

СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПЛОДАХ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

[А. Д. Севостьянова, Д. С. Круглов](#)

*ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)*

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния способа заготовки лекарственного растительного сырья «смородины черной плоды» на содержания биологически активных соединений, извлекаемых из них. Методами прямой и дифференциальной спектрофотометрии и хроматоспектрофотометрии определено количественное содержание флавоноидов, антоцианов, аскорбиновой кислоты в сухих и замороженных плодах смородины черной. Установлено, что из сырья «смородины черной плоды», заготовленного с использованием для консервации метода сушки, извлекается больше биологически активных соединений (антоцианы — 11,1 и 4,7 % и аскорбиновой кислоты 0,82 и 0,15 % соответственно), что позволяет рекомендовать указанный способ консервации сырья при изготовлении фитопрепаратов.

Ключевые слова: плоды черной смородины, аскорбиновая кислота, антоцианы, витамины, количественное определение.

Севостьянова Анжелика Дмитриевна — студент 5-го курса фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: lika4ka93@mail.ru

Круглов Дмитрий Семенович — кандидат технических наук, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: kruglov_ds@mail.ru

Введение. Современный, все убыстряющийся ритм жизни, существенно интенсифицирует нейropsychические перегрузки. Хронический стресс, вызванный таким напряжением, приводит к нарушениям обмена веществ, что в свою очередь увеличивает потребность организма в витаминах. Наряду со стресс-фактором ухудшение экологии и несбалансированность питания также способствуют развитию гиповитаминозов [1].

Регулярный продолжительный недостаток витаминов в еде может вести к снижению работоспособности, воздействует на состояние отдельных тканей и органов (мышцы, слизистые, кожа, костная ткань) и основных функций организма, например, защитные

силы организма, рост, продолжение рода, физические и интеллектуальные возможности.

Одним из лекарственных растений, которое широко используется в диетическом питании для обогащения рациона витаминами, является смородина черная [5]. Плоды смородины входят в поливитаминные сборы. Ягоды содержат много сахаров, кислот и витаминов, особенно аскорбиновой кислоты. Благодаря присутствию рутина, регулярное употребление черной смородины укрепляет стенки сосудов и улучшает их эластичность. Плоды смородины черной активизируют обмен веществ, обладают противовоспалительным действием, стимулируют функции надпочечников.

Для сохранения состава лекарственного растения и обеспечения его качества сырье обычно заготавливают с использованием способа консервации термическая сушка. Вместе с тем, в настоящее время в домашних условиях при консервации ягод становится популярным замораживание сырья.

В этой связи *целью настоящего исследования* являлось определение содержания биологически активных соединений в плодах смородины черной в зависимости от способа заготовки лекарственного растительного сырья.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили плоды культивированной смородины черной, заготовленные с одной заросли в фазу плодоношения в июле 2014 года.

Собранное сырье разделяли на две партии. Сырье первой партии доводили до воздушно-сухого состояния (остаточная влажность 7,0 %) путем многоэтапной сушки: выдержка сырья при комнатной температуре в течение 2-3-х суток с последующей ступенчатой сушкой в сушильном шкафу «СНОЛ» с постепенным повышением температуры до 70 °С до воздушно-сухого состояния. Вторую партию сырья замораживали в морозильной камере при температуре —20 °С.

Количественное определение биологически активных соединений проводили спектрофотометрическим методом на приборе СФ-56 и фотоэлектроколориметрическим методом на приборе ФЭК-4.

Для определения содержания флавоноидов использовали суммарное извлечение 70 % этанолом в соотношении сырье — экстрагент 1 : 100. Затем в мерную колбу на 25 мл помещали 2 мл извлечения, добавляли 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида и 0,1 мл 3 % кислоты уксусной и объем доводили до метки. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили спектрофотометрически на приборе СФ-56 по поглощению УФ-света при $\lambda = 410$ нм [2].

Количественное определение антоцианов проводили методом прямой спектрофотометрии [2] в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид по поглощению УФ-света при $\lambda = 510$ нм для извлечения полученного с использованием в качестве экстрагента 1 % раствора кислоты хлористоводородной.

Известно, что поглощение антоцианидиновых пигментов сильно зависит от pH раствора: в сильноокислой среде окраска большинства антоцианидинов ярко-красная, при увеличении pH она постепенно переходит в темно-синюю, что связано с изменением структуры входящего в состав пигмента агликона. Различие в адсорбции при $\lambda = 510$ и 700 нм при pH = 1 и 4,5 пропорционально содержанию антоцианидина. На этом принципе основано определение антоцианидинов методом pH-дифференциальной спектрофотометрии [4], в котором расчет содержания антоциана ведут по формуле:

$$C = \frac{\Delta A \cdot M \cdot f \cdot V}{\varepsilon \cdot l \cdot m} \times \frac{100}{100 - w} \times 100, \%, \text{ где}$$

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5}$$

A_{510} и A_{700} — поглощение света при $\lambda = 510$ и 700 нм соответственно, ε и M — коэффициент экстинкции и молярная масса антоцианидина, используемого в качестве стандарта (в данном случае цианидин-3,5-дигликозид).

При расчете принято во внимание, что оптическое поглощение A и оптическая плотность D связаны соотношением: $A = 1 - 10^{-D}$.

Из высушенного сырья по фармакопейной методике получали суммарное извлечение с использованием в качестве экстрагента 1 % кислоты хлористоводородной.

На спектрофотометре СФ-56 были сняты УФ-спектры извлечений в диапазоне 350–750 нм.

Дополнительно были проведены измерения оптической плотности при $\lambda = 510$ и 700 нм при разных рН исследуемого раствора. Исследуемый раствор исходно имел рН = 1,0.

Доведение до рН = 4,5 производилось путем добавления к исследуемому раствору нескольких капель водного раствора аммиака.

При количественном определении аскорбиновой кислоты широко известная методика количественного определения аскорбиновой кислоты, основанная на титровании раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия [2], оказалась заведомо неприменимой, поскольку в красноокрашенном извлечении из плодов смородины черной определить точку эквивалентности по появлению розовой окраски невозможно. В этой связи определение аскорбиновой кислоты проводили по трем методикам — хроматоспектрофотометрически, спектрофотометрически и колориметрически.

Для хроматоспектрофотометрического определения навеску измельченного сырья помещали в фарфоровую ступку, тщательно растирали, постепенно добавляя 40 мл воды, и настаивали 10 мин. Затем смесь размешивали и фильтровали, измеряя полученный объем V_1 (раствор А).

0,2 мл раствора А (V_2) наносили полосой на пластинку «Silufol». Хроматографировали в системе растворителей этанол — уксусная кислота — вода (90 : 9 : 1) в защищенном от света месте. После того как фронт растворителей достигал 15 см, пластинку вынимали и высушивали при комнатной температуре. Хроматограмму проявляли, обрабатывая 10 % раствором кислоты фосфорно-молибденовой в 96 % этаноле. После проявления окрашенную в синий цвет зону вырезали и элюировали последовательно 3, 2 и 1 мл 70 % этанола при комнатной температуре. Элюаты объединяли, фильтровали и измеряли общий объем фильтрата (V_3).

Параллельно проводили опыт со стандартным раствором аскорбиновой кислоты (0,004 % водный раствор) и контрольным образцом (элюат пустого участка хроматограммы, полученный в тех же условиях). Измеряли оптическую плотность растворов при 720 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см.

Содержание аскорбиновой кислоты в процентах в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле [7]:

$$X = \frac{D_1 \cdot 0,00004 \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D_1 , D_0 — оптическая плотность исследуемого и стандартного растворов; 0,00004 — содержание аскорбиновой кислоты в стандартном растворе, г/мл; V_1 — объем раствора, мл; m — масса сырья, г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

В колориметрическом методе в качестве экстрагента использовали смесь равных объемов водных растворов 6 % кислоты метафосфорной и 0,18 % ЭДТА. Навеску сырья гомогенизировали с 5–10 мл экстрагента, и полученный гомогенизат количественно переносили в мерную колбу объемом 50 мл, доводили до метки экстрагентом, настаивали 10 мин и фильтровали. Готовили ряд растворов в соответствии с табл. 1 [6].

Таблица 1

Последовательность добавления реагентов в мл

п/п	Реагент	№ раствора				
		1	1*	2	3*	3
1	Ацетатный буфер, pH 5,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
2	Экстракт	—	—	—	5	5
3	Стандартный раствор аскорбиновой кислоты	—	—	0,5	—	—
4	Экстрагент	5	5	4,5	—	—
5	Вода очищенная	—	2	—	—	2
6	2,6-дихлорфенолиндифенолят натрия [2]	2	—	2	2	—

В дальнейшем измеряли поглощение монохроматического УФ-излучения в пробах № 1–3 при $\lambda = 540$ нм, и затем содержание аскорбиновой кислоты рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{K \cdot (D_1 - D_3) \cdot V_{\text{общ}} \cdot 100}{D_{1-2} \cdot V_{\text{пр}} \cdot m}, \text{ мг\%,}$$

где K — количество аскорбиновой кислоты в 0,5 мл стандартного раствора, взятого на определение, мг; D_{1-2} — поглощение в растворе № 1 относительно раствора № 2; D_1 — поглощение в растворе № 1 относительно раствора № 1*; D_3 — поглощение в растворе № 3 относительно раствора № 3*.

При спектрофотометрическом методе определения аскорбиновой кислоты в качестве экстрагента использовали 1 % раствор кислоты хлористоводородной, а определение вели, измеряя поглощение УФ-света с $\lambda = 242$ нм, и далее по известному коэффициенту молярной экстинкции рассчитывали содержание аскорбиновой кислоты в растворе [3].

Результаты и обсуждение. Общий фитохимический анализ, проведенный по общеизвестным методикам, выявил наличие в плодах черной смородины антоцианов, флавоноидов, полисахаридов и аскорбиновой кислоты. Результаты количественного определения содержания исследуемых групп биологически активных соединений приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количественное содержание биологически активных соединений (% , в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Биологически активные соединения	Высушенное сырье	Замороженное сырье
1	Содержание флаваноидов в пересчете на рутин	0,08 ± 0,008	0,07 ± 0,008
2	Содержание антоцианов в пересчете на 3,5-цианидиндиглюкозид, в том числе:		
	прямая спектрофотометрия	14,9 ± 0,7	6,1 ± 0,3
	дифференциальная спектрофотометрия	11,1 ± 0,5	4,7 ± 0,4
3	Аскорбиновая кислота, в том числе:		
	спектрофотометрически	1,1 ± 0,1	0,32 ± 0,015
	хроматоспектрофотометрически	0,65 ± 0,07	0,09 ± 0,01
	калориметрически	0,82 ± 0,08	0,15 ± 0,05

Анализ полученных данных показывает, что из сухих плодов биологически активных соединений извлекается больше и в этом смысле способ заготовки лекарственного растительного сырья, заключающийся в сборе плодов и их последующей сушке, является более приемлемым для изготовления фитопрепаратов. При определении аскорбиновой кислоты метод прямой спектрометрии дает завышенные результаты, что может быть объяснено вкладом в оптическую плотность извлечения других групп биологически активных соединений. Этим же обстоятельством может объясняться и завышенное содержание антоцианов, определяемое методом прямой спектрометрии относительно метода дифференциальной спектрометрии. В то же время заниженные результаты определения аскорбиновой кислоты при использовании хроматоспектрофотометрии естественно объясняются потерями, которые неизбежны при применении используемой техники эксперимента.

Выводы

- состав биологически активных соединений не изменяется в зависимости от способа консервации;
- методика дифференциальной спектрометрии наиболее применима для количественного определения антоцианов, а калориметрический метод — для определения содержания аскорбиновой кислоты;
- из сухого сырья извлекается существенно больше биологически активных соединений, и данный способ консервации сырья «смородины черной плоды» можно рекомендовать для получения витаминных фитопрепаратов.

Список литературы

1. Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии / Под ред. В. А. Тутельяна. — М. : Палея, 2001. — 560 с.
2. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд. — М. : Медицина, 1989. — Вып. 2. — 400 с.
3. Девис М. Витамин С. Химия и биохимия : пер с англ. / М. Девис, Дж. Остин, Д. Патридж. — М. : Мир, 1999. — 176 с.
4. Круглов Д. С. Определение антоцианов в плодах черники и голубики методом рН-дифференциальной спектрофотометрии / Д. С. Круглов, А. В. Ильиных, И. В. Шилова // Сб. научных тр. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» / Под ред. М. В. Гаврилина ; Пятигорская ГФА. — Пятигорск, 2008. — Вып. 63. — С. 282-284.
5. Мазнев Н. И. Энциклопедия лекарственных растений / Н. И. Мазнев. — М. : Мартин,

2003. — 496 с.

6. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище : руководство Р 4.1.1672-03 от 30.06.2003. — М. : Федеральный центр Госсанэпиднадзора МЗ РФ, 2004. — 240 с.
7. Фармакогностическая характеристика листьев какалии копьевидной (*CACALIA NASTATA* L.) / Д. Н. Оленников [и др.] // Химия растительного сырья. — 2004. — № 3. — С. 43-52.

MAINTENANCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE CONNECTIONS IN BLACKCURRANT FRUITS

[A. D. Sevostyanova](#), [D. S. Kruglov](#)

SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)

The purpose of the presented research was studying of influence of preparation method of medicinal vegetable raw materials «blackcurrant fruits» on contents of biologically active connections received from them. Methods of straight line and differential spectrophotometry and chromatophotometry determined the quantitative maintenance of flavonoids, anthocyanin, ascorbic acid in the dry and frozen blackcurrant fruits. It is established that from raw materials of «blackcurrant fruits», the drying method prepared with usage for preservation, more biologically active connections are received (anthocyanin — 11,1 and 4,7 % and ascorbic acid 0,82 and 0,15 % respectively). That allows recommending of the specified method of preservation of raw materials at production of phytopreparations.

Keywords: blackcurrant fruits, ascorbic acid, anthocyanin, vitamins, quantitative definition.

About authors:

Sevostyanova Anzhelika Dmitriyevna — student of the 5th course of pharmaceutical faculty at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: lika4ka93@mail.ru

Kruglov Dmitry Semenovich — candidate of technical science, assistant professor of pharmacognosy and botanic chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: kruglov_ds@mail.ru

List of the Literature:

1. Vitamins and microcells in clinical pharmacology / Under the editorship of V. A. Tutelyan. — M. : Paley, 2001. — 560 p.
2. State pharmacopeia of the USSR. General methods of analysis. Medicinal vegetable raw materials / MH of the USSR. — 11th ed. — M. : Medicine, 1989. — Iss. 2. — 400 p.
3. Davies M. Vitamin C. Chemistry and biochemistry : translation from English / M. Davies, J. Austen, D. Patridzh. — M. : World, 1999. — 176 p.
4. Kruglov D. S. Definition of antotsian in fruits of bilberry and blueberry by method of pH-differential spectrophotometry / D. S. Kruglov, A. V. Ilinykh, I. V. Shilova // Scientific works «Development, research and marketing of new pharmaceutical production» / Under the editorship of M. V. Gavrilin ; Pyatigorsk SFA. — Pyatigorsk, 2008. — Iss. 63. — P. 282-284.
5. Maznev N. I. Encyclopedia of herbs / N. I. Maznev. — M. : Martin, 2003. — 496 p.
6. The guide to methods of quality control and safety of dietary supplements to food : management P 4.1.1672-03 of 30.06.2003. — M. : Federal center of Gossanepidnadzor of MH Russian Federation, 2004. — 240 p.

7. Pharmacognostic characteristic of leaves of *Cacalia atriplicifolia* (CACALIA HASTATA L.) / D. N. Olennikov [et al.] // Chemistry of vegetable raw materials. — 2004. — N 3. — P. 43-52.