УДК 615.32: 547.9

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛОДОВ И ПОБЕГОВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Рязанова Т.К.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, e-mail: ryazantatyana@mail.ru

Проведено фармакогностическое исследование воздушно-сухих побегов, свежих и воздушно-сухих плодов черники обыкновенной (Vaccinium myrtillus L.). Методом жидкостной колоночной хроматографии выделены биологически активные вещества плодов (цианидин-3-глюкозид) и побегов (кверцетин-3-ксилопиранозид). С целью подтверждения подлинности сырья были разработаны методики качественного анализа с использованием методов тонкослойной хроматографии и спектроскопии в УФ- и видимой области спектра. С учетом физико-химических характеристик выделенных соединений были разработаны методики количественного определения суммарного содержания антоцианов в плодах (в пересчете на цианидин-3-глюкозид) и флавоноидов в побегах (в пересчете на рутин). Ошибка единичного определения суммы антоцианов в плодах черники воздушно-сухих с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 3,52 %, в свежих плодах ± 4,54 %. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в побегах черники с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 3,56 %. Разработанные методики включены в проекты фармакопейных статей на плоды свежие и воздушно-сухие и побеги черники обыкновенной.

Ключевые слова: черника обыкновенная, Vaccinium myrtillus L., плоды, побеги, антоцианы, флавоноиды, стандартизация, цианидин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид

PHARMACOGNOSTIC STUDY OF BILBERRY FRUITS AND SHOOTS

Ryazanova T.K.

Samara State Medical University, Samara, e-mail: ryazantatyana@mail.ru

We have done pharmacognostic study of bilberry shoots dried and fruits fresh and dried (*Vaccinium myrtillus* L.). The biologically active substances from bilberry fruits (cyanidin-3-glucoside) and bilberry shoots (quercetin-3-xylopyranoside) were isolated by using of liquid column chromathography method. Methods of qualitative analysis there were developed for identification plant material by using of thin-layer chromatography and UV/Vis spectroscopy. According to the physical and chemical properties of isolated compounds spectrophotometric methods of the determination of total anthocyanins in the fruits (calculated on cyanidin-3-glucoside chloride) and total flavonoids in shoots (calculated on rutin) there were developed. The relative degree of the determination of the total anthocyanins in fruits dried in developed method with confidence probability 0,95 is no more than ± 3,52 %; in fruits fresh ± 4,54 %. The relative degree of the determination of the total flavonoids in shoots in developed method with confidence probability 0,95 is no more than ± 3,56 %.The developed methods of analysis were included in projects for pharmacopoeia specifications for fresh and dried bilberry fruits and dried bilberry shoots.

Keywords: bilberry, Vaccinium myrtillus L., fruits, shoots, anthocyanins, flavonoids, standardization, cyanidin-3-O-glucoside chloride, quercetin 3-O-β-D-xylopiranoside

Черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) является одним из ценных растительных источников фенольных соединений, обладающих фармакологической активностью [3, 8]. Фармакопейным сырьем являются плоды воздушно-сухие и побеги [1, 2]. В настоящее время широкое применение препаратов на основе плодов черники при различных заболеваниях глаз связывают с содержащимися в них антоцианами, подклассом флавоноидов [8]. Побеги черники входят в состав противодиабетического сбора «Арфазетин-Э» [2]. Однако вопросы стандартизации плодов и побегов черники по-прежнему остаются нерешенным. Применяемая на территории Российской Федерации фармакопейная статья на воздушно-сухие плоды черники обыкновенной содержит далеко не все показатели качества, требуемые в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» к нормативным документам на лекарственное растительное сырье (отсутствует раздел «Микроскопия», не предусмотрено количественное определение действующих веществ, качественный анализ представлен пробирочными реакциями) [4]. На наш взгляд, стандартизацию плодов черники целесообразно проводить по содержанию антоцианов как наиболее уязвимой группе биологически активных соединений (БАС). Следует отметить, что в Европейской фармакопее, кроме воздушно-сухих, регламентируется качество свежих плодов, которые являются более перспективным источником антоцианов [7]. Стандартизация побегов черники в настоящее время осуществляется по содержанию дубильных веществ [3, 5]. Однако, с нашей точки зрения, гипогликемическое, противовоспалительное, капилляроукрепляющее, кардиопротективное, антиагрегантное действие, а также выявленная недавно ноотропная активность побегов также могут быть обусловлены другой группой БАС – флавоноидами [3, 6].

В связи с этим целью настоящего исследования было проведение фармакогностического исследования побегов и плодов черники обыкновенной и разработка методик их анализа.

Материалы и методы исследования

В исследовании использованы тонкослойная хроматография (ТСХ), адсорбционная жидкостная колоночная хроматография и спектроскопические методы. При использовании метода ТСХ разделение веществ проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190–700 нм.

Объектом исследования являлись побеги черники обыкновенной, заготовленные в Пензенской области и Республике Марий Эл в 2010–2011 гг., а также плоды черники обыкновенной свежезамороженные (ЗАО «Хладокомбинат западный», Московская область, г. Одинцово, ТУ 9165-002-47569210-00); образцы плодов из разных регионов РФ (Алтайский край, Республика Татарстан); плоды черники воздушно-сухие (ООО ПКФ «Фитофарм» (г. Анапа, Краснодарский край), ЗАО «Иван-Чай» (г. Москва).

Результаты исследования и их обсуждение

На первоначальном этапе нами была проведена работа по выделению действующих веществ из плодов и побегов черники обыкновенной с использованием метода адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии.

При фитохимическом исследовании плодов на сорбент (силикагель L 40/100) наносили и высушивали на воздухе предварительно упаренный под вакуумом сок свежих плодов черники. Полученный порошок наносили на слой силикагеля, сформированный в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ-этанол (0,1 % HCl) в различных соотношениях (97:1; 97:2; 97:3; 95:5; 93:7; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30, 60:40, 50:50; 40:60; 20:80, этанол). Контроль за ходом элюирования осуществляли с помощью ТСХ-анализа в системе н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2).

В результате нами был выделен ряд фракций, содержащих вещества антоциановой природы. После их очистки с помощью рехроматографии на полиамиде (Woelm) с использованием смеси хлороформа и этанола (0,01 % HCl) в градиентном режиме были выделены 3 доминирующих антоциана с R_f около 0,51; 0,36 и 0,20 в системе н-бутанол – ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) (рис. 1). Изучение электронных спектров показало, что кривые поглощения выделенных антоцианов имеют характерные максимумы при 281 ± 2 нм и в видимой области в интервале 538 ± 2 – 551 ± 2 нм. Для вещества с R_f 0,51 максимум поглощения соответствовал 538 ± 2 нм; для вещества с R_f 0,36 – 546 ± 2 нм; веществу с R_f 0,20 соответствовала длина волны при максимуме поглощения 551 ± 2 нм. На основании данных УФ- и ^{1}H-ЯМР-спектров соединение с R_f около 0,36 идентифицировано как цианидин-3-О-глюкозид.

Из побегов черники обыкновенной получали извлечение методом дробной модифицированной мацерации на 70 % этиловом спирте. Полученное извлечение упаривали под вакуумом и наносили на сорбент силикагель L 40/100. Хроматографирование проводили так же, как описано для плодов, но без добавления хлороводородной кислоты. Элюаты делили на фракции примерно равного объема (200 мл), которые затем упаривали под вакуумом. В дальнейшем для выделения индивидуальных веществ отдельные фракции рехроматографировали на полиамиде (Woelm) и силикагеле L 40/100. Дополнительную очистку проводили перекристаллизацией из спирта и воды. Ход хроматографического разделения и очистки веществ контролировали методом ТСХ в системе н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) и этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12) (рис. 2). Пятна на пластинке детектировали по свечению в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм и по окраске после обработки хроматограмм щелочным раствором диазобензолсульфокислоты.

Выделенные вещества были исследованы с помощью УФ-, ^{1}H-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений, ТСХ. Кислотный гидролиз выделенного доминирующего флавоноида проводили путем нагревания вещества с 10 % раствором кислоты хлороводородной на кипящей водяной бане в течение 2,5 ч. Ферментативный гидролиз проводили с использованием эмульсина при температуре 37 ± 2 °С. В результате были выделены вещества, которые предварительно идентифицированы как кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид, кофейная кислота, даукостерин, упоминаемые в литературных источниках [9].

На наш взгляд, целесообразным для идентификации и подтверждения доброкачественности сырья является спектроскопический метод.

Извлечение из плодов черники в диапазоне длин волн 190–700 нм имеет максимумы поглощения в видимой (546 ± 2 нм) и УФ-области спектра (281 ± 2 нм). Соотношение оптических плотностей в УФ-области и в видимой области спектра (A_{282}/A_{546}) является показателем сохран-

ности антоцианов в сырье. Для антоцианов и извлечения из свежих плодов это соотношение составляет примерно 1:1,5–1,8 (рис. 3). Для воздушно-сухих плодов это соотношение изменяется в пользу коротковолнового максимума и составляет 1,0:0,10–0,15 (рис. 3). Такое различие, вероятно, обусловлено изменением химического состава плодов черники в результате высушивания в пользу полифенольных соединений.

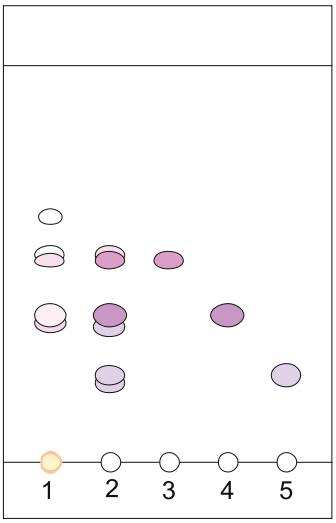

Рис. 1. ТСХ–анализ плодов: система растворителей н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2). Обозначения: 1 – спиртовое извлечение из воздушно-сухих плодов черники; 2 – спиртовое извлечение из плодов черники свежих; 3 – мальвидин-3-О-глюкозид; 4 – цианидин-3-О-глюкозид; 5 – дельфинидин-3-О-глюкозид

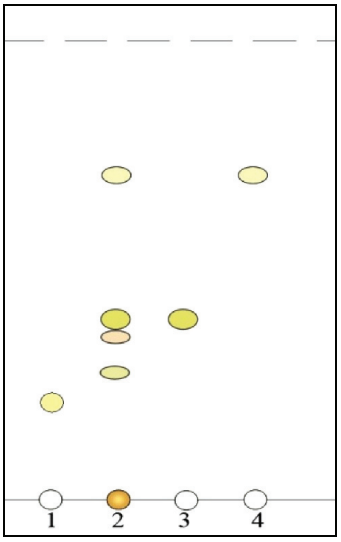

Рис. 2. ТСХ-анализ побегов: система растворителей этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12). Обозначения: 1 – раствор РСО рутина; 2 – извлечение из побегов черники обыкновенной на 70% этиловом спирте; 3 – раствор кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозида; 4 – раствор кофейной кислоты

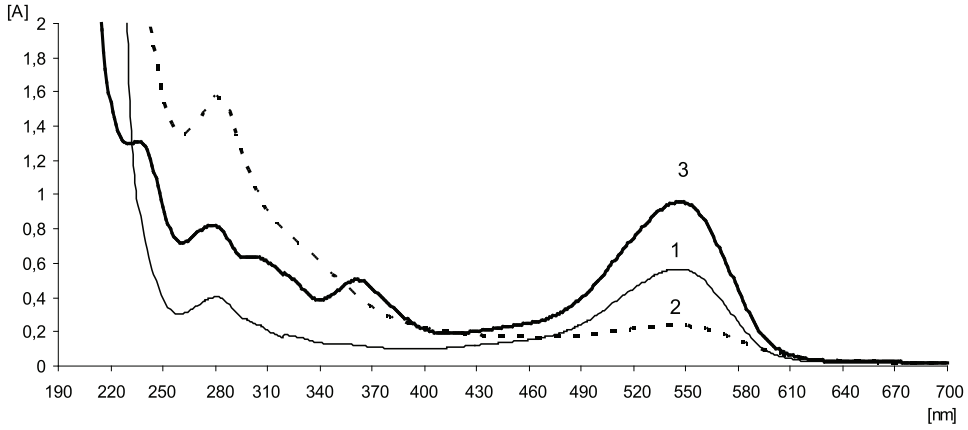

Рис. 3. Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из свежих плодов черники обыкновенной (1), воздушно-сухих плодов черники обыкновенной (2) и цианидин-3-О-глюкозида (3) в 95% этиловом спирте, содержащем 1% HCl

Извлечение из побегов черники имеет максимумы поглощения при длинах волн 292 ± 2 и 331 ± 2 нм. Вклад в кривую поглощения могут вносить кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид, кофейная кислота и другие присутствующие в сырье фенольные соединения (рис. 4, 5).

Для подтверждения доброкачественности лекарственного растительного сырья плодов и побегов черники обыкновенной нами были разработаны методики количественного определения действующих соединений в сырье.

В связи с тем, что антоцианы являются более биологически активной и в то же время более лабильной группой соедине-

ний, нами предлагается стандартизировать и свежие и воздушно-сухие плоды по содержанию антоцианов (в отличие от требований Европейской фармакопеи). Для целей стандартизации был определен удельный показатель поглощения выделенного цианидин-3-О-глюкозида в 1 % растворе хлороводородной кислоты в 95 % этиловом спирте при аналитической длине волны 546 нм, который составил 100 ± 4,3. Полученное значение удельного показателя поглощения было использовано при разработке методики количественного определения антоцианов в плодах черники. Сравнилась экстракционная способность спиртов различных концентраций, влияние pH, температуры, соотношения «сырье – экстрагент» и времени экстрагирования. Определено, что наибольший выход антоцианов из быстрозамороженных плодов черники наблюдается при использовании в качестве экстрагента 95 % этилового спирта, содержащего 1 % раствора хлороводородной кислоты, соотношение «сырье – экстрагент» – 1:50; время экстракции – 30 мин на кипящей водяной бане. Для воздушно-сухих плодов черники обыкновенной соответственно: экстрагент – 60 %-й этиловый спирт, содержащий 1 % хлороводородной кислоты; соотношение «сырье – экстрагент» – 1:50; время экстракции на водяной бане при температуре 85–90 °С в течение 90 мин. Содержание суммы антоцианов в исследуемых образцах свежих плодов составляло 3,80–4,10 %, для образцов воздушно-сухих плодов этот показатель варьировался от 4,04 до 4,79 %.

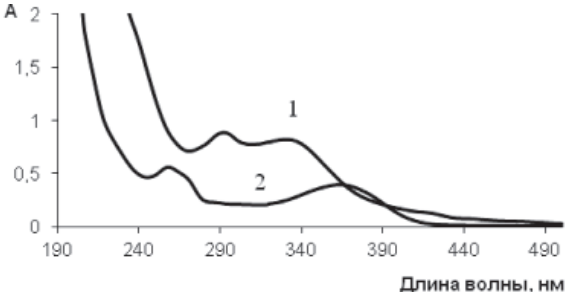

Рис. 4. Спектры поглощения извлечения на 70 % спирте из побегов черники обыкновенной (1), раствора кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозида (2)

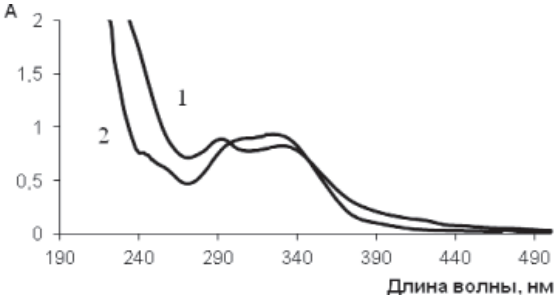

Рис. 5. Спектры поглощения извлечения на 70 % спирте из побегов черники обыкновенной (1) и раствора кофейной кислоты (2)

Побеги мы предлагаем анализировать по содержанию флавоноидов, которые также могут вносить существенный вклад в фармакологическое действие препаратов и более подвержены различным факторам окружающей среды в отличие от анализируемой в настоящее время группы дубильных веществ. При разработке методики количественного определения флавоноидов в побегах в связи со схожестью строения и химических свойств доминирующего флавоноида и рутина расчет содержания БАС проводили в пересчете на рутин. Анализ проводили методом дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом при аналитической длине волны 420 нм, соответствующей максимальной разнице оптических плотностей извлечения после добавления алюминия хлорида и исходного извлечения. В ходе исследования было установлено, что оптимальным экстрагентом является 70 % этиловый спирт, который позволяет наиболее полно извлечь флавоноиды из сырья по сравнению с другими концентрациями; оптимальным является соотношение «сырье – экстрагент» – 1:50; время экстракции – 30 мин после закипания экстрагента на кипящей водяной бане. Содержание флавоноидов и исследуемых образцах варьировалось от 0,62 до 1,62 %.

Все результаты были статистически обработаны. Ошибка единичного определения суммы антоцианов в плодах черники воздушно-сухих с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 3,52 %; в свежих плодах ± 4,54 %. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в побегах черники с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 3,56 %.

Выводы

Таким образом, в ходе исследования:

– Проведено фитохимическое исследование надземных органов черники обыкновенной.

– Разработаны методики качественного анализа действующих веществ в используемых видах фармакопейного сырья черники обыкновенной (плодах и побегах) (методы тонкослойной хроматографии и электронной спектроскопии).

– Разработаны методики количественного анализа действующих веществ в плодах и побегах.

Разработанные методики качественного и количественного анализа включены в проекты фармакопейных статей на исследуемые виды сырья.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.

2. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года: в 2-х т. Т.1. – М.: Изд-во «Медицинский совет», 2009. – 1359 с.

3. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.

4. О государственных стандартах качества лекарственных средств: приказ Минздрава РФ от 01.11.2001 N 388 (вместе с «ОСТ 91500.05.001-00. Отраслевой стандарт. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения») [Электронный ресурс] // справ.-правовая система «КонсультантПлюс». – URL: http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req = doc;base = LAW;n = 34097 (дата обращения: 30.04.13 г.).

5. Черники обыкновенной побеги: ФСП 42-8635-07 (ОАО «Красногорсклексредства»).

6. Шилова И.В. Химический состав и ноотропная активность растений Сибири / И.В. Шилова, Н.И. Суслов, И.А. Самылина. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2010. – 236 с.

7. European Pharmacopoeia. 6-th Ed. / Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc. – 2008. – P. 738–739.

8. Anthocyanins in medicine / E. Kowalczyk, P. Krzesiñski, M. Kura, B. Szmigiel, J.Blaszczyk // Pol. J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 55. – P. 699–702.

9. Zushang Su. Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L. // Pharmaceutical Crops. – 2012. – Vol. 3. – P. 7–37.

References

1. *Gosudarstvennaia Farmakopeia SSSR: Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. 11-e izd.* [State Pharmacopoeia of the USSR: Vol. 2. Common methods of analysis. Herbal drugs. 11th ed.]. Moscow, 1987, 400 p.

2. *Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv. Oficial'noe izdanie po sostojaniju na 1 aprelja 2009 goda: v 2-h t. T.1.* [State register of medicines. Official publication as of April 1, 2009: in 2 vol. Vol. 1]. Moscow, 2009, 1359 p.

3. Kurkin V.A. *Farmakognozija: Uchebnik dlja studentov farmacevticheskih vuzov (fakul'tetov). 2-e izd., pererab. i dop.* [Pharmacognosy: A textbook for students of schools (faculties) of Pharmacy. 2nd ed., rev. and add.]. Samara, 2007, 1239 p.

4. *Prikaz Minzdrava RF ot 01.11.2001 N 388 «O gosudarstvennyh standartah kachestva lekarstvennyh sredstv» (vmeste s «OST 91500.05.001-00. Otraslevoj standart. Standarty kachestva lekarstvennyh sredstv. Osnovnye polozhenija»)* [Order of the Ministry of health of the Russian Federation dated November 1, 2001 no. 388 «On the state standards of quality medicines» (with «OST 91500.05.001-00. Industry Standard. Standards of quality medicines. Significant»)]. Available at: http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req = doc;base = LAW;n = 34097 (accessed 30 April 2013).

5. FSP 42-8635-07 *«Cherniki obyknovennoj pobegi»* [Bilberry shoots]. *(OAO «Krasnogorskleksredstva»).*

6. Shilova I.V., Suslov N.I,. Samylina I.A. *Himicheskij sostav i nootropnaja aktivnost' rastenij Sibiri* [Chemical composition and nootropic activity of Siberian plants]. Tomsk, 2010, 236 p.

7. European Pharmacopoeia. 6-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008, pp. 738–739.

8. Kowalczyk E., Krzesiñski P., Kura M., Szmigiel B., Blaszczyk J. Anthocyanins in medicine. Pol. J. Pharmacol, 2003, vol. 55, pp. 699–702.

9. Zushang Su. Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L. Pharmaceutical Crops, 2012, vol. 3, pp. 7–37.

Рецензенты:

Шаталаев И.Ф., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Правдивцева О.Е., д.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 11.07.2013.