) семейства Пасленовые (*Solanaceae* Juss.) – листопадные кустарники, распространенные в азиатских странах. Основным местообитанием являются Китай, Тибет и Монголия. Годжи (goji) – популярное название плодов обоих видов [1].

В литературе имеются сведения о составе полисахаридного комплекса (ПСК) дерезы обыкновенной и дерезы русской, а также о биологической активности (гепатопротекторная, иммуномодулирующая, гипогликемическая и т.д.) [2–6]. Однако данные исследования касаются ягод китайского происхождения, информация о ПСК интродуцированной в России *Lycium barbarum* и дикорастущей *Lycium ruthenicum* крайне ограничена.

Учитывая этот факт, а также широкий спектр биологической активности полисахаридов, целью настоящей работы стало сравнительное исследование полисахаридного комплекса плодов дерезы обыкновенной и дерезы русской.

Экспериментальная часть. Объектами исследования являлись плоды коммерчески доступной дерезы обыкновенной (образец 1); дерезы обыкновенной, интродуцированной в ботаническом саду Горского государственного аграрного университета г. Владикавказа (РСО-Алания) (образец 2), и плоды дикорастущей дерезы русской, собранные в долине реки Тугчай Апшеронского района в 14 км западнее трассы Ростов-Баку (образец 3).

Выделение полисахаридов. Высушенные измельченные плоды (до размера частиц 2–5 мм) обрабатывали спиртом этиловым 96% для удаления фенольных и липофильных низкомолекулярных соединений, а также для дезактивации ферментов. Далее выделяли полисахаридный комплекс, представляющий собой водорастворимые полисахариды (ВРПС) и пектиновые вещества (ПВ), используя схему, приведенную на рис. 1.

Шрот, полученный после обработки спиртом этиловым, экстрагировали в соотношении сырье : экстрагент – 1:20 (мас./об.) на кипящей

СЕКИНАЕВА Марина Арсеновна, Пятигорский медико-фармацевтический институт,
e-mail: alborova89@mail.ru

КРИВОШЕКОВ Сергей Владимирович, Сибирский государственный медицинский университет,
e-mail: ksv_tsu@mail.ru

ДЕНИСЕНКО Олег Наумович – д.фарм.н., Пятигорский медико-фармацевтический институт,
e-mail: don1945@yandex.ru

ЖИТАРЬ Борис Николаевич – к.фарм.н., Пятигорский медико-фармацевтический институт,
e-mail: zhbn@yandex.ru

водяной бане в течение 2 ч при постоянном перемешивании, последовательно: водой очищенной (ВРПС-1), двукратно водой подкисленной соляной кислотой до pH 3-4 (ВРПС-2) и 1% раствором оксалата аммония (ПВ).

Каждое извлечение концентрировали на роторном испарителе при 40°C под вакуумом, далее полисахариды осаждали трехкратным объемом спирта этилового 96% и отстаивали при 5°C в течение 12 ч. Выпавшие осадки центрифугировали и растворяли в 100 мл воды на магнитной мешалке в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем снова центрифугировали, для удаления мельчайших частиц сырья и денатурированного белка, и диализировали через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 6–8 кДа в течение 24 ч в 50-ти кратном объеме воды очищенной. После диализа растворы замораживали, лиофильно высушивали. Выход полисахаридов определяли гравиметрически.

Содержание уоновых кислот (УК) в ПСК определяли карбазол-серным методом в пересчете на галактуриновую кислоту [7]. Предварительно строили градуировочный график по D-галактуриновой кислоте. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 535 ± 2 нм.

Содержание белка определяли по методу Лоури (ГФ XIII, ОФС.1.2.3.0012.15) [8]. Строи-

ли градуировочный график по человеческому сывороточному альбумину и спектрофотометрировали при длине волны 750 ± 2 нм.

Определение уоновых кислот и белка осуществляли на спектрофотометре Esview B-1100 (Россия).

Для определения *мономерного состава* фракций проводили кислотный гидролиз полисахаридов с помощью 4 М раствора трифторуксусной кислоты (ТФК) в запаянных ампулах в течение 5 ч при 100°C. Избыток ТФК упаривали под вакуумом на роторном испарителе с добавлением метанола до исчезновения запаха кислоты [9].

Получение *триметилсилильных производных (derivatизация)*. К гидролизату добавляли 100 мкл безводного пиридина и выдерживали в сушильном шкафу при 50°C 20 минут. Затем к полученной смеси добавляли 30 мкл N-триметилсилилимидазола, закрывали и снова оставляли в сушильном шкафу в течение 25 минут при 75°C. Охлаждали и добавляли 1 мл гексана, взбалтывали. Верхний слой полученной смеси отбирали и использовали для анализа методом ГЖХ-МС на приборе Agilent 7860A с масс-спектрометрическим детектором (МСД) Agilent 5975 с использованием колонки HP-1MS (Agilent, США).

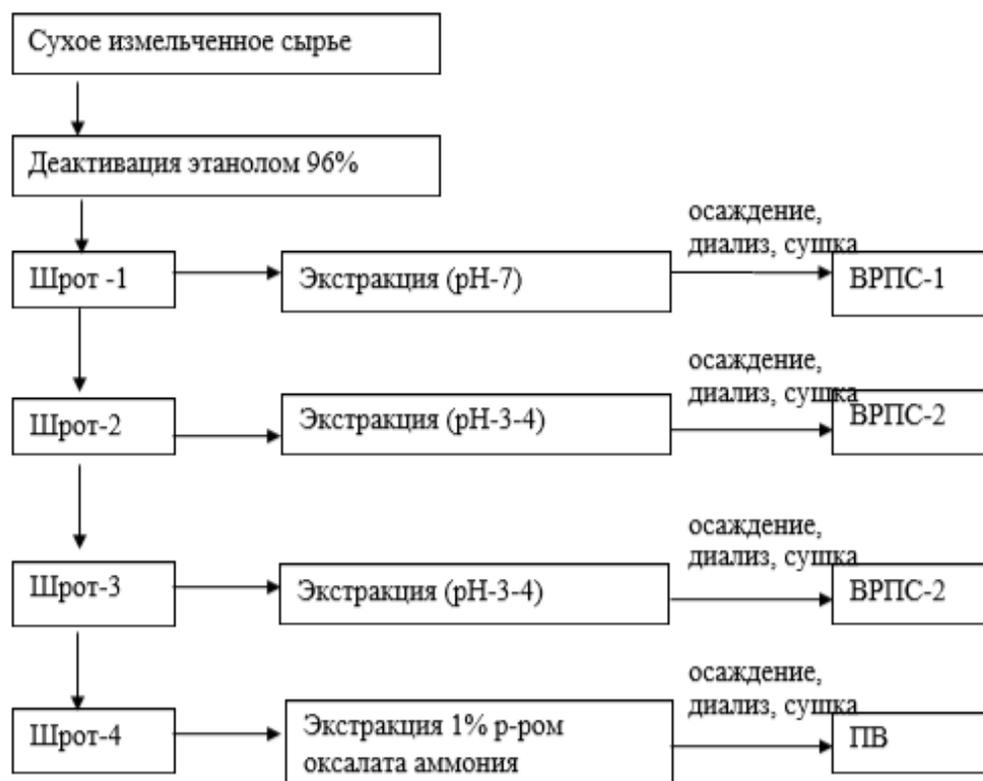


Рис. 1 Схема выделения полисахаридных фракций – ВРПС и ПВ *L. barbarum* и *L. Ruthenicum*

Молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов определяли методом эксклюзионной хроматографии [10]. Навеску (20 мг) ПСК растворяли в 4.0 мл воды в течение 1.5 часа при интенсивном перемешивании. Перед анализом образец центрифугировали в течение 5 минут при 5000 об./мин. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Германия, «Dionex»). Условия хроматографирования: колонка Ultrahydrogel 250, 300×7.8 мм, 13 мкм, подвижная фаза – 0.5 М раствор нитрата натрия в воде, скорость потока 1 мл/мин, температура термостата колонки 30°C. Детектирование рефрактометрическое, температура ячейки детектора 40°C.

Для определения ММР была построена калибровочная прямая по растворам декстранов молекулярной массой 1000, 5000, 25000, 50000, 80000, 150000 и 670000 Да при тех же условиях хроматографирования.

Обсуждение результатов. Выход ВРПС из красных ягод Годжи составил $1.7 \pm 0.2\%$, против $2.2 \pm 0.3\%$ из черных (дерева русская) (табл. 1). Содержание ВРПС в коммерчески доступном образце древесины обыкновенной было несколько выше, чем в интродуцированном (1.9 против 1.7%). Выход ПВ выше в черных плодах $0.9 \pm 0.08\%$, тогда как в красных он составил $0.20\text{--}0.30\%$.

Т а б л и ц а 1

Выход ПСК из плодов изучаемых видов в пересчете на абсолютно сухое сырье, %

Фракции ПСК	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Водорастворимые полисахариды (ВРПС), в т.ч.:			
ВРПС 1 (нейтральные ПСК)	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.3
ВРПС 2 (кислые ПСК)	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.3
Пектиновые вещества (ПВ)	0.30 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.80 ± 0.08
Сумма ПСК	0.40 ± 0.1	0.20 ± 0.05	0.90 ± 0.08
	2.3 ± 0.4	1.9 ± 0.2	3.1 ± 0.3

Т а б л и ц а 2

Содержание УК и белка во фракциях ПСК плодов древесины обыкновенной и древесины русской, %

Фракции ПСК	Образец 1		Образец 2		Образец 3	
	Содержание уоновых кислот	Содержание белка	Содержание уоновых кислот	Содержание белка	Содержание уоновых кислот	Содержание белка
ВРПС 1	47.8 ± 2.3	5.0 ± 0.1	45.2 ± 1.9	5.4 ± 1.1	42.1 ± 3.2	11.12 ± 1.2
ВРПС 2	40.0 ± 2.2	6.7 ± 2.2	41.8 ± 3.1	5.9 ± 1.2	60.0 ± 2.2	1.11 ± 0.15
ПВ	37.6 ± 1.3	10.0 ± 1.1	44 ± 2.8	13.6 ± 1.9	58.0 ± 3.1	13.6 ± 1.9

Т а б л и ц а 3

Содержание мономеров в образцах ПСК плодов изучаемых видов, %

Моносахарид	Образец 1			Образец 2			Образец 3		
	ВРПС 1	ВРПС 2	ПВ	ВРПС 1	ВРПС 2	ПВ	ВРПС 1	ВРПС 2	ПВ
Рамноза	3.9 ± 0.2	2.8 ± 0.3	5.2 ± 0.4	5.0 ± 0.2	2.6 ± 0.1	5.2 ± 0.2	6.0 ± 0.3	4.1 ± 0.2	6.6 ± 0.3
Фукоза	0.4 ± 0.0	–	–	0.4 ± 0.0	–	–	–	–	0.8 ± 0.1
Арабиноза	42.9 ± 2.0	61.2 ± 3.0	55.6 ± 2.9	47.8 ± 2.4	61.9 ± 2.9	50.4 ± 2.5	53.3 ± 2.7	70.6 ± 3.5	51.2 ± 2.6
Ксилоза	6.1 ± 0.2	9.0 ± 0.5	4.7 ± 0.4	5.2 ± 0.2	9.0 ± 0.4	4.8 ± 0.2	7.1 ± 0.4	6.0 ± 0.3	8.8 ± 0.4
Манноза	3.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1	2.3 ± 0.5	3.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Глюкоза	13.7 ± 0.8	3.8 ± 0.1	7.2 ± 0.2	11.1 ± 0.5	4.2 ± 0.2	7.6 ± 0.3	8.6 ± 0.4	3.9 ± 0.2	5.9 ± 0.3
Галактоза	29.1 ± 1.3	22.3 ± 1.0	25.0 ± 1.9	27.5 ± 1.3	21.30 ± 1.0	29.9 ± 1.4	21.7 ± 1.1	14.3 ± 0.7	24.2 ± 1.2

Молекулярно-массовое распределение полисахаридов плодов изучаемых видов

Вид	ПСК	t _R	log M _w	M _w , Да	%
Образец 1	ВРПС 1	7.321	5.823368	665837.1	48.3
		7.839	5.205912	160661.6	51.7
	ВРПС 2	7.135	6.04508	1109379.0	41.6
		8.027	4.981816	95899.4	58.4
	ПВ	7.186	5.974286	964468.4	100
Образец 2	ВРПС 1	7.201	5.923072	695837.1	45.9
		7.839	5.205912	160661.6	54.1
	ВРПС 2	7.115	6.00505	1109379.0	42.1
		8.127	4.991826	95788.68.0	57.9
	ПВ	7.786	5.984509	942260.7	100
Образец 3	ВРПС 1	7.197	5.971176	935784.8	55.6
		8.131	4.857848	72085.5	44.4
	ВРПС 2	7.112	6.072496	1181669.0	100
	ПВ	7.726	5.340608	219082.7	100

Полученные результаты согласуются с нормативом китайской фармакопеи, которая регламентирует содержание полисахаридов в плодах дерезы обыкновенной в количестве не менее 1.8% [11]. ВРПС 1 красных ягод содержат в составе 45.2–47.8% УК. В мажорном количестве УК представлены в ВРПС 2 и ПВ черных ягод, $60.0 \pm 2.2\%$ и $58.0 \pm 3.1\%$ соответственно (табл. 2).

Что касается содержания белка, то в наибольших количествах в связанной форме с молекулами полисахарида и в качестве свободной примеси он присутствует в пектиновых фракциях плодов (~ от 10 до 13%).

Мономерный состав ПСК изучаемых видов был представлен семью моносахаридами: арабиноза, рамноза, фукоза, ксилоза, манноза, глюкоза, галактоза (табл. 3).

В наибольшем количестве во всех ПСК плодов представлена арабиноза (более 43%). Вторым по количественному содержанию мономером является галактоза, она также идентифицирована во всех полисахаридах (более 14%). В минорных количествах обнаружена фукоза (0.8 и 0.4%), которая отсутствует во фракциях ВРПС-2, ПВ красных и ВРПС-1, ВРПС-2 черных ягод. Галактуроновая кислота, идентифицированная ранее в качестве мономера полисахаридных фракций дерезы обыкновенной и дерезы русской, а также глюкуроновая кислота, описанная для ПСК дерезы обыкновенной [12], нами обнаружены не были.

Исходя из приведенных данных можно сделать предварительный вывод о том, что с

высокой долей вероятности структура исходных полисахаридов относится к арабиногалактанам.

Результаты определения молекулярно-массового распределения полисахаридов приведены в табл. 4.

Из полученных данных можно сделать вывод о значительно отличающихся молекулярных массах кислых и нейтральных полисахаридов (ВРПС-1 и ВРПС-2) изучаемых видов, что объясняется более мягкими условиями получения ВРПС-1 (водная экстракция) в отличие от ВРПС-2 – кислотная экстракция в совокупности с высокой температурой. Это может свидетельствовать о более нативной структуре ВРПС-1 по сравнению с кислыми полисахаридами (ВРПС-2). В то же время состав ВРПС-2 образцов дерезы обыкновенной более гетерогенный, по сравнению с высокомолекулярными и однородными ВРПС-2 дерезы русской, что, скорее всего, свидетельствует о линейной структуре ВРПС-2 дерезы русской. При сравнении изучаемых видов, ПВ дерезы обыкновенной являются очень высокомолекулярными и относительно гомогенными в отличие от ПВ дерезы русской. Поскольку ПВ являются строительным материалом клеточной стенки растений, можно опосредованно сделать вывод о значительной разнице в структуре клеток изучаемых видов.

Выводы. 1. Выход ПСК из *Lycium barbarum* L. составил 1.9 и 1.7% против 3.1% из *Lycium ruthenicum*.

2. В наибольшем количестве во всех ПСК плодов представлена арабиноза (более 43%). Вторым по количественному содержанию мономером является галактоза. Значительно отличается молекулярная масса кислых и нейтральных полисахаридов (ВРПС-1 и ВРПС-2) изучаемых видов дерезы, это может свидетельствовать о более нативной структуре ВРПС-1 по сравнению с кислыми полисахаридами (ВРПС-2).

Литература

- Potterat O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity // *Planta Medica*. 2010. 76 (1). P. 7–19.
- Cheng D., Kong H. The effect of *Lycium Barbarum* polysaccharide on alcohol-induced oxidative stress in rats // *Molecules*. 2011. 16. P. 2542–2550.
- Zhu J., Liu W., Yu J., Zou S., Wang J., Yao W., Gao X. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. // *Carbohydr. Polym.* 2013. 98. P. 8–16.
- Zhang X., Li Y., Cheng J., Liu G., Qi C., Zhou W., Zhang Y. Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. 65. P. 441–445.
- Lin J., Zhang Y., Wang X., Wang W. *Lycium ruthenicum* extract alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via enhancing the AMPK signaling pathway // *Molecular Medicine Reports*. 2015. P. 3835–3840.
- Gong Y., Wu J. and Shi-Tong Li. Immuno-enhancement effects of *Lycium ruthenicum* Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice // *Int J Clin Exp Med*. 2015. 8(11). P. 20631–20637.
- Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction // *Anal. Biochem.* 1962. V. 4. P. 330–334.
- Государственная фармакопея Российской Федерации // Науч. центр экспертизы средств мед. применения. М., 2015. С. 1294.
- Хасанова С.Р., Кривошеков С.В., Кудашкина Н.В., Гурьев А.М., Ровкина К.И., Белоусов М.В. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) из флоры Республики Башкортостан // *Растительные ресурсы*. 2015. Т. 51. № 3. С. 397–406.
- Ровкина К.И., Кривошеков С.В., Гурьев А.М., Юсубов М.С.О., Белоусов М.В. Водорастворимые полисахариды травы люцерны посевной *Medicago sativa* (Fabaceae) флоры Красноярского края // *Химия растительного сырья*. (2). 2017. С. 57–64.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China, English edition. Beijing//People's Medical Publishing House. 2005. VI.
- Peng X., Tian G. Structural characterization of the glycan part of glycoconjugate LbGp2 from *Lycium barbarum* L. // *Carbohydr. Res.* 2001. V. 4. P. 331–395.

References

- Potterat O. Goji (*Lyciumbarbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica*., 2010, vol. 76 (1), pp. 7–19.
- Cheng D., Kong H. The effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on alcohol-induced oxidative stress in rats. *Molecules*, 2011, vol. 16, pp. 2542–2550.
- Zhu J., Liu W., Yu J., Zou S., Wang J., Yao W., Gao X. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Carbohydr. Polym.*, 2013, vol. 98, pp. 8–16.
- Zhang X., Li, Y., Cheng J., Liu G., Qi C., Zhou W., Zhang Y. Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, vol. 65, pp. 441–445.
- Lin J., Zhang Y., Wang X., Wang W. *Lycium ruthenicum* extract alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via enhancing the AMPK signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 2015, pp. 3835–3840.
- Yuan Gong, Jin Wu, Shi-Tong Li. Immuno-enhancement effects of *Lycium ruthenicum* Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, vol. 8 (11), pp. 20631–20637.
- Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 1962, vol. 4, pp. 330–334.
- State pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th edition. Nauchnyy tsentr ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Moscow, 2015. 1294 p.
- Khasanova S.R., Krivoshekov S.V., Kudashkina N.V., Guriyev A.M., Rovkina K.I., Belousov M.V. Component composition of the polysaccharide complex in *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) leaves from the flora of the Republic of Bashkortostan. *Rastitelnye resursy*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 397–406.
- Rovkina K.I., Krivoshekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S.O., Belousov M.V. Water-soluble polysaccharides in alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae) of the flora of Krasnoyarsk Krai. *Khimiya rastitelnogo syr'ya*, 2017, no. 2, pp. 57–64.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China. English edition. Vol. 6. Beijing, People's Medical Publishing House, 2005.
- Peng, X., Tian, G. Structural characterization of the glycan part of glycoconjugate LbGp2 from *Lycium barbarum* L. *Carbohydr. Res.* 2001. V. 4. P. 331–395.



**COMPARATIVE STUDY OF THE POLYSACCHARIDE COMPOSITION
OF THE FRUITS *LYCIUM BARBARUM* L. AND *LYCIUM LUTHENICUM* MURR.**

© М.А. Sekinaeva¹, S.V. Krivoshchekov², O.N. Denisenko¹, B.N. Zhitar¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute,
11, prospekt Kalinina, 357532, Pyatigorsk, Russian Federation

²Siberian State Medical University,
2, Moskovsky trakt, 634050, Tomsk, Russian Federation

The polysaccharide complex (PSCs) of the *Lycium barbarum* fruits (commercially available and introduced in the research Institute of Biotechnology of Gorsky GAU, RSO-Alania) and wild *Lycium ruthenicum* (Absheron District, Tugchay River valley) was studied for the first time. The PSC yield from *Lycium barbarum* L. fruits was 1.9 and 1.7 % versus 3.1% from *Lycium ruthenicum*. In the majority of cases, uronic acids are present in the fraction of water-soluble polysaccharides (WSPS-2) and pectin substances (PS) of *Lycium ruthenicum* in the amount of 60.0% and 58.0%, respectively. Arabinose is present in the largest amount in all PSK (more than 43%). The second largest monomer is galactose, which is also identified in all polysaccharides. The molecular weight of the 'acidic' and 'neutral' polysaccharides (WSPS-1 and WSPS-2) of the *Lycium* fruits under consideration differs to a significant extent.

Key words: *Solanaceae*, *Lycium barbarum*, *Lycium ruthenicum*, polysaccharide complex, uronic acids.