

*Р. Р. Давидян*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФАРМАКОПЕЙНЫХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ НА ПРИМЕРЕ РУДБЕКЦИИ ШЕРШАВОЙ ЦВЕТКОВ

*Научный руководитель: канд. фарм. наук, доц. Р.И. Лукашов*

*Кафедра фармацевтической химии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*R. R. Davidyan*

## COMPARATIVE ANALYSIS OF PHARMACOPOEIAL TECHNIQUES OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTOCIANS ON THE EXAMPLE OF BLACK-EYED SUSAN FLOWER

*Tutor: associate professor R. I. Lukashov*

*Department of Pharmaceutical Chemistry,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме:** рудбекии шершавой цветки являются перспективным источником антоцианов, содержание которых составляет в среднем  $2,86 \pm 0,307\%$ . Наибольшее количество антоцианов экстрагируется по методике бегонии листьев при использовании в качестве экстрагента раствора хлористоводородной кислоты. Патулитрин и кофейная кислота не мешают количественному определению антоцианов спектрофотометрическим методом.

**Ключевые слова:** антоцианы, рудбекия шершавая, цветки, спектрофотометрия.

**Resume:** Black-eyed Susan flower are a perspective source of anthocyanins, the content of which is an average of  $2,86 \pm 0,307\%$ . The largest amount of anthocyanins is extracted by the technique of elephant's-ear leaf with using hydrochloric acid solution as an extractant. Patulitrin and caffeic acid do not influence on the quantitative determination of anthocyanins by spectrophotometric method.

**Keywords:** anthocyanins, Black-eyed Susan, flowers, spectrophotometry.

**Актуальность.** Антоцианы – группа биологически активных веществ (БАВ), которые встречаются в растительном мире и обладают рядом фармакологических эффектов (антиоксидантным, противовоспалительным, антиатеросклеротическим, противоопухолевым и др.). Антоцианы являются гликозидами, содержащими в качестве агликона антоцианидины, относящиеся к классу флавоноидов. Их спектр поглощения содержит характерный максимум в диапазоне длин волн: от 500 до 550 нм.

В Государственную фармакопею Республики Беларусь (ГФ РБ) включены бегонии листья, василька синего цветки и черники плоды свежие как лекарственное растительное сырье (ЛРС), стандартизируемое по антоцианам [1].

Ограниченное число наименований ЛРС, содержащих антоцианы, (только три по ГФ РБ) актуализирует поиск новых растений, содержащих в значительном количестве данную группу БАВ, или изучение уже известных лекарственных растений с позиции содержания в них антоцианов.

Рудбекия шершавая (*Rudbeckia hirta*) относится к травянистым растениям семейства сложноцветных (*Asteraceae*). Растение оказывает иммуномодулирующее действие и может являться фармакологической заменой эхинацеи пурпурной (*Echinaceae purpureae*) [2]. Цветки включены в ГФ РБ, их стандартизируют по сумме фенольных

соединений в пересчете на патулитрин. Наличие темно-красных и бурых пятен у основания ложноязычковых цветков и бурые трубчатые цветки содержат антоцианы, качественный и количественный состав которых мало изучен [3].

**Цель:** провести сравнение содержания суммы антоцианов в рудбекии шершавой цветках, установленного с применением разных фармакопейных методик ГФ РБ.

**Задачи:**

1. Провести сравнительный анализ фармакопейных методик количественного определения антоцианов на примере рудбекии шершавой цветков.

2. Изучить спектральные характеристики полученных по фармакопейным методикам извлечений с использованием в качестве экстрагентов растворов *кислоты хлористоводородной P* и *воды P*.

3. Оценить влияние присутствия других фенольных соединений в анализируемых извлечениях из рудбекии шершавой цветков на спектрофотометрическое определение антоцианов.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили рудбекии шершавой цветки, заготовленные в период массового цветения от культивируемых форм в середине июля 2018 г. (период массового цветения) в окрестностях г. Витебска (п. Улановичи).

Для исследования выбраны три фармакопейные методики определения антоцианов, описанные в ГФ РБ, т. 2 на бегонии листья, василька синего цветки, черники плоды свежие. Выполнение данных методик практически полностью соответствовало их описанию в ГФ РБ, а также для каждой методики производили замену *растворов кислоты хлористоводородной P* на *воду P* для получения водных извлечений. Сопоставляли результаты, полученные при экстракции раствором кислоты и *водой P*, с целью оценки влияния наличия кислоты в растворе на экстракцию антоцианов.

Использовали следующие реактивы: *воду P*, *раствор 10 г/л кислоты хлористоводородной P*, *метанол P*, *96% спирт P*, *кислоту хлористоводородную P*, *0,1% (об/об) раствор кислоты хлористоводородной P в метаноле P*. Их готовили согласно ГФ РБ, т. 1 [4].

В работе использовали регистрирующий спектрофотометр Solar серии РВ 2201. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн: от 200 до 800 нм.

Использовали растворы стандартных образцов патулитрина и кофейной кислоты (доминирующие фенольные соединения рудбекии шершавой цветков) для оценки их вклада в спектрофотометрическое определение антоцианов. Пересчет содержания антоцианов проводили на цианидина хлорид, стандартный образец которого также использовали в работе. Градуировочный график по цианидина хлориду получали методом последовательных разведений.

Статистическую обработку проводили при помощи пакета «Анализ данных» компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2010». Результаты представляли в виде среднего значения и полуширины его доверительного интервала ( $n=3$ ;  $P=95\%$ ).

**Результаты и их обсуждение.** Выбор методики осуществляли путем сравнения содержания суммы антоцианов, полученного по трем методикам. Приемлемой считали методику, показавшую наибольшее содержание данной группы БАВ.

Содержание суммы антоцианов, полученное при выполнении трех методик с использованием в качестве экстрагентов растворов кислоты и воды *P*, представлено в таблице 1.

**Табл. 1.** Содержание антоцианов при использовании фармакопейных методик

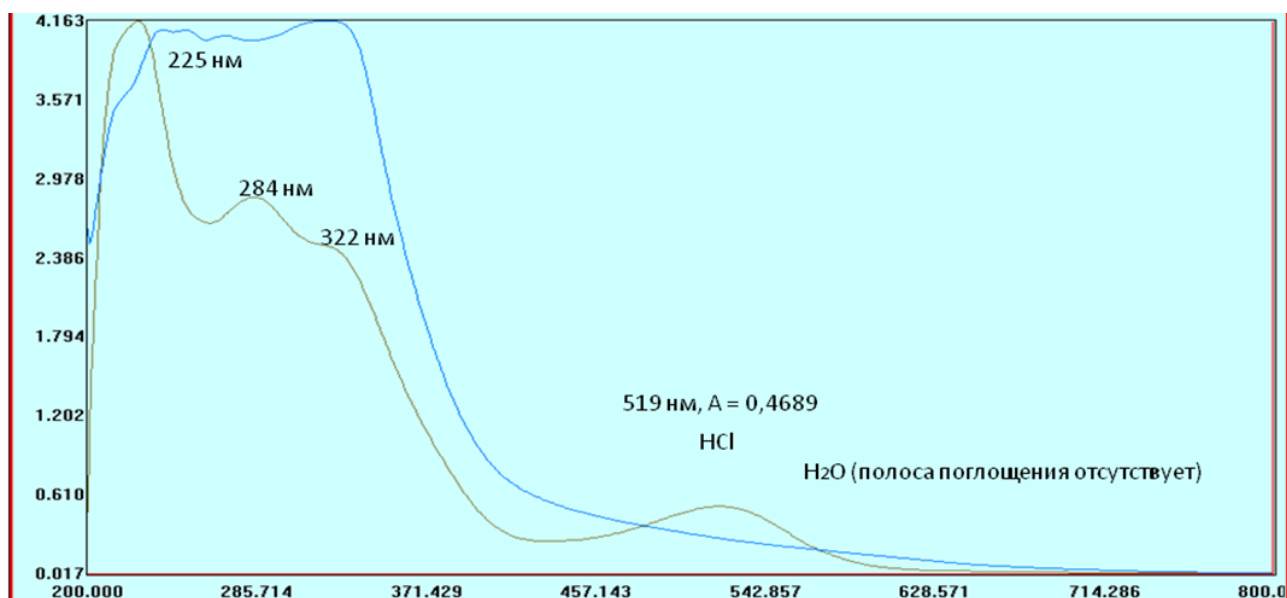
Методика	Бегонии листья		Василька синего цветки		Черники плоды свежие	
	HCl	H <sub>2</sub> O	HCl	H <sub>2</sub> O	Метанол+HCl	Метанол
Содержание антоцианов, %	2,86± 0,307	0,763± 0,00134	0,173± 0,00143	0,634± 0,00186	1,81± 1,01	0,279± 0,00159

Из таблицы 1 видно, что наиболее содержание суммы антоцианов определено по фармакопейной методике бегонии листьев. При замене экстрагента с раствора *кислоты хлористоводородной P* на *воду P* содержание антоцианов по данной методике резко снижалось, т.е. добавление *кислоты хлористоводородной P* в *воду P* обеспечивало более полную экстракцию антоцианов.

В методике черники плодов свежих в качестве экстрагента использовали *метанол P* (последующее определение проводилось путем разбавления раствором *кислоты хлористоводородной P* в *метаноле P*). При этом содержание антоцианов, полученное по этой методике, составляло в среднем 1,81±1,01%, что больше нижней границы фармакопейного критерия (≥0,3%). Данный результат можно считать достаточно большим, что создает предпосылки для последующего изучения водно-органической экстракции антоцианов без добавления кислоты в экстрагент, ее добавление рекомендуется на стадии спектрофотометрического анализа.

Содержание антоцианов, определенное в рудбекии шершавой цветках по методикам бегонии листьев и черники плодов свежих в среднем превышало нижние границы фармакопейных норм, установленных на данные виды сырья (не менее 0,1% и 0,3% соответственно), в 28,6 и 6,0 раза соответственно. Содержание, установленное по методике василька синего цветков, не превышало фармакопейную норму (не менее 0,6%). Данный факт указывал на то, что рудбекии шершавой цветки богаты антоцианами и могут рассматриваться как их перспективный источник.

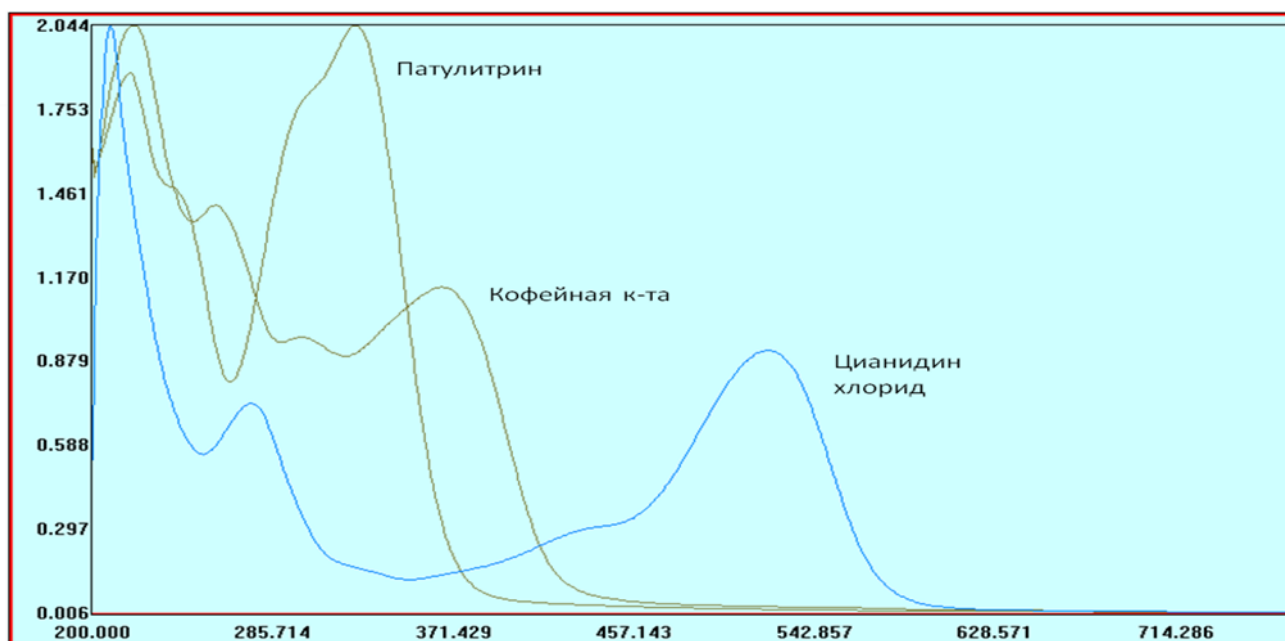
На рисунке 1 представлены спектры поглощения извлечений, полученных по методике бегонии листьев при экстракции раствором *кислоты хлористоводородной P* и *водой P*.



**Рис. 1** – Спектры поглощения извлечений, полученных по методике бегонии листьев при экстракции раствором кислоты хлороводородной *P* и водой *P*

Из рисунка 1 видно, что в спектре кислого извлечения наблюдался характерный для антоцианов максимум поглощения при длине волны 519 нм, в водном извлечении подобный максимум отсутствовал, что подтверждало результаты количественного определения.

В рудбекии шершавой цветках в значительном количестве содержатся флавоноиды с преобладанием патулитрина и гидроксикоричные кислоты с преобладанием кофейной кислоты. Эти группы БАВ также экстрагируются *водой P* и водно-органическими смесями [5] и соответственно могут повлиять на количественное определение антоцианов. Поэтому изучали спектры поглощения патулитрина, кофейной кислоты и цианидина хлорида, представленные на рисунке 2.



**Рис. 2** – Спектры поглощения патулитрина, кофейной кислоты и цианидин хлорида – вторичных метаболитов рудбекии шершавой цветков

Исходя из рисунка 2 очевидно, что патулитрин и кофейная кислота не мешали количественному определению антоцианов в случае их совместного извлечения, т.к. их поглощение в области длин волн: от 500 до 550 нм, характерной для антоцианов, практически отсутствовало.

Для пересчета содержания суммы антоцианов использовали стандартный образец цианидина хлорида, по которому строили градуировочный график. Уравнение градуировочного графика имело вид:  $y = 22,5x - 0,0806$  при  $R^2 = 0,9996$ . Максимум поглощения цианидина хлорида наблюдали при 523 нм.

#### **Выводы:**

1 Наибольшее содержание суммы антоцианов в рудбекии шершавой цветках определено по методике бегонии листьев и составляет  $2,86 \pm 0,307\%$ , что позволяет рекомендовать рудбекии шершавой цветки как перспективный источник, богатый антоцианами.

2 Максимумы поглощения извлечения, полученного по методике бегонии листьев, и цианидина хлорида отмечены при длинах волн 519 и 523 нм соответственно. Водные извлечения не имеют характерного для антоцианов максимума поглощения в области 500–550 нм.

3 Патулитрин и кофейная кислота при совместном присутствии в растворе с цианидина хлоридом не мешают достоверному количественному определению антоцианов. Построен градуировочный график по цианидина хлориду.

#### **Литература**

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А. А. Шерякова. – 2-е изд. – Молодечно: Тип. «Победа», 2012. – Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 1220 с.

2. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. С. И. Марченко. – 2-е изд. – Молодечно: Тип. «Победа», 2016. – Т. 2. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. – 1368 с.
3. Лукашов, Р. И. Стандартизация, химический состав и фармакологическая активность цветков рудбекии шершавой (*Rudbeckia hirta* L.): автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01 / Р. И. Лукашов; ВГМУ. – Витебск, 2015. – 25 с.
4. Лукашов, Р. И. Фенольные соединения рудбекии шершавой цветков и их иммуностропная активность [Текст]\* / Р. И. Лукашов, Д. В. Моисеев // Вестник фармации. – 2015. – № 4. – С. 118–124.
5. The RP-HPLC Analysis of Anthocyanins / M. Luczkiewicz, W. Cisowski // Chromatographia. – 1998. – Vol. 48, № 5/6. – P. 360–364.