

## Спектрофотометрическое и хроматографическое исследование плодов черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.)

А.В. Топчян, Л.В. Ревазова, Р.В. Степанян

Кафедра технологии лекарств ЕрГМУ им. М. Гераци

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

**Ключевые слова:** черника, антоцианы, дельфинидин, экстракция, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия

Препараты из плодов черники обыкновенной (*Fructus Myrtilli*) широко применяются в современной медицине при различных нарушениях зрения, включая миопию, катаракту, диабетическую ретинопатию, ухудшенное ночное зрение, а также при сосудистых нарушениях, сопровождающихся повышенной капиллярной проницаемостью [8,9]. Следствием подобного широкого спектра применения является высокий спрос препаратов черники обыкновенной на мировом фармацевтическом рынке.

Таким образом, расширение сырьевой базы этого ценного лекарственного растения за счет близких в ботаническом отношении видов является актуальной задачей. Одним из викарных видов является черника кавказская, которая произрастает в лесных районах Грузии, а также в пограничных районах Армении и Грузии. Некоторые авторы [3, 6] сообщают, что черника кавказская может служить заменителем черники обыкновенной, однако в частной фармакопейной статье Государственной фармакопеи РФ XI издания (ГФ XI) «Плоды черники» [1] сведений об этом не имеется.

Для оценки правомочности замены лекарственного сырья «плоды черники обыкновенной» на сырье «плоды черники кавказской» нами было предпринято фитохимическое и технологическое изучение плодов черники кавказской.

### Материал и методы

**Растительное сырье.** Плоды черники кавказской были собраны в различных районах Республики Грузия. Сырье собирали согласно установленным правилам [4]. Стандартизация плодов черники кавказской была осуществлена согласно ГФ XI [1] и включала макроскопический анализ, определение влажности, общей золы и золы, растворимой в 10% хлористоводородной кислоте.

Микроскопический анализ семян и эпидермиса

плодов проводился по общепринятой методике [2].

В исследовании были использованы также плоды черники обыкновенной в виде фасованного по 50 г лекарственного сырья, выпускаемого ЗАО «Арника» (Санкт-Петербург, партия Р 71/609/28).

**Тонкослойная хроматография.** Качественный состав антоцианов плодов черники обыкновенной и кавказской определяли методом тонкослойной хроматографии [11].

В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей бутанол/ледяная уксусная кислота/вода в соотношении 50:10:20 соответственно.

Пробы для анализа готовили следующим образом: 1 г измельченных плодов черники кавказской (размер частиц 1–2 мм) заливали 6 мл смеси, состоящей из 9 частей метанола и 1 части 25% хлористоводородной кислоты; встряхивали 15 мин, фильтровали, наносили по 25 мкл экстракта на пластинки «Silica gel 60 F<sub>254</sub>» (Merck, Germany) и хроматографировали восходящим способом.

**Получение экстрактов для спектрофотометрического исследования.** К измельченным плодам черники кавказской (величина частиц 1–2 мм), навеска по 1 г, добавляли по 10 мл одного из следующих экстрагентов: вода дистиллированная, 70% этанол, метанол, метанол/конц. HCl (5:1), 70% этанол/ конц. HCl (5:1), вода/ конц. HCl (5:1) и экстрагировали в термостате при 40°C в течение 2 ч, после чего полученные пробы центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали и подвергали спектрофотометрическому измерению. Оптимальный фактор разбавления экстрактов, при котором показания спектрофотометра представляли собой линейную зависимость, был выявлен экспериментально и оказался равен 80.

**Спектрофотометрическое измерение.** Спектр оптической плотности полученных проб снимали на спектрофотометре «Beckman DU 640i» в диапазоне длин волн от 250 до 700 нм. Количественное определение антоцианов в пробах было осуществлено на

основании спектра оптической плотности дельфинидина хлорида (Extrasynthese, Lot 02022530), согласно которому содержание антоцианов в экстрактах определялось по оптической плотности при длине волны

546 нм, а чистоту экстрактов оценивали по соотношению оптической плотности при 548,5 и 275 нм [10] (рис. 1).

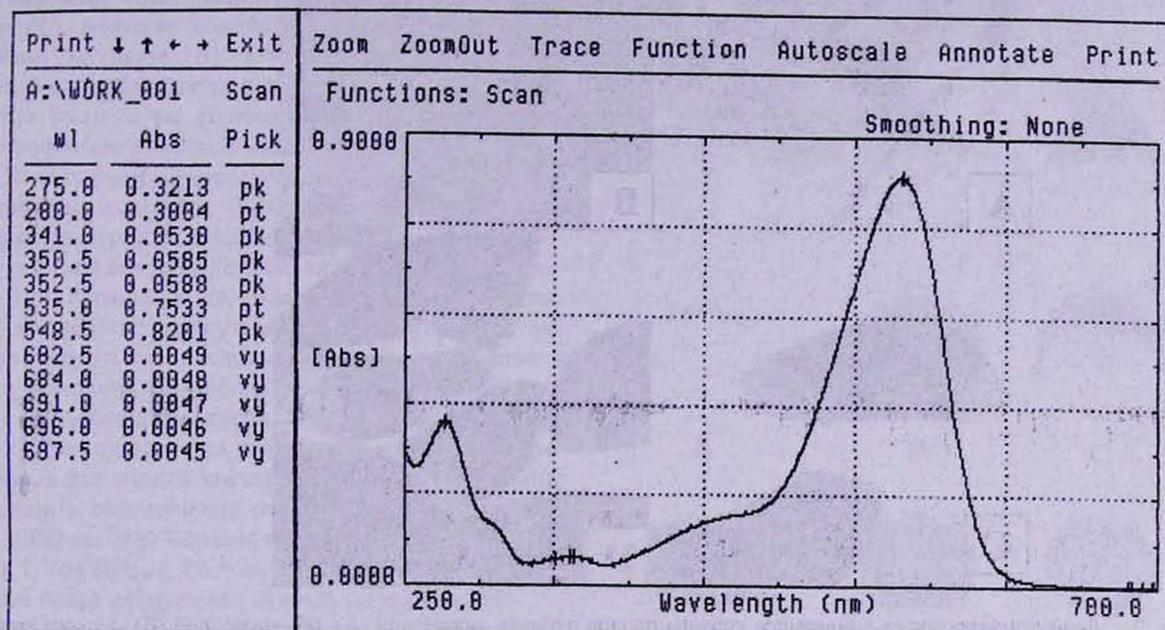


Рис 1. Спектр оптической плотности дельфинидина хлорида в диапазоне длин волн от 250 до 700 нм

## Результаты и обсуждение

**Стандартизация сырья.** Сравнительный макроскопический анализ плодов черники кавказской и обыкновенной показал, что плоды обоих видов представляют собой ягоды диаметром 3–7 мм. Плоды сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные, в мякоти находятся многочисленные (до 30) беловатые семена яйцевидной формы. Цвет поверхности ягод обоих видов черный с фиолетовым оттенком, матовый или слегка блестящий, мякоти – красно-фиолетовый. Запах у плодов слабый, но достаточно характерный. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий.

Данные по определению влажности и зольности сырья черники кавказской следующие: влажность – 14,375% (допустимый предел по фармакопее – не более 17%), содержание общей золы в сырье – 2,5135% (допустимый предел по фармакопее – не более 3%), содержание золы, нерастворимой в 10% хлористоводородной кислоте, – 0,1601% (допустимый предел по фармакопее – не более 0,8%) [5].

Исходя из вышеуказанного, нами сделан вывод о том, что плоды черники кавказской соответствуют

описанию внешнего вида и показателям качества плодов черники, указанным в фармакопейной статье ГФ XI «Fructus Myrtilli» [1].

Сравнительный микроскопический анализ семян и эпидермиса плодов черники обыкновенной и кавказской показал, что семена черники кавказской крупнее, их форма близка к овальной (рис.2, С), а семена черники обыкновенной мельче, имеют неправильную форму (рис.2, D), стенки эпидермальных клеток черники обыкновенной толще, чем у черники кавказской (рис.2, А, В). Эти признаки могут, на наш взгляд, быть диагностическими при определении принадлежности плодов к тому или другому виду.

**Тонкослойная хроматография.** Как известно, основными действующими веществами плодов черники являются антоцианы [8]. С целью выявления качественного состава антоцианов плодов черники кавказской была осуществлена тонкослойная хроматография.

На хроматограмме плодов черники обыкновенной при значениях Rf 0,05–0,4 наблюдается широкая синяя полоса, указывающая на присутствие гликозидов цианидина и дельфинидина (рис.3, А). Подобная полоса имеется также на хроматограмме черники кавказской (рис. 3, В), причем видно, что основным компо-

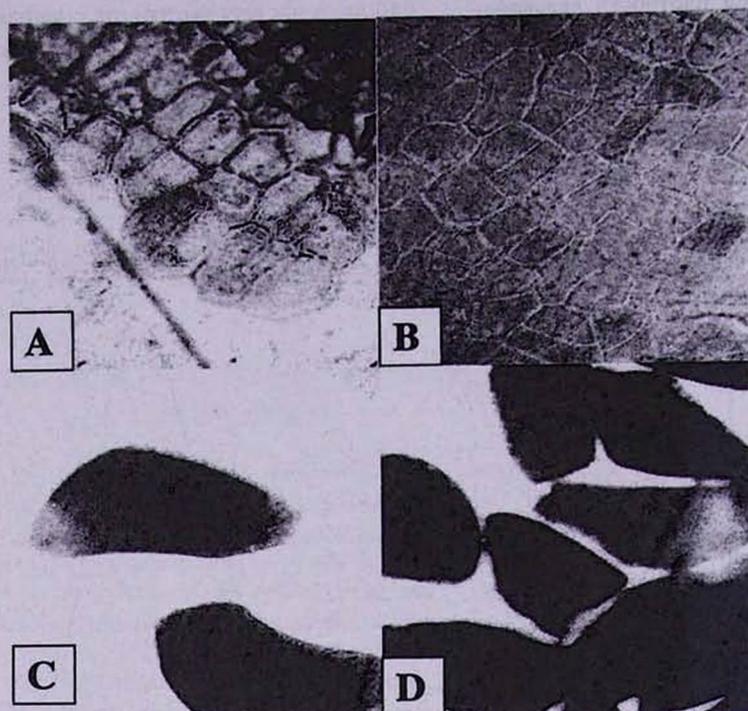


Рис. 2. Данные микроскопии эпидермиса кожицы плодов черники кавказской (А), обыкновенной (В), а также семян черники кавказской (С) и обыкновенной (D)

нентом тяжелой фракции является дельфинидин 3,5-дигликозид (стандарт Т6).

Как видно из рис. 3, в плодах черники кавказской хорошо выражена также фракция пеонидина и мальвидина (стандарты Т2 и Т3 соответственно), что подтверждается литературными данными [3], согласно которым в легкой фракции антоцианов находятся мальвидин-3-*L*-арабинозид и пеонидин-3-*L*-арабинозид.

Однако Н. Wagner, S. Bladt [11] указывают, что анализ по описанной методике не дает достаточного для специфичной идентификации разделения фракций антоцианов, в связи с чем нами была предпринята попытка найти оптимальное соотношение компонентов подвижной фазы для разделения и сравнения фракций антоцианов черники кавказской. В результате серии экспериментов с использованием в составе подвижной фазы различных соотношений бутанола, этилацетата, уксусной кислоты, муравьиной кислоты и воды мы пришли к выводу, что наилучшее разделение происходит при составе подвижной фазы бутанол/ледяная уксусная кислота/вода в соотношении 17:1:2. Применяя модифицированную таким образом методику

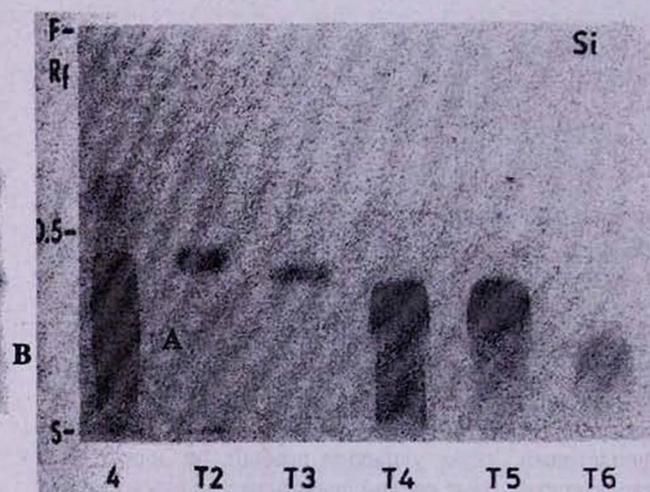


Рис. 3. Хроматограмма черники кавказской (слева) по сравнению с черникой обыкновенной (иллюстрация из Атласа тонкослойной хроматографии, справа). Показаны следующие стандарты: Т2 – пеонидин-3-гликозид, Т3 – мальвидин-3-гликозид, Т4 – цианидин-3,5-дигликозид, Т5 – дельфинидин-3-гликозид, Т6 – дельфинидин-3,5-дигликозид

тонкослойной хроматографии, нами была осуществлена сравнительная хроматография экстрактов плодов черники кавказской (рис. 4), полученных с применением разных экстрагентов. На хроматограмме видно, что наиболее богат антоцианами метанольный экстракт (С), меньшее количество их находится в этанольном экстракте (В), а наименьшее содержание антоцианов наблюдается в водном экстракте (А). Эти данные были затем количественно подтверждены в спектрофотометрическом исследовании.

**Спектрофотометрическое определение.** Согласно литературным данным [7,10], оптическая плотность экстрактов черники в видимой области спектра служит показателем содержания антоцианов в извлечении, а поглощение в ультрафиолетовой области спектра обусловлено присутствием сопутствующих веществ (фенольные кислоты, дубильные вещества и др.) в экстракте. При использовании в качестве стандарта дельфинидина хлорида оптическая плотность при 535 нм применяется для расчета количества антоцианов, а для оценки чистоты экстрактов необходимо определить соотношение оптической плотности при 535 и 280 нм. Чем более приближается это соотношение к 1, тем больше чистота экстракта, и, следовательно, тем более избирателен данный экстрагент [10].

Результаты спектрофотометрического определения содержания антоцианов в экстрактах черники кавказской с применением различных экстрагентов приведены в табл. 1 (данные представляют собой среднее арифметическое 10 измерений). Согласно этим данным подкисленные экстрагенты извлекают большее количество антоцианов, чем соответствующие не под-

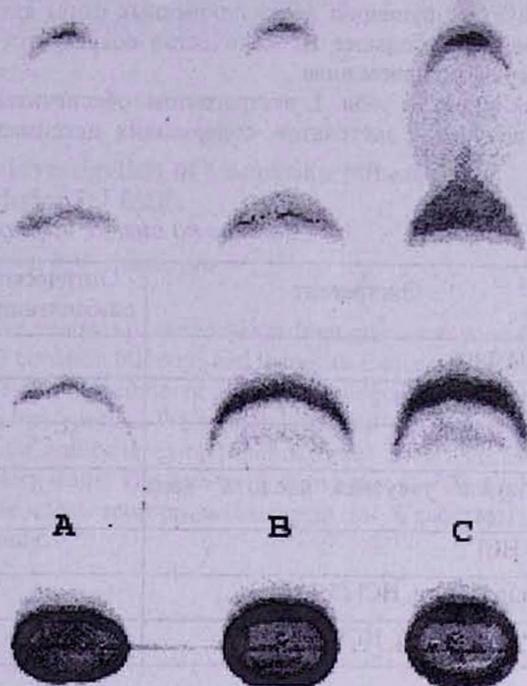


Рис. 4. Сравнительная тонкослойная хроматография экстрактов черники кавказской: А – водный, В – этанольный, С – метанольный

Таблица 1

Результаты количественного определения антоцианов в экстрактах плодов черники кавказской

Экстрагент	Оптическое поглощение экстракта при разбавлении в 80 раз, длина волны 548,5 нм	Концентрация антоцианов в экстракте при разбавлении в 80 раз при пересчете на дельфинидина хлорид, мг/мл	Процентное содержание суммы антоцианов, извлекаемых из плодов данным экстрагентом в пересчете на сухую массу плодов
Вода дист.	0,03765	0,000367	0,02938
Метанол	0,05347	0,000522	0,04173
70% этанол	0,13945	0,00136	0,1088
Метанол/уксусная кислота/вода (18:1:1)	0,14805	0,001444	0,1155
4% HCl	0,23457	0,002288	0,1831
Этанол/конц. HCl (5:1)	0,46017	0,004489	0,3591
Метанол/конц. HCl (5:1)	0,5519	0,005384	0,4307

кисленные экстрагенты. По литературным данным, это объясняется тем, что кислая реакция среды препятствует разрушению неацелированных форм антоцианов [7] и большее их количество сохраняется в растворе в нативном виде.

Как видно из табл. 1, экстрагентом, обеспечивающим получение экстрактов, содержащих максималь-

ное количество антоцианов (0,43%) является подкисленный метанол, однако применение метанольных экстрактов в фармацевтической промышленности неприемлемо ввиду токсичности метанола. Подкисленный этанол извлекает 0,36% антоцианов из плодов, что также является достаточно высоким показателем.

Таблица 2

Данные по оценке чистоты экстрактов черники кавказской

Экстрагент	Оптическое поглощение экстракта при разбавлении в 80 раз, длина волны 275 нм	Соотношение $A_{548,5}/A_{275}$
Вода дист.	0,3625	0,104
Метанол	0,7165	0,075
70% этанол	0,71265	0,1957
Метанол/ уксусная кислота/ вода (18:1:1)	0,6697	0,221
4% HCl	0,6615	0,3546
Этанол/ конц. HCl (5:1)	0,7547	0,609
Метанол/ конц. HCl (5:1)	0,8535	0,6466

Результаты оценки чистоты экстрактов представлены в табл. 2. По этим данным, подкисленный метанол является не только самым эффективным, но и самым избирательным по отношению к антоцианам экстрагентом, поскольку соотношение оптической плотности при 548,5 и 275 нм у метанольно-подкисленных экстрактов наиболее велико. Однако применение метанольных экстрактов возможно лишь в аналитических целях, а для фармацевтического производства наиболее оптимальным является применение подкисленного этанола, поскольку, как видно из таблиц, этот экстрагент, наряду с высокой экстрагирующей способностью, обладает также достаточной избирательностью.

Таким образом, в результате проведенного исследова-

ния нами была показана правомочность применения наряду с плодами черники обыкновенной плодов черники кавказской ввиду соответствия аналитических данных указанных видов. При микроскопическом анализе сырья, были выявлены диагностические признаки для идентификации плодов черники кавказской.

Также установлено, что наиболее приемлемым с фармацевтической точки зрения экстрагентом, обеспечивающим получение высококачественных экстрактов, содержащих максимальное количество антоцианов, является подкисленный этанол, который и рекомендуется для получения жидких экстрактов из плодов черники кавказской.

Поступила 21.03.05

### Հապալասենի կովկասյանի (*Vaccinium arctostaphylos* L.) պտուղների սպեկտրոֆոտոմետրիկ և քրոմատոգրաֆիկ ուսումնասիրություն

Ն.Վ. Թովիցյան, Լ.Վ. Ռևազովա, Ռ.Վ. Սյրեխանյան

Հետազոտության արդյունքում հաստատվել է, որ հապալասենի կովկասյանը, որը ֆարմակոպեական տեսակ չի հանդիսանում, կարող է կիրառվել որպես սովորական հապալասենու փոխարինող, քանի որ հումքի ստանդարտավորումը և հիմնական ազդող

նյութերի՝ ամոնոցիանների, որակական կազմի համեմատությունը ցույց տվեցին կովկասյան հապալասենու պտուղների համապատասխանությունը նորմատիվ-տեխնիկական փաստաթղթավորմանը:

Ամոնոցիանների լուծամզման համար լավագույն

էքստրագենտը հայտնաբերելու նպատակով կատարված չափումների արդյունքում պարզվեց, որ նպատակահարմար է կիրառել քլորաջրածնական թթվով

թթվեցրած էթանոլը, քանի որ այդ լուծիչով ստացված համուկներում պարունակվում է անտոցիանների առավելագույն քանակություն:

## Spectrophotometric and chromatographic investigation of Caucasian bilberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruits

H.V. Topchyan, L.V. Revazova, R.V. Stepanyan

Common bilberry fruits (*Fructus Myrtilli*) are used all over the world to prevent and treat ocular disorders, such as poor night vision, cataracts, myopia, diabetic retinopathy. In our investigation we aimed to prove the possibility of using *Vaccinium arctostaphylos* (Caucasian bilberry) as a substitute of *Vaccinium myrtillus* – pharmacopoeian species (Soviet Union Pharmacopoeia, XI edition).

The results obtained demonstrate that analytical data of Caucasian bilberry fruits' standartisation and qualita-

tive analysis of anthocyanin fractions correspond to those of common bilberry, and therefore Caucasian bilberry can be the substitute of the pharmacopoeian (common bilberry) species. We've compared different extragents for their ability to extract anthocyanins from Caucasian bilberry fruits. The data have shown that acidified ethanol is the most appropriate extragent for Caucasian bilberry fruits.

### Литература

1. Государственная фармакопея РФ, изд. XI, М., 1998.
2. Долгова А.А., Ладыгина Е.Я. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии. М., 1977.
3. Дурмишидзе С.В., Шалашвили А.Г., Мжаванадзе В.В., Циклаური Г.Ч. Флавоноиды и оксикоричные кислоты некоторых представителей дикорастущей флоры Грузии. Тбилиси, 1981.
4. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций) /Под ред. А.И. Шретера. М., 1985.
5. Топчян А.В., Ревазова Л.В., Степанян Р.В. Сравнительное исследование плодов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.) и черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.) по фармакопейным показателям. Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». М., 2004, с. 843.
6. Шретер А.И., Муравьева Д.А., Пакали Д.А., Ефимова Ф.В. Лекарственная флора Кавказа. М., 1979.
7. Kong Jin-Ming, Chia Lian-Sai, Goh Ngoh-Khang, Chia Tet-Fatt, Brouillard R. *Phytochemistry*, 2003, 64, p. 923.
8. Morazzoni P., Bombardelli E. *Fitoterapia*, 1996, LXVII, 1, p. 3.
9. Murray M. *American Journal of Natural Medicine*, 1997, 4:18-22.
10. Petri G., Krawczyk U., Kery A. *Microchemical Journal*, 1997, 55, p. 12.
11. Wagner H, Bladt S. *A Thin Layer Chromatography Atlas*. Munchen, Germany, 1996, pp. 281, 288, 289.