

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛОДОВ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ RUBUS CAESIUS (L.) ФЛОРЫ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

¹Вдовенко-Мартынова Н.Н., ¹Кобыльченко Н.В., ¹Блинова Т.И.

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия (357500, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: martynovann@yandex.ru

Объект исследований – ежевика сизая *Rubus caesius* (L.). Целью работы являлось фармакогностическое изучение плодов ежевики сизой для установления содержания биологически активных соединений и показателей подлинности, доброкачественности сырья. В эксперименте использовались качественные реакции, методы ТСХ, ВЖЭХ, УФ-спектрофотометрия. В водных извлечениях исследуемого сырья установили содержание полисахаридов, органических кислот, дубильных веществ. Проведенное морфолого-анатомическое изучение плодов ежевики сизой позволило установить отличительные диагностические признаки, с помощью которых можно проводить достоверную идентификацию предложенного вида сырья и исключить ошибки при его заготовке. Фитохимическим анализом установлено присутствие основных групп БАС: полисахаридов, органических кислот, флавоноидов, дубильных веществ, гидрооксикоричных кислот, что свидетельствует о перспективности использования данного вида ЛРС в медицине.

Ключевые слова: плоды ежевики сизой, фармакогностическое изучение, биологические активные соединения.

PHARMAGNOSTIC RESEARCH OF BLUISH BLACKBERRY FRUITS RUBUS CAESIUS (L.) OF THE NORTH CAUCASUS FLORA

Vdovenko-Martynova N.N.¹, Kobylchenko N.V.¹, Blinova T.I.¹

¹Pyatigorsk Medico-Pharmaceutical Institute – branch of SBEE HPE VolgSMU of the Russian Health Service Ministry, Pyatigorsk, Russia, (357500, Pyatigorsk, Av. Kalinin, 11), e-mail: martynovann@yandex.ru

The researches object is bluish blackberry, *Rubuscaesius* (L.). The purpose of the research was to provide bluish blackberry pharmacognostic investigation for determination of its biologically active compounds content, its authenticity indicators and high quality of the raw materials. Quality reactions were used in the experiment together with the thin layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), UV-Spectrophotometry. In water extraction of the studied raw materials we established the content of polysaccharides, organic acids, tannins. The carried-out morphologic and anatomic investigation of bluish blackberry fruits allowed us to establish some distinctive diagnostic signs by means of which it is possible to carry out a reliable identification of the proposed type of raw materials and to exclude mistakes at its preparation. By means of the phytochemical analysis it was established the presence of main groups of the biologically active compounds (BAC): polysaccharides, organic acids, flavonoids, tannins, hydrooxycinnamic acids. These conclusions testify the prospectivity of this type of vegetable origin medicine usage in health treatment.

Keywords: bluish blackberry fruits, pharmacognostic investigation, biological active compounds.

Введение

За последние несколько десятилетий в России произошло необоснованно резкое снижение доли суммарных препаратов из лекарственных растений в общем объеме выпускаемых лекарственных средств. Причём основная часть изготавливается из импортного сырья. Стратегия национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года, утвержденная Указом Президента РФ № 537 от 12.05.2009, предусматривает, что «в целях развития фармацевтической отрасли формируются условия для преодоления ее сырьевой зависимости от зарубежных поставщиков». Лекарственное растительное сырье (ЛРС) является одним из источников лекарственных средств. По разным оценкам, из

растений изготавливается от 20 до 40% мировой фармацевтической продукции. Разноплановость и широкое применение лекарственных растений обусловлено наличием в их составе самых разнообразных по своему химическому составу и действию биологически активных веществ, представляющих интерес как для пищевой и фармацевтической индустрии, так и для здравоохранения в целом. Одним из направлений развития фармацевтической отрасли является увеличение ассортимента лекарственных средств, к числу которых относится лекарственное растительное сырье и препараты на его основе. Решение данной задачи возможно за счет внедрения в медицинскую практику растений народной медицины; использования видов, систематически близких к официальным, имеющих достаточную сырьевую базу; комплексного использования лекарственного растительного сырья. Нами проводятся исследования растений флоры Северного Кавказа [2; 3; 6]. Объект исследований – ежевика сизая *Rubus caesius* (L.). Данное растение издавна известно как пищевое и лекарственное. В народной медицине используются листья и плоды, которые применяют в качестве вяжущего, кровоостанавливающего, мочегонного, противовоспалительного, ранозаживляющего и потогонного средства. Из многочисленных видов рода *Rubus* (L.) на Кавказе встречается 32 вида, наиболее распространена ежевика сизая *Rubus caesius* (L.) [5].

Целью работы является фармакогностическое изучение плодов ежевики сизой *Rubus caesius* (L.) для установления содержания биологически активных соединений, показателей подлинности и доброкачественности сырья.

Материалы и методы. Сырьё для исследований - плоды ежевики сизой *Rubus caesius*(L.), заготавливали от дикорастущих растений в фазу созревания в регионе Северо-Кавказского федерального округа. *Rubus caesius* (L.) - ежевика сизая, представляет собой многолетний кустарник высотой 150 см. Побеги дугообразно распростерты, цилиндрические, с сизым налетом, имеются небольшие изогнутые шипы. Листья сложные - тройчатые; листочки с обеих сторон зеленые, рассеянно волосистые, глубоко и неправильно надрезаннозубчатые. Конечный листочек втрое длиннее своего черешка, имеет яйцевидно-ромбическую форму, острый, иногда трехлопастный. Прилистники ланцетные. Цветоносные ветви в соцветии с многочисленными шипиками и железками. Цветки довольно крупные, лепестки у них белые, эллиптические. Чашелистики зеленые, прижатые при плодах. Тычинки почти равны столбикам. Плоды образованы сравнительно немногочисленными крупными костянками, покрытыми стирающим сизым налетом. Исследование морфолого-анатомических признаков проводили в соответствии с фармакопейной статьёй «FRUCTUS» [4]. Плоды исследовали сухие, рассматривая их невооруженным глазом и с помощью лупы (10х). Размеры определяли с помощью измерительной линейки и миллиметровой

бумаги. Цвет сырья определяли при дневном освещении, запах - при растирании, вкус - пробуя кусочек сырья или его отвар. Используя микроскопический метод анализа, установили микродиагностические признаки сырья. Определение проводили согласно методикам, изложенным в ГФ СССР XI издания [2; 4]. Сырье фиксировали в системе этанол-глицерин-вода в соотношении 1:1:1. Микроструктура изучалась на поперечных срезах экзокарпа, мезокарпа, эндокарпа. Срезы приготавливались лезвием безопасной бритвы от руки. В ходе эксперимента использовали временные микропрепараты, которые фиксировали в растворе глицерина. Анатомические исследования проводили при помощи микроскопа «БИОЛАМ» с увеличением объективов $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$.

При фитохимическом анализе в исследуемых образцах воздушно-сухого сырья определяли состав основных групп биологически активных соединений (БАС) и их количественное содержание, используя качественные реакции, методы ТСХ, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии. В водных извлечениях исследуемого сырья установили содержание полисахаридов, органических кислот, дубильных веществ. Полисахариды определяли по реакции осаждения спиртом этиловым 96%-ным; дубильные вещества - с железоаммонийными квасцами, 10%-ным раствором свинца ацетата, с желатином и бромной водой. Наличие органических кислот устанавливали хроматографическим анализом на бумаге восходящим методом в системе n - бутанол - муравьиная кислота - вода в присутствии достоверных образцов «свидетелей». Проявляли хроматограммы 0,1%-ным раствором бромфенолового синего в 96%-ном спирте этиловом (рН 6,7). При проявлении органические кислоты окрашиваются в ярко-желтый цвет на голубовато-синем фоне. Определение аскорбиновой кислоты проводили в системе растворителей: этилацетат - кислота уксусная ледяная (80:20), проявляя раствором 2,6 дихлорфенолиндофенолята натрия (R_f 0,42). Для определения органических кислот использовали также метод ВЭЖХ. Условия хроматографирования: хроматограф: GILSTON, ФРАНЦИЯ с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «Мультихром» для Windows; колонка: металлическая колонка ALTECH OA-1CЮO Organic Acids размером 6.5x300 мм; подвижная фаза: 0,005 М раствор серной кислоты, скорость подачи элюента 2 мл/мин.; продолжительность анализа 42 минуты; детектирование: УФ-детектор GILSTON UV/VIS модель 151, при длине волны 190 нм. Испытуемый раствор: около 10 г плодов измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в колбу вместимостью 200 мл, заливали 100 мл воды и выдерживали в течение 2 часов на кипящей водяной бане, затем охлаждали, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём извлечения 0,005 М раствором серной кислоты до метки, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр (раствор А). 20

мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили 0,005 М раствором серной кислоты до метки, перемешивали (испытуемый раствор). По 50 мкл испытуемого раствора и растворов РСО лимонной, щавелевой, яблочной (маликовой), янтарной, виннокаменной, салициловой и аскорбиновой кислот последовательно вводили в хроматограф и хроматографировали в выше приведенных условиях. Для приготовления растворов РСО около 0,025 г лимонной, щавелевой, яблочной, янтарной, виннокаменной и аскорбиновой кислот помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл 0,005 М раствора серной кислоты, доводили тем же растворителем до метки (растворы сравнения). Результаты представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1. Идентификация органических кислот плодов *Rubus caesius* (L) методом ВЭЖХ

№	Время, мин	Высота, mV	Площадь, mV·сек	ФО	Содержание, %	Название
1	0.7809	115.52	4921.73	1,000	14.85	аскорбиновая кислота
2	3.265	562.81	15348.58	1,000	46.32	щавелевая кислота
3	3.984	174.77	4066.92	1,000	12.27	маликовая кислота
4	4.443	107.17	1834.45	1,000	5.54	лимонная кислота
5	4.727	138.76	3926.56	1,000	11.85	винная кислота
6	5.213	25.93	929.24	1,000	2.80	янтарная кислота
7	5.608	15.17	365.73	1,000	1.10	бензойная кислота
8	6.36	20.76	903.41	1,000	2.73	салициловая кислота
9	8.442	16.65	833.13	1,000	2.51	н
10	10.1	0.28	3.06	1,000	0.01	н
	10.36	1177.81	33132.82	1,000	100.00	

Для определения фенольных соединений готовили этанольные, бутанольные, этилацетатные извлечения и проводили качественные реакции: цианидиновую пробу, с водным раствором хлорида железа (III), водным раствором натрия гидроксида, раствором ацетата свинца основного, далее использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1].

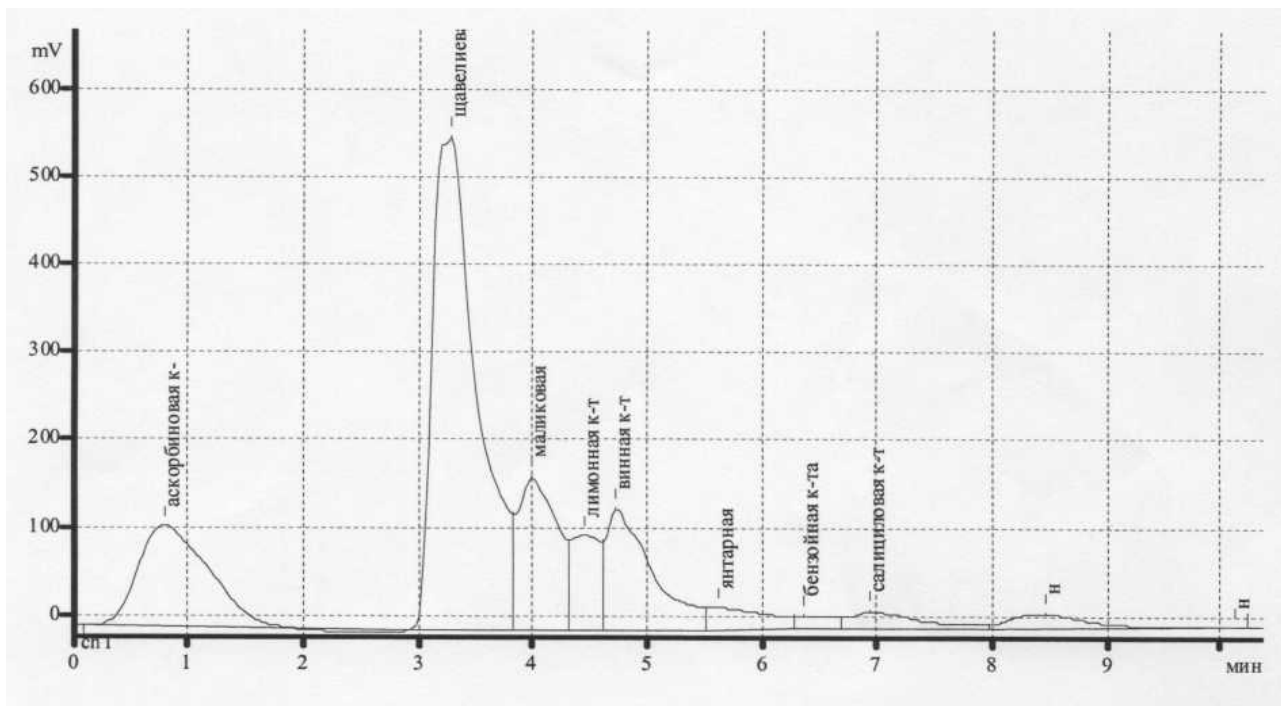


Рисунок 1 - Хроматограмма ВЭЖХ. Идентификация органических кислот в извлечениях плодов *Rubus caesius* (L.)

Определение фенольных соединений проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе GILSON-305 (Франция) с ручным инжектором RHEODYNE-7125 USA, результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы «МультиХром». В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 4,6x250 мм Kromasil C 18, размер частиц 5 микрон. Подвижная фаза: метанол - вода - фосфорная кислота концентрированная, в соотношении 400:600:5. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0,8 мл /мин. Продолжительность анализа 70 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора GILSTON UV/VIS модель 151, при длине волны 254 нм. Идентификацию разделенных веществ проводили путем сопоставления времен удерживания пиков, полученных на хроматограмме проб, с временами удерживания стандартных растворов. Оценку количественного соотношения идентифицированных веществ в исследуемых образцах проводили по площади пиков, используя метод внутренней нормализации.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате морфолого-анатомического изучения плодов ежевики были определены внешние и микродиагностические признаки сырья. Плод ежевики - сборная сложная сочная костянка наперстковидной формы, с восковым налетом. Может состоять из нескольких (до 76) костянок, их часто называют еще плодиками. Костянки соединены между собой и прикреплены к разросшемуся мягкому белому плодоложу. Прочность прикрепления костянок к плодоложу является основным отличительным признаком ежевики. Окраска плодов ежевики бывает темно-фиолетовая,

черная, пурпурная. Цвет снаружи темно-фиолетовый. Мякоть розовая, косточки темно-желтые. Запах приятный, характерный. Вкус кисловато-сладкий. Микроскопическим анализом установлено: эпидермис костянки мелкоклеточный, клетки полигональные; он несет многочисленные 1-клеточные волоски. Устьица трудно обнаруживаемые из-за густого волосяного покрова, часто деформированного. Субэпидермальный слой колленхиматоидный; он образует с эпидермисом экзокарп. Глубже располагается паренхима мякоти – мезокарп – с разнообразными по величине тонкостенными клетками. Стенка косточки – эндокарп - слагается из 2 слоев склеренхимы; клетки наружного слоя ориентированы продольно, внутреннего – поперечно. Поверхность чашелистиков густо покрыта такими же одноклеточными длинными волосками, которые образуют войлочный покров на костянках, но характеризуются большей толщиной стенок, а также встречаются разветвлённые волоски двух-четырёхконечные.

Фитохимическими исследованиями были обнаружены БАС в плодах *Rubus caesius* (L): полисахариды, органические кислоты, дубильные вещества, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты. Методом ВЭЖХ в водно-спиртовом (70%) извлечении плодов *Rubus caesius* (L) обнаружено 23 соединения, из них идентифицировано 11 веществ фенольной природы: флавоноиды (виценин, рутин, кемпферол, лютеолин), гидроксикоричные кислоты (галловая, хлорогеновая, кофейная, коричная), полифенольные соединения (танин, эпигаллокатехингаллат, эпикатехин). Содержание суммы идентифицированных фенольных соединений составило 74,51% от всех обнаруженных данным методом соединений [1]. В водном извлечении исследуемого сырья идентифицировано 8 органических кислот (аскорбиновая, щавелевая, маликовая, лимонная, винная, янтарная, бензойная, салициловая). Содержание суммы идентифицированных органических кислот составило 97,46% от всех обнаруженных данным методом соединений.

Выводы. Проведенное морфолого-анатомическое изучение плодов ежевики сизой *Rubus caesius* (L) позволило установить отличительные диагностические признаки, с помощью которых можно проводить достоверную идентификацию данного вида сырья и исключить ошибки при его заготовке. Фитохимическим анализом установлено присутствие основных групп БАС: полисахаридов, органических кислот, флавоноидов, дубильных веществ, гидроксикоричных кислот, что свидетельствует о перспективности использования данного вида ЛРС в медицине.

Список литературы

1. Вдовенко-Мартынова Н.Н., Кобыльченко Н.В., Блинова Т.И. Исследование фенольного комплекса ежевики сизой *Rubus caesius* (L) флоры Северного Кавказа // Традиционная медицина. - 2012. - № 5. - С. 204-206.
2. Вдовенко-Мартынова Н.Н., Кобыльченко Н.В., Блинова Т.И. Тёрн (*Prunus spinosa* L.) Химическое и фармакогностическое исследование, применение в медицинских и пищевых целях // Вопросы. Гипотезы. Ответы: наука XXI века : коллективная монография. - Краснодар, 2013. - Кн. 5. - 284 с.
3. Вдовенко-Мартынова Н.Н., Степанюк С.Н. Фитохимическое исследование листьев ежевики сизой *Rubus caesius* L. // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. - 2010. - № 7. - С. 37-40.
4. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М. : Медицина, 1987. - 336 с.
5. Гросгейм А.А. Флора Кавказа. – М.-Л. : АН СССР, 1952. - 276 с.
6. Чистота лекарственного растительного сырья – показатель безопасности применения / О.И. Попова, Н.Н. Вдовенко-Мартынова, А.А. Круглая и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 5 (3). - С. 748-750.

Рецензенты:

Денисенко О.Н., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации факультета последипломного образования Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава РФ», г. Пятигорск.

Попова О.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава РФ», г. Пятигорск.