

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2011 В.А. Куркин, Т.К. Рязанова

Самарский государственный медицинский университет

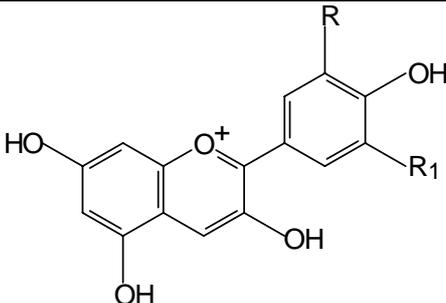
Поступила в редакцию 07.09.2011

Предложены методики качественного и количественного анализа действующих веществ (антоцианов) в сырье и препаратах черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.). С использованием разработанных методик оценки подлинности сырья определены оптимальные условия сушки плодов черники обыкновенной. Обоснована целесообразность использования свежих плодов черники для производства лекарственных препаратов, в частности, сиропа черники. Для стандартизации по содержанию антоцианов сырья и препаратов предложен метод прямой спектрофотометрии с использованием удельного показателя поглощения цианидин-3-глюкозида, выделенного из плодов данного растения.

Ключевые слова: черника обыкновенная *Vaccinium myrtillus* L., плоды, антоцианы, стандартизация, сироп

Черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) – многолетний низкорослый кустарничек семейства Вересковых (*Ericaceae*), произрастающий преимущественно в умеренных и северных регионах Российской Федерации [4]. Воздушно-сухие плоды черники обыкновенной применяются в РФ в качестве вяжущего, противовоспалительного и противодиарейного средства [3, 4], однако в настоящее время большая популярность плодов черники обыкновенной связана с высоким содержанием в них антоцианов (флавоноиды) – биологически

активных соединений (БАС), обладающих антиоксидантной, капилляроукрепляющей активностью, способностью улучшать кровоток сетчатки глаза [3, 4, 10]. Следует отметить, что большинство лекарственных средств на основе плодов черники обыкновенной на фармацевтическом рынке РФ представлены дорогостоящими зарубежными препаратами («Миртиллене форте», «Стрикс», «Витрум Вижн форте»), несмотря на достаточно обширный ареал черники в нашей стране [2, 3].

	<b>Антоцианидины плодов черники</b>	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>
	цианидин	ОН	H
	дельфинидин	ОН	ОН
	мальвидин	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Преобладание импортных препаратов черники обыкновенной в значительной степени может быть обусловлено несовершенством стандартизации исходного сырья. Известно, и в ходе наших исследований подтверждено, что потери антоцианов при сушке по принятой схеме (проявление в течение 2-3 ч при

температуре 35-40°C, а затем досушивание при температуре 55-60°C) могут достигать 50-60% [6, 11]. В связи с этим в Европейской Фармакопее имеются отдельные монографии на свежие и воздушно-сухие плоды черники, регламентирующие содержание соответственно антоцианов и дубильных веществ [8], хотя используемые в них методики анализа не лишены недостатков. В Российской Федерации существует фармакопейная статья только на воздушно-сухие плоды черники обыкновенной [1], однако и в ней отражены далеко не все

Куркин Владимир Александрович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: vakur@samaramail.ru  
Рязанова Татьяна Константиновна, интерн. E-mail: ryazantatyana@mail.ru

показатели качества, предъявляемые в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» к фармакопейным статьям на лекарственное растительное сырье [5]. В частности, не нормируется содержание действующих веществ, а качественный анализ представлен пробирочными реакциями.

На наш взгляд, стандартизацию и воздушно-сухих, и свежих плодов черники обыкновенной целесообразно осуществлять по содержанию антоцианов. Это связано с тем, что антоцианы плодов черники являются по сравнению с дубильными веществами более лабильной группой БАС, легко разрушающихся под действием света, высокой температуры, высоких значений pH [10]. Следовательно, уровень содержания антоцианов в плодах черники обыкновенной может быть надежным критерием подлинности качества и препаратов на его основе данного сырья.

**Цель работы:** исследование по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов черники обыкновенной.

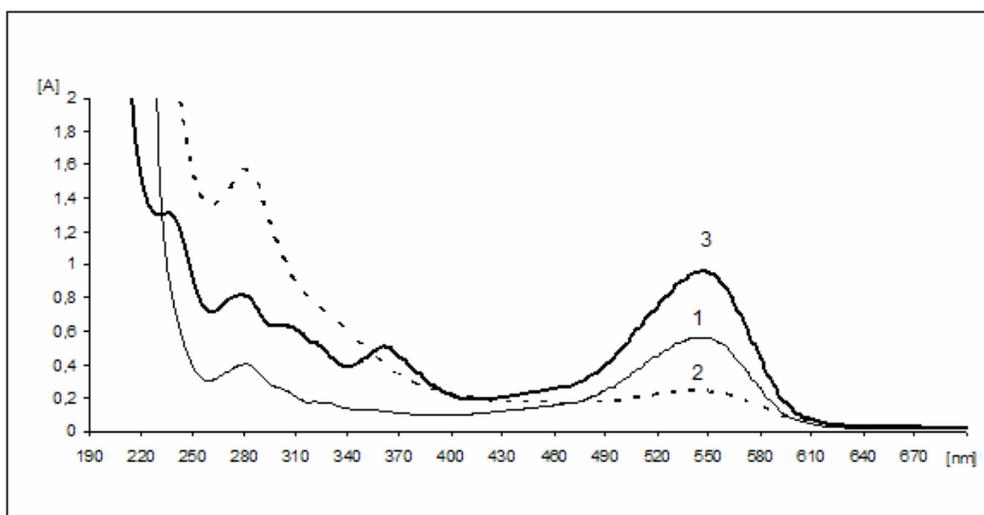
**Материалы и методы.** В исследовании использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ), адсорбционную жидкостную колоночную хроматографию и метод спектроскопии в УФ- и видимой области спектра. В методе ТСХ разделение проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190-700 нм.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе предварительного изучения химического состава плодов черники обыкновенной методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии нами был выделен ряд веществ антоциановой природы. Были измерены электронные спектры поглощения этих соединений в УФ- и видимой области спектра, рассчитан удельный показатель поглощения доминирующего антоциана (цианидин-3-О-глюкозида) при аналитической длине волны 546 нм в 96% этиловом спирте, содержащем 1% хлористоводородной кислоты, который составил  $100 \pm 4,3$ , что соответствует значению, указанному в одном из литературных источников [9]. При этом следует отметить противоречивость данных относительно значения удельного показателя поглощения цианидин-3-О-глюкозида, указанного в различных литературных источниках, в том числе в Европейской

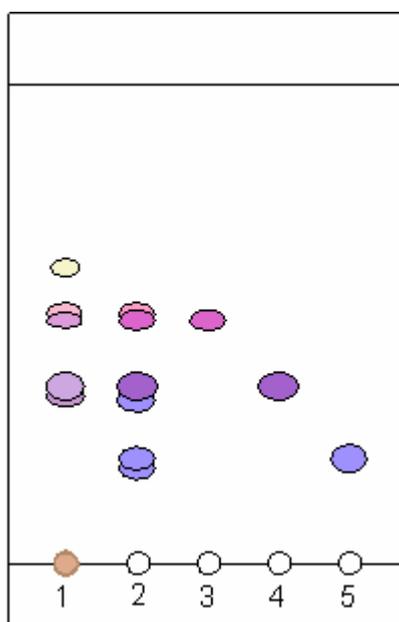
фармакопее и Государственной Фармакопее СССР XI издания в фармакопейной статье на цветки василька синего [1, 8].

Метод электронной спектроскопии может быть использован для определения подлинности сырья благодаря наличию максимумов поглощения в УФ- и видимой области спектра, характерных для растворов индивидуальных антоцианов и извлечений из сырья. В ходе исследования нами было выявлено, что кривые поглощения в УФ- и видимой области спектра водно-спиртовых извлечений из воздушно-сухих плодов, высушенных по стандартной схеме, и свежих плодов значительно отличаются (рис. 1). Соотношение оптических плотностей в УФ-области и в видимой области спектра водно-спиртового извлечения из плодов черники свежих ( $A_{282}/A_{546}$ ) соответствует спектральным характеристикам цианидин-3-О-глюкозида и составляет примерно 1,0:1,5 (рис. 1). Для воздушно-сухих плодов это соотношение изменяется в пользу коротковолнового максимума и составляет 1,0:0,10±0,15. Следовательно, данные спектроскопического анализа необходимо дополнять другими методами, подтверждающими подлинность сырья. Одним из универсальных методов для идентификации большинства биологически активных веществ лекарственных растений является хроматография в тонком слое сорбента благодаря своей специфичности, экономичности, экспрессности.

Для качественного анализа плодов нами предложено проводить разделение в системе н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) с детекцией в видимой области спектра. На хроматограмме извлечения из свежих плодов черники обыкновенной обнаруживаются пятна розового цвета с величиной  $R_f$  около 0,51 и 0,47 (гликозиды мальвидина), фиолетового цвета с  $R_f$  0,36 (доминирующего соединения – цианидин-3-глюкозид) и пятна синего цвета с  $R_f$  0,20 и 0,33 (гликозиды дельфинидина) (рис. 2). Принимая во внимание то обстоятельство, что состав антоцианов воздушно-сухих и свежих плодов черники обыкновенной имеет как общие, так и отличительные признаки, в качестве диагностических компонентов следует считать наличие цианидин-3-О-глюкозида ( $R_f$  0,36) и мальвидин-3-О-глюкозида ( $R_f$  0,51). Результаты данных исследований свидетельствуют о целесообразности использования ТСХ для идентификации плодов черники обыкновенной, имеющих характерный набор антоцианов (рис. 2).



**Рис. 1.** 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



**Рис. 2.** ТСХ-анализ: система н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2):  
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

Сравнительное хроматографическое исследование в тонком слое сорбента водно-спиртовых извлечений, полученных из свежих плодов черники обыкновенной, а также плодов, высушенных при комнатной температуре, при температуре  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  и по стандартной схеме, показало, что сушка при температуре до  $45^\circ\text{C}$  не влияет значительно на качественный состав антоцианов плодов. На основании полученного значения удельного показателя поглощения определены оптимальные условия

экстрагирования антоцианов из свежего (свежезамороженного) и воздушно-сухого сырья и разработаны методики количественного определения антоцианов в плодах. Сравнилась экстракционная способность спиртов различных концентраций, влияние pH, температуры, соотношения сырье: экстрагент и времени экстрагирования. Условия для извлечения антоцианов из свежих плодов черники обыкновенной (96% этиловый спирт, содержащий 1% хлористоводородной кислоты; 30 минут на кипящей водяной бане) отличаются от определенных нами оптимальных условий для извлечения антоцианов из воздушно-сухого сырья (60% спирт, содержащий 1% хлористоводородной кислоты; время извлечения 90 мин), что возможно связано с особенностями экстрагирования веществ из сухого и свежего сырья. Содержание антоцианов в воздушно-сухом сырье в подобранных условиях экстрагирования составило  $3,35 \pm 0,17\%$ , в свежем замороженном –  $4,05 \pm 0,18\%$  ( $18,4 \pm 0,8\%$  в пересчете на абсолютно сухое сырье). В связи с этим целесообразно использовать в качестве исходного сырья в производстве лекарственных препаратов на основе черники обыкновенной свежее или свежемороженное сырье или плоды, высушенные до  $45^\circ\text{C}$ . В качестве лекарственного препарата нами исследован сироп, полученный из плодов черники свежих. Для стандартизации сиропа черники с целью гармонизации и унификации методик анализа для сырья и препаратов нами также был использован метод прямой спектрофотометрии в видимой области спектра.

**Методика количественного определения суммы антоцианов в свежих (свежемороженных) плодах черники.** Около 1 г (точная навеска) размороженных плодов черники помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл 95% этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент 95 % этиловым спиртом, содержащим 1% хлористоводородной кислоты. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (марки «Красная лента»). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 1 % раствором хлористоводородной кислоты в 95% этиловом спирте. Оптическую плотность измеряют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 546 нм. В качестве раствора сравнения используют 95% этиловый спирт.

Содержание суммы антоцианов в плодах черники свежих в процентах ( $X$ ) в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A * 25 * 50}{m * 1 * 100},$$

где  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора,  $m$  – масса сырья, г; 100 – удельный показатель поглощения выделенного антоциана.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывает, что ошибка единичного определения суммы антоцианов в плодах черники с доверительной вероятностью 95% составляет  $4,54 \pm 0,18\%$ .

**Методика количественного определения суммы антоцианов в воздушно-сухих плодах черники обыкновенной.** Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, но не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу со шлифом объемом 100 мл, добавляют 50 мл 60% этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты. Далее процесс осуществляют в соответствии с вышеизложенной методикой. С использованием разработанной методики был проанализирован ряд промышленных образцов сырья, представленных на фармацевтическом

рынке Самарской области (производства ООО ПКФ «Фитофарм» и ЗАО «Иван-Чай»). Содержание суммы антоцианов в исследуемых образцах варьирует от 4,04 до 4,79%.

**Методика определения суммы антоцианов в сиропе черники.** Около 1,0 г препарата (точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 50 мл, доводят до метки 70% этиловым спиртом, содержащим 1% хлористоводородной кислоты. В качестве раствора сравнения 70% этиловый спирт, содержащий 1% HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 538 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы антоцианов в препарате рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A * 50}{a * 100} = \frac{A}{2a},$$

где  $A$  – оптическая плотность полученного раствора;  $a$  – масса пробы, взятой на анализ; 100 – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при 538 нм в 70% этиловом спирте, содержащем 1% хлористоводородной кислоты.

Таким образом, в ходе исследования усовершенствованы и унифицированы методы стандартизации сырья и препаратов черники обыкновенной. Разработанные методики могут быть включены в фармакопейные статьи на плоды черники обыкновенной свежие и воздушно-сухие, а также в нормативную документацию на препараты.

#### **Выводы:**

1. Определены оптимальные условия сушки плодов черники обыкновенной, необходимые для сохранения качественного состава антоцианов плодов.

2. Предложены рациональные подходы к выбору исходного лекарственного растительного сырья (плодов черники обыкновенной) для производства лекарственных препаратов для улучшения функционального состояния сетчатки глаза. Результаты исследования позволяют сделать вывод о предпочтительности свежего сырья перед воздушно-сухим как источника антоцианов.

3. Разработаны методики качественного анализа плодов (тонкослойная хроматография, электронная спектроскопия), позволяющие идентифицировать плоды и подтвердить их подлинность, а также методики количественного определения антоцианов методом прямой спектрофотометрии, которые позволят унифицировать стандартизацию сырья и препаратов по содержанию действующих веществ.

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.: Издательство «Медицинский совет», 2009. 1359 с.
3. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. 963 с.
4. 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.
5. ОСТ 91500.05.001-00. Отраслевой стандарт. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения.
6. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций). – М.: Медицина, 1985. 328 с.
7. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. Методические рекомендации. МР 2.3.1.1915-04 (утв. Роспотребнадзором 02.07.2004).
8. European Pharmacopoeia. 6-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008. P. 738-739.
9. Francis, F.J. Anthocyanins as food colors / Ed. by P. Makakis. – London: Academic Press, 1982. P. 181-208.
10. Kowalczyk, E. Anthocyanins in medicine / E. Kowalczyk, P. Krzesiński, M. Kura et al. // Pol. J. Pharmacol. 2003. Vol. 55. P. 699-702.
11. Lohachoompol, V. The Change of Total Anthocyanins in Blueberries and Their Antioxidant Effect after Drying and Freezing / V. Lohachoompol, G. Szrednicki, J. Craske // J. Biomed. Biotechnol. 2004. No. 5. P. 248-252.

**NEW APPROACHES IN THE FIELD OF RAW MATERIALS  
AND PREPARATIONS OF *VACCINIUM MYRTILLUS* L.  
STANDARDIZATION**

© 2011 V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova

Samara State Medical University

Techniques of qualitative and quantitative analysis of operating substances (anthocyanins) in raw materials and preparations of *Vaccinium myrtillus* L are offered. With use of the developed techniques of estimation the authenticity of raw materials optimum conditions of drying the bilberry fruits are defined. The expediency of use the fresh fruits of a bilberry for manufacture the medical products, in particular, a bilberry syrup is proved. For standardization under the anthocyanins maintenance of raw materials and preparations the method of direct spectrophotometry with use of specific indicator of absorption as cyanidin-3-glucoside chloride at 546 nm, allocated from fruits, is offered.

Key words: *bilberry Vaccinium myrtillus* L., *fruits, anthocyanins, standardization, syrup*

Vladimir Kurkin, Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the  
Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy  
Department. E-mail: vakur@samaramail.ru  
Tatiana Ryazanova, Intern. E-mail: ryazantatyana@mail.ru