

УДК 547.972

**ОСАИН И ПОМИФЕРИН - БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА
НАСТОЙКИ ПЛОДОВ МАКЛЮРЫ ОРАНЖЕВОЙ**

Ананикян Г.С., Ананикян В.В, Ерибекян М.И, Мнацакян В.А., Паносян Г.А.

*Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН
Республики Армения, Ереван, Армения, e-mail: hrach63@mail.ru*

Изучено содержание смеси пренилизофлавонов в настойке свежих плодов и в высушенных плодах маклюры оранжевой (*Maclura pomifera* Schneid.), интродуцированной в садах г. Еревана. Показано, что смесь состоит из осайна и помиферина и ее содержание в настойке, приготовливаемой по рецепту народной медицины, соответствует 0,1%. Апробирован и предложен рациональный метод выделения очищенной смеси осайна и помиферина из высушенных плодов с выходом около 4%. Сущность метода заключается в экстракции сырья хлороформом и очистке хлороформного экстракта от липофильных и полярных примесей. Этот метод дает возможность относительно быстрого приготовления сухого порошка и растворов смеси данных пренилизофлавонов для предклинического изучения в качестве потенциального лекарственного препарата. Методом препаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ) из смеси выделены и идентифицированы (по т.пл. и спектрам ¹H-ЯМР) ее составляющие - осайн и помиферин.

Ключевые слова: Маклюра оранжевая, плоды, осайн, помиферин, настойка, экстракт, ТСХ, ¹H ЯМР

**OSAJIN AND POMIFERIN- BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS
OF MACLURA POMIFERA FRUITS TINCTURE**

Ananikyan H.S., Ananikyan V.V, Yeribekyan M.I, Mnatsakanyan V.A., Panosyan H.A.

*Scientific-Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry NAS Republic
of Armenia Yerevan, Armenia, e-mail: hrach63@mail.ru*

The prenylisoflavones composition from fresh fruits tincture and from dried fruits of *Maclura pomifera* Schneid, which was introduced in gardens of Yerevan, has been studied. It has been shown that this tincture includes osajin and pomiferin, also that the mixture of this two prenylisoflavones is about a 0,1 per cent of the whole amount of the tincture, which was made by traditional medicine recipe. Rational isolation method of purified mixture of osajin and pomiferin from dried fruits has been tested and suggested. Yield of that method was about 4 per cent. Essence of the method is laying on extraction of raw materials by chloroform and on purification of chloroform extract from lipophilic and polar impurities. That method allow us to relatively quick prepare solutions and dry powder of the substance of this prenylisoflavones for preclinical investigation as a potential pharmaceutical drug. By the method of preparative thin layer chromatography (TLC) have been isolated and identified (by ¹H NMR spectra and by melting point) osajin and pomiferin - compounds of the mixture.

Keywords: *Maclura pomifera*, fruits, osajin, pomiferin, tincture, extract, TLC, ¹H NMR

Введение

Маклюра оранжевая *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. – дерево семейства тутовых (Moraceae), родина которого - Северная Америка, откуда оно было распространено в другие континенты и страны. Плоды дерева – «Адамово яблоко» используются деятелями народной медицины в качестве сырья для приготовления настойки и мазей широкого лечебного действия, в том числе, судя по публикуемому в интернете рекламным материалам, и канцеролитического. Описанный процесс приготовления настойки из свежих плодов предусматривает их продолжительное (до тринадцати месяцев) настаивание в этиловом спирте, лечение же настойкой предписывается проводить многомесячным приемом еженедельно увеличиваемых доз (до максимальной в 30 капель) с последующим постепенным снижением дозы до нуля. Исследовательской группой химической лаборатории Университета Огайо (США) в 1937-

1946 годы были выделены из плодов Маклюры оранжевой и структурно изучены ее главные активные соединения - два ранее неизвестных пренилизофлавона, названные осайном и помиферином [7]. При исследовании осайна и помиферина в опытах *in vivo* и *in vitro* были выявлены антимикробное [4], антиоксидантное [6], кардиопротекторное [1], противоопухолевое [3] свойства этих изофлавонов, более выраженные у помиферина [2].

Приведенный краткий перечень биологической активности является, по нашему мнению, веским основанием для осуществления данной работы. Цель работы – определить наличие осайна и помиферина в настойке, рекомендуемой рецептом народной медицины, а также изыскать метод более быстрого приготовления спиртового раствора смеси этих флавоноидов для предложения его к последующему предклиническому изучению в качестве потенциального официального средства.

Материал и методы исследования

Использованные в качестве сырья желтовато-зеленые, бугристые, шарообразные плоды (массой 250 – 400 г) собраны нами в сентябре 2013 года с деревьев *Maclura pomifera*, интродуцированных в садах г. Еревана еще в середине прошлого столетия (в частности, с деревьев нашего Центра и Института ботаники НАН РА). Часть плодов, после измельчения их в свежем состоянии на куски в 2-3 см, использовали для приготовления настойки по рецепту народной медицины (в котором не нормировано количество сырья и спирта): в двухлитровые стеклянные банки с плотно уложенными в них кусочками плодов налили доверху 96% этанол, банки герметично укупили и хранили в затемненном месте при комнатной температуре (18 – 25°C) в течении года.

Большая часть собранных плодов (15 кг) в разрезанном на 1-2 сантиметровые куски подверглась подсушиванию в тонком слое при 25-30 °С в затемненном, проветриваемом помещении до постоянной остаточной массы в 20% ± 0,5% от исходной, на что потребовалось 13 суток.

Для выявления осаина и помиферина в растворе использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на стеклянных пластинках, покрытых силикагелем КСКГ (Эстония), подвижную фазу – хлороформ : этанол (30:1), проявители : пары йода и 1% раствор хлорного железа в этаноле. Выделение осаина и помиферина из их смеси осуществили методом препаративной ТСХ на пластинках той же марки размером 9,5см × 9,5 см. Идентификацию осаина и помиферина в растворах выявляли по их хроматографической подвижности (R_f), а для выделенных препаративной ТСХ – также по их т.пл., измеренных на микронагревательном столике Voetius PHMK (Dresden), и спектрами ¹H-ЯМР, зарегистрированными на приборе Varian Mercury 300 VX в DMSO-d₆ (внутренний этанол – TMC).

Для получения хроматографически чистых осаина, помиферина и их смесей мы использовали в качестве исходного сырья высушенные приведенным выше способом плоды, которые измельчили до частиц размером в 2-3 мм и подвергли экстрагированию. Из более чем десяти различных вариантов использованных нами растворителей и схем, мы предлагаем для указанной цели следующий, по нашему мнению, наиболее оптимальный метод: сырье экстрагируют хлороформом в аппарате Сокслета 18-20 часов (до обесцвечивания раствора в патроне с сырьем). Полу-

ченный хлороформный экстракт упаривают до сухого остатка, который растворяют при нагревании в пятикратном количестве (мл/г исходного сырья) 50%-ной водно-этанольной смеси. Водно-этанольный раствор охлаждают до комнатной температуры, отфильтровывают, промывают в делительной воронке трижды гексаном (порциями по ¼ от водноэтанольного раствора). Промытый водно-этанольный раствор упаривают при пониженном давлении до сухого остатка, который выдерживают не менее часа при 600С и 3 мм Hg остаточного давления. С выходом 4.0%±0,3% получается желтовато-серый пушистый порошок - смесь осаина и помиферина, обнаруживающую на ТСХ только два пятна с R_f 0,73 и 0,23 (рис. 1).

Для достоверной идентификации компонентов смеси было осуществлено ее разделение методом препаративной хроматографии: 100 мг полученного порошка растворили в 2 мл метанола и раствор нанесли с помощью стеклянного капилляра (в виде полос шириной 1,5 – 2.0 мм) на стартовые линии десяти силикагелевых пластинок. После завершения хроматографирования и сушки пластинок в токе теплого воздуха, с пластинок соскребли и собрали отдельно полосы слоев силикагеля (шириной 3-4 мм), соответствующих зонам с R_f 0,73 и 0,23. Силикагелевые порошки одинаковых зон соединили, обработали 20 мл горячего метанола, метанольные растворы фильтровали и упарили досуха. Сухие остатки каждой зоны растворили при нагревании в минимальных количествах (1-1,5мл) 96% этанола. Из охлажденных растворов отделили выпавшие в осадок 30 мг осаина (т.пл 191-193°C; R_f 0,73) и 33 мг помиферина (т.пл.198-199°C; R_f 0,23).

Ниже приведены фиксированные нами характеристики ¹H-ЯМР спектров осаина и помиферина.

Осаин , δ ,м.д.: 13,17(1H,c, C5-OH); 8,95(1H,c, C4a-OH); 7,85(1H,c,C2-H); 7,27(2H,d,C2a-H и C6a-H); 6,80(2H,d,C3a-H и C5a-H); 6,60(1H,d,C9-H); 5,50(1H,d, C10-H); 5,16(1H,тр,C2b-H); 3,18(2H,d,C1b-2H); 1,75(6H,c,C3b-2CH3); 1,40(6H,c,C11-2CH3).

Помиферин , δ ,м.д.: 13,19(1H,c, C5-OH); 8,95(1H,c, C4a-OH); 8,05(1H,c,C3a-OH); 7,85(1H,c,C2-H); 6,85(1H,c,C2a-H); 6,80 -6,70(2H, м,C5a-H и C6a-H); 6,62(1H,d,C9-H); 5,46(1H,d,C10-H); 5,15(1H,тр,C2b-H); 3,20(2H,d,C1b-2H); 1,70 и 1,60(по 3H,c,C3b-2CH2); 1,4(6H,c,C11-2CH3). Эти данные хорошо согласуются со структурными особенностями этих изофлавонов (Рис.2), а также с описанными ранее ¹H-ЯМР характеристиками, зафиксированными в дейтероацетоновом растворе [5].



Рис. 1. ТСХ осаина(1), экстракта (2), помиферина (3)

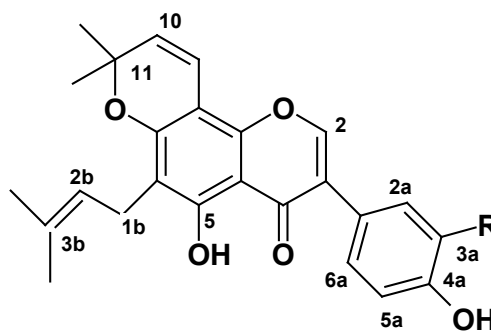


Рис. 2. Структурные формулы осаина (R=H) и помиферина (R=OH)

Изучение спиртовой настойки, полученной по методу народной медицины, проводили нижеследующим способом. Образцы настойки (по 100 мл светлоричичевой жидкости со спиртовым запахом) упаривали втрое при пониженном давлении, остатки экстрагировали хлороформом (50 мл X 3). Хлороформные экстракты, после высушивания безводным сульфатом натрия, упаривали втрое, фильтровали через слой силикагеля SERVA Si60; 0,05-0,1mm (высотой 3 см, диаметром 2 см). Силикагель промывали 20 мл хлороформа и соединенный хлороформный раствор упаривали досуха. Остаток растворяли в 50 мл 50% этанола, прибавляли к раствору 30 мг порошка активированного угля, перемешивали нагревали до кипения, охлаждали, отфильтровывали и фильтрат упаривали досуха. С выходом 120±15 мг получали смесь осаина и помиферина (по ТСХ).

Обсуждение результатов

Изучение хлороформного извлечения из моделей настойки плодов маклюры оранжевой методом ТСХ показало, что оно состоит из смеси осаина и помиферина, содержащей следовые количества примеси липофильных веществ, а также полярных соединений (глюкоанов). Эти примеси, которые легко удаляются применением адсорбентов (силикагеля и активированного угля), надо полагать, не играют определяющей роли в биологической активности самой настойки. Количество же смеси осаина с помиферином в настойке составляет порядка 0,1%, что в пересчете на максимальную одновременную дозу соответствует около 1 мг. Как было показано в опытах по изысканию рационального способа выделения смеси осаина и помиферина из высушенных плодов, содержание смеси этих изофлавонов составляет около 4%, то есть из 100 г высушенных плодов можно довольно быстро приготовить 4 л раствора с по-

добным настойке содержанием главных активных компонентов, а также приготовить растворы любой концентрации, необходимой для предклинического исследования

Выводы

Показано, что в настойке плодов маклюры оранжевой, приготавливаемой по рецепту народной медицины, содержание смеси главных активных компонентов – пренилизофлавонов (осаина и помиферина) составляет около 0,1%.

Предложен и апробирован рациональный метод выделения из высушенных плодов маклюры оранжевой очищенной смеси осаина и помиферина, пригодной для приготовления ее спиртового раствора любой концентрации.

Список литературы

1. Florian T. Effects of prenylated isoflavones osajin and pomiferin in premedication on heart ischemia-perfusion // Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czech. Repub. 26.15(1). p. 93-100.
2. Gruber J.V., Holtz R., Sikkink S.K., Tobin D.J. In vitro and ex vivo examination of topical Pomiferin treatments // Fitoterapia, 2014 (Impact Factor: 2.22). 04/2014; 94. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.01.023
3. Hong S. Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of *Maclura Pomifera* // Organic and Medicinal Chemistry Letters. 2007, 17, p. 4753-4755.
4. Mahmoud Z.F. Antimicrobial Components from *Maclura Fruit* // *Planta Medica* 1981. Vol. 42. p. 299-301.
5. Monache G.D., Scurria R., Vitali A., Botta B., Monacelli B., Pasqua G., Palocci C., Cernia E. // *Phytochemistry*. 1994. Vol.37, No 3, p.893-898.
6. Vesela D., Kubinova R., Muselik J., Zemlicka M., Suchy V. // Antioxidative and EROD activities of osajin and pomiferin // *Fitoterapia*, 7,5 2004. p. 209-211.
7. Wolfrom M.L., Harris W.D., Johnson J.F., Mahan J.E., Moffet S.M. and Wildt B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1946. Vol. 68. p.406-418.