

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, Д. К. Носова, А. И. Колотнева

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 19.02.2022 г.

Аннотация. Плоды облепихи крушиновидной широко изучены и применяются в медицине, чего нельзя сказать о листьях. В РФ разрешён к применению противовирусный препарат – «Гипорамин». Это пока единственный лекарственный препарат, получаемый из экстракта листьев облепихи. Несмотря на активное изучение российскими и зарубежными исследователями биологически активных веществ листьев и их фармакологического действия, их использование крайне ограничено. Это связано с отсутствием нормативной документации по стандартизации данного вида сырья облепихи. Целью исследования являлось определение содержания экстрактивных веществ в листьях облепихи крушиновидной. Объектом служили высушенные листья трёх фенологических фаз: 1 – начало июня (фаза завязывания плодов), 2 – середина июля (фаза единичного созревания плодов), 3 – конец августа-начало сентября (фаза массового созревания плодов), заготовленные в 2021 году. Были использованы экстрагенты с различной полярностью и рН (гексан, хлороформ, этилацетат, ацетон, спирт 96, 70 и 40%, вода очищенная, кислота хлористоводородная разведенная и 0.25% раствор аммиака). Экстракцию проводили по методике 1 Общей фармакопейной статьи «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. Для оценки влияния ультразвука на выход экстрактивных веществ из листьев использовали ультразвуковую ванну «Град 40-35». Параметры озвучивания: мощность 180 Вт, температура 70 °С, частота 35 кГц.

Впервые для изучаемого растительного сырья проведено количественное определение содержания экстрактивных веществ, а также применен метод озвучивания с целью интенсификации выхода экстрактивных веществ из листьев облепихи крушиновидной. Подобраны оптимальные экстрагенты, дающие наибольший выход экстрактивных веществ из сырья. Установлено, что к моменту массового созревания плодов накопление биологически активных веществ в листьях, экстрагируемых спиртом 40 - 70% концентраций максимально. Применение ультразвуковой ванны позволило сократить время экстракции на 1 час (с 120 до 60 минут) при сохранении выхода экстрактивных веществ. Полученные результаты позволят сформировать раздел «Экстрактивные вещества» в проекте фармакопейной статьи.

Ключевые слова: Облепиха крушиновидная, *Hippophaë rhamnoides* L., листья, экстрактивные вещества, ультразвуковая экстракция, фенологические фазы.

Облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.) – многолетний ягодный кустарник сем. Лоховые (*Eleagnaceae*). Является двудомным растением. Дикорастущие особи имеют вид многостебельного древовидного кустарника высотой до 9 м, а в культуре – многоствольное дерево, не превышающее высоту 4 м [1].

В медицинской практике широко применяются плоды облепихи крушиновидной свежие. Листья используются только в народной медицине. Известен противовирусный лекарственный растительный препарат (ЛРП) «Гипорамин», в состав которого входит экстракт листьев. Экспериментально

доказано, что «Гипорамин» обладает низкой токсичностью и отсутствием нежелательных отдалённых эффектов. Проводится селекционная работа по получению сорта облепихи с большим содержанием танинов [2-4]. Такое ограниченное применение связано с малой изученностью данной морфологической группы сырья облепихи крушиновидной.

Основными биологически активными веществами (БАВ) листьев являются дубильные вещества (галловая кислота в свободной и связанной формах), флавоноиды, жирные кислоты, а также витамины различных групп и микроэлементы [5-11]. Каротиноиды встречаются в форме свободных соединений, таких как лютеолин, β-каротин, виолоксантин и неоксантин.

© Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Носова Д. К., Колотнева А. И., 2022

В ряде источников выявлены разные виды фармакологической активности экстракта из листьев облепихи крушиновидной – антиоксидантная, мембранопротекторная, адаптогенная [12-15].

Листья облепихи широко изучаются за рубежом. За счёт высокой антиоксидантной активности экстракты из листьев возможно применять в качестве противоопухолевого средства. Авторами установлено, что водный экстракт из листьев обладает мощной адаптогенной активностью и низкой токсичностью [16-17].

В одном из исследований в качестве экстрагента для получения субстанции из надземной части облепихи крушиновидной применяли 50% этанол. Оптимальными условиями экстракции листьев с целью получения максимального количества БАВ являются двукратная экстракция в течение 6 часов [18]. Данная методика имеет ряд недостатков, таких как длительность, трудоёмкость, большой расход этанола.

Одним из показателей качества лекарственного растительного сырья (ЛРС), включенного практически во все монографии на растительные объекты ГФ РФ XIV [19-20], является количественное содержание экстрактивных веществ (ЭВ). Поэтому при разработке проектов, пока отсутствующей современной нормативной документации (НД) на данный вид ЛРС, необходимы исследования по выбору оптимального экстрагента и обоснованию предлагаемых количественных норм такого показателя качества, как «Экстрактивные вещества».

Цель работы – определение содержания экстрактивных веществ в листьях облепихи крушиновидной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы высушенные листья облепихи крушиновидной трёх фенологических фаз: 1 – начало июня (фаза завязывания плодов – период полного облиствления), 2 – середина июля (фаза единичного созревания плодов), 3 – конец августа-начало сентября (фаза массового созревания плодов – до фенофазы пожелтения и листопада) [21]. Такие фенологические фазы, как появление и распускание листьев не представляют интерес для исследования, так как их массовая заготовка в данные периоды может привести к снижению накопления БАВ плодами растения – пока основного фармакопейного сырья облепихи крушиновидной. Заготовка проведена в указанные периоды 2021 года на территории Воронежской области (Острогжский район) от дикорастущих

растений в соответствии с рекомендованными правилами. Сырьё заготавливалось от мужских и женских растений. Для анализа отбиралась средняя аналитическая проба. Листья высушивали методом воздушно-теневого сушки при комнатной температуре до остаточной влажности не более 8-9%.

Исследование проводилось в соответствии с ОФС 1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ РФ XIV [19] (метод 1). В качестве экстрагентов использовали следующие растворители (марки х.ч., ЗАО «Вектон», СПб, Россия) – гексан, хлороформ, этилацетат, ацетон, спирт 96, 70 и 40%, вода очищенная, а также кислота хлористоводородная разведенная и 0.25% раствор аммиака. Для оценки влияния ультразвука на выход ЭВ проведено определение с применением ультразвуковой ванны «Град 40-35» (ООО «Град-Технолоджи», Россия, Москва). Параметры озвучивания: мощность 180 Вт, температура 70 °С, частота 35 кГц по методике 1, варьируя временем экстракции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Так как известно из литературных источников [5-6], что комплекс БАВ листьев облепихи крушиновидной представлен веществами, составляющими гидрофильные (органические кислоты, аминокислоты, минеральные вещества, полифенолы и др.) и липофильные (хлорофиллы, жирные кислоты, каротиноиды и др.) фракции, на первом этапе исследования осуществляли изучение влияния полярности и рН экстрагента на выход ЭВ из листьев. Данные необходимы для обоснования выбора оптимального растворителя при планировании производства различных лекарственных форм на основе изучаемого сырья. Согласно полученным результатам, наибольший выход ЭВ наблюдается при экстракции сырья спиртами 40-70 % (рис. 1), что можно объяснить их универсальностью по отношению к БАВ различной природы.

Для определения влияния кислотности экстрагента сырьё подвергали экстракции растворителями в интервале рН 2-10. В результате установлено, что при рН=2-3 выход ЭВ максимальный, постепенно снижаясь к рН=6-7, и снова увеличивающийся с ростом до 10-11 (рис. 2). Это связано, в первую очередь, с гидролитическими процессами БАВ в кислой и щелочной средах, что приводит к повышению их растворимости и выходу в извлечение.

Для сравнительного анализа накопления БАВ в листьях облепихи крушиновидной различных из-

учаемых фенологических фаз проведено определение содержания ЭВ в них на примере 70% этанола, как экстрагента, обеспечивающего максимальную степень извлечения (рис. 3). В результате установлено, что в фазу 3 (фаза массового созревания плодов) наблюдается максимальное накопление БАВ, экстрагируемых данным растворителем.



Рис. 1. Влияние полярности экстрагента на выход ЭВ из листьев облепихи крушиновидной

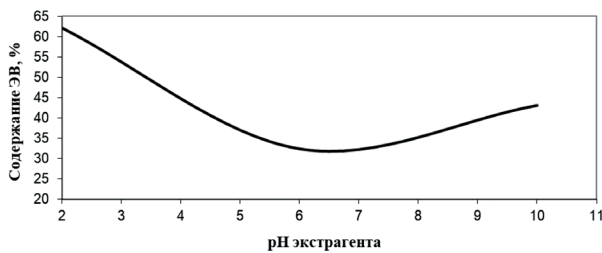


Рис. 2. Влияние pH экстрагента на выход ЭВ из листьев облепихи крушиновидной

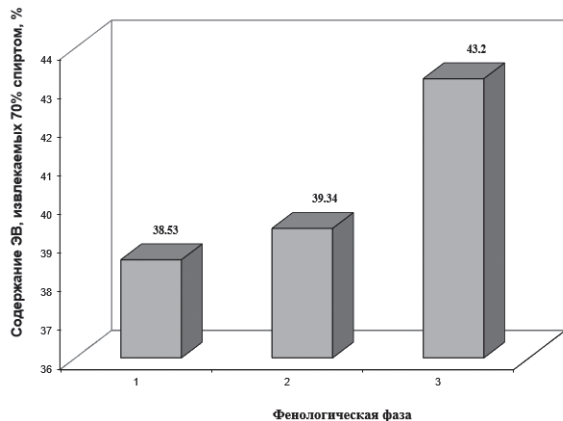


Рис. 3. Выход ЭВ из листьев, заготовленных в различные изучаемые фенологические фазы

Известно, что одним из способов интенсификации процессов экстракции является УЗ-обработка сырья. С целью изучения возможности увеличения экспрессности фармакопейной методики определения ЭВ в листьях облепихи крушиновидной, а также их стабильности под действием физического воздействия, была проведена

экстракция с использованием УЗ-ванны (на примере 3 фазы заготовки, экстрагент – спирт 70%). Время экстракции составляло 30, 60 и 90 минут при соблюдении остальных параметров фармакопейной методики 1. В результате установлено, что максимальный выход ЭВ из сырья, больший по сравнению с нагреванием в течение 2 ч на водяной бане, наблюдается уже через 60 минут озвучивания (рис. 4), далее выходя на плато.

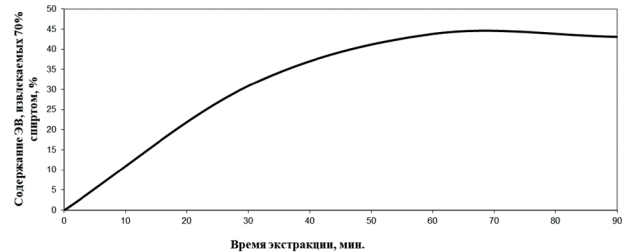


Рис. 4. Влияние времени озвучивания на выход ЭВ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые проведено количественное определение содержания ЭВ в листьях облепихи крушиновидной. Определены оптимальные экстрагенты, позволяющие достигнуть максимального выхода ЭВ из сырья (спирты 40-70%). Установлено, что к периоду массового созревания плодов листья накапливают наибольшее количество БАВ, экстрагируемых спиртами данных концентраций. Впервые использован метод озвучивания для интенсификации экстракции БАВ из листьев облепихи крушиновидной. Применение этого метода позволило сократить время экстракции на 1 час (со 120 до 60 минут) при сохранении выхода ЭВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михеев А.М., Деменко В.И. Облепиха. Москва, Росагропромиздат, 1990, 48 с.
2. Регистр лекарственных средств России. Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 23.11.2021).
3. Морозов В.И. // Химико-фармацевтический журнал. 2007. Т. 41. № 8. С. 19-21.
4. Бортникова В.В. // Биомедицина. 2011. №3. С. 106-108.
5. Мельников О.М. // Товарный консалтинг и аудит потребительского рынка. 2008. С. 128-132.
6. Мельников О.М. // Химия растительного сырья. 2010. №2. С. 113-116.
7. Dharam P.A., Amrit K.S., Jyoti K., Tanveer N. // Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012. №2(2), pp. 108-113.

8. Arimboor R., Kumar K.S., Arumughan C. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008. №47(1), pp. 31-38.
9. Pop R.M., Weesepeol Y., Socaciu C., Pinteа A., Vincken J.P., Gruppen H. // *Food Chem*. 2014. №147, pp. 1-9.
10. Богомолова Н.И., Мотылева С.М. // *Современное садоводство*. 2013. №4 (8). С. 51-57.
11. Мотылева С.М. // *Селекция, генетика и сортовая агротехника плодовых культур*. 2009. С. 131-134.
12. Тарасов А.В., Бухаринова М.А., Хамзина Е.И. // *Индустрия питания*. 2018. Т. 3. №2. С. 31-38.
13. Мурзахметова М.К., Утегалиева Р.С., Аралбаева А.Н., Лесова Ж.Т. // *Actualscience*. 2015. Т. 1. № 5(5). С. 26-28.
14. Кароматов, И.Д. // *Биология и интегративная медицина*. 2018. № 6(23). С. 37-47.
15. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S.C., Sharma M., Singh S., Kumar H.T., Singh A.K., Nivsarkar M., Kaushik M.P., Sawhney R.C., Chaurasia O.P., Prasad G.B. // *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006. №44(10), pp. 821-831.
16. Айтуарова А.Ш., Жусупова Г.Е. // *Известия научно-технического общества «КАХАК»*. 2015. №4 (51). С. 4-10.
17. Usha T., Middha S.K., Goyal A.K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. // *The Journal of Biomedical Research*. 2014. №28(5), pp. 406-415.
18. Saggi S., Divekar H.M., Gupta V., Sawhney R.C., Banerjee P.K., Kumar R. // *Food Chem Toxicol*. 2007. №45(4), pp. 609-617.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Режим доступа: <https://femb.ru/femb/> (дата обращения: 19.02.2022)
20. Тринева О.В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной. Воронеж, Издательский дом ВГУ, 2016. 224 с.
21. Исачкин А.В., Зубик И.Н., Потапова А.В., Ермаков М.А. // *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*. 2019. №2. С. 64-69.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Ковалёва Н. А., аспирант, преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии

E-mail: natali-sewer@yandex.ru

Тринева О. В., доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии

E-mail: trineevaov@mail.ru

Носова Д. К., студентка 4 курса фармацевтического факультета

E-mail: diya.31@mail.ru

Колотнева А. И., студентка 4 курса фармацевтического факультета

E-mail: nastya.kolotneva.48@gmail.com

Voronezh State University

Kovaleva N. A., postgraduate student, lecturer at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology

E-mail: natali-sewer@yandex.ru

Trineeva O. V., PhD., DSci., Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology

E-mail: trineevaov@mail.ru

Nosova D. K., 4th year student of the Faculty of Pharmacy

E-mail: diya.31@mail.ru

Kolotneva A. I., 4th year student of the Faculty of Pharmacy

E-mail: nastya.kolotneva.48@gmail.com

DETERMINATION OF EXTRACTIVES IN THE LEAVES OF SEA BUCKTHORN

N. A. Kovaleva, O. V. Trineeva, D. K. Nosova, A. I. Kolotneva

Voronezh State University

Abstract. The fruits of sea buckthorn are widely studied and used in medicine, which cannot be said about the leaves. In the Russian Federation, the antiviral drug «Hyporamine» is approved for use. It is the only medicinal product obtained from sea buckthorn leaf extract. Despite the active study by Russian and foreign researchers of biologically active substances in leaves and their pharmacological action, their use is extremely limited. This is due to the lack of regulatory documentation for the standardization of this type of sea buckthorn raw material. The aim of the study was to determine the content of extractives in the leaves of sea buckthorn. The objects were

dried leaves of three phenological phases: 1 - early June (fruit setting phase), 2 - mid-July (single fruit ripening phase), 3 - late August-early September (mass fruit ripening phase), harvested in 2021. We used extractants with different polarity and pH (hexane, chloroform, ethyl acetate, acetone, alcohol 96, 70 and 40%, purified water, diluted hydrochloric acid and 0.25% ammonia solution). Extraction was carried out according to method 1 of the General Pharmacopoeia Monograph «Determination of the content of extractives in medicinal plant raw materials and herbal medicinal products» of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. To assess the effect of ultrasound on the yield of extractives from the leaves, we used an ultrasonic bath «Grad 40-35». Sound parameters: power 180 W, temperature 70 °C, frequency 35 kHz.

For the first time, for the studied plant raw materials, a quantitative determination of the content of extractives was carried out, and the sounding method was applied in order to intensify the yield of extractives from the leaves of sea buckthorn. Optimal extractants have been selected that give the highest yield of extractive substances from raw materials. It has been established that by the time of mass ripening of fruits, the accumulation of biologically active substances in the leaves, extractable with alcohol 40 - 70% of the concentration is maximum. The use of an ultrasonic bath made it possible to reduce the extraction time by 1 hour (from 120 to 60 minutes) while maintaining the yield of extractive substances. The results obtained will make it possible to form the «Extractive substances» section in the draft pharmacopoeial monograph.

Keywords: sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides* L., leaves, extractives, ultrasonic extraction, phenological phases.

REFERENCES

1. Mikheev A.M., Demenko V.I. *Oblepikha*. Moskva, Rosagropromizdat, 1990, 48 p.
2. Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. Available at: <https://www.rlsnet.ru/> (accessed 23 November 2021).
3. Morozov V.I., *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2007, Vol. 41, No 8, pp. 19-21.
4. Bortnikova V.V., *Biomeditsina*, 2011, No 3, pp. 106-108.
5. Mel'nikov O.M., *Tovarnyi konsalting i audit potrebitel'skogo rynka*, 2008, pp. 128-132.
6. Mel'nikov O.M., *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2010, No 2, pp. 113-116.
7. Dharam P.A., Amrit K.S., Jyoti K., Tanveer N., *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, №2(2), pp. 108-113.
8. Arimboor R., Kumar K.S., Arumughan C., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, №47(1), pp. 31-38. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.11.045. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 19 February 2022).
9. Pop R.M., Weesepeel Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J.P., Gruppen H., *Food Chem.*, 2014, № 147, pp. 1-9. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.09.083. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 19 February 2022).
10. Bogomolova N.I., Motyleva S.M., *Sovremennoe sadovodstvo*, 2013, No 4 (8), pp. 51-57.
11. Motyleva S.M., *Selektsiya, genetika i sortovaya agrotehnika plodovykh kul'tur*, 2009, pp. 131-134.
12. Tarasov A.V., Bukharinova M.A., Khamzina E.I., *Industriya pitaniya*, 2018, Vol. 3, No 2, pp. 31-38.
13. Murzakhmetova M.K., Utegalieva R.S., Aralbaeva A.N., Lesova Zh.T., *Actualscience*, 2015, Vol. 1, No 5(5), pp. 26-28.
14. Karomatov I.D., *Biologiya i integrativnaya meditsina*, 2018, No 6(23), pp. 37-47.
15. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S.C., Sharma M., Singh S., Kumar H.T., Singh A.K., Nivsarkar M., Kaushik M.P., Sawhney R.C., Chaurasia O.P., Prasad G.B., *Indian Journal of Experimental Biology*, 2006, No 44(10), pp. 821-831.
16. Aituarova A.Sh., Zhusupova G.E., *Izvestiya nauchno-tehnicheskogo obshchestva «KAKhAK»*, 2015, No 4 (51), pp. 4-10.
17. Usha T., Middha S.K., Goyal A.K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V., *The Journal of Biomedical Research*, 2014, No 28(5), pp. 406-415. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 19 February 2022).
18. Saggi S., Divekar H.M., Gupta V., Sawhney R.C., Banerjee P.K., Kumar R., *Food Chem Toxicol*, 2007, No 45(4), pp. 609-617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 19 February 2022).
19. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XIV izdaniya. Available at: <https://femb.ru/femb/> (accessed 19 February 2022).
20. Trineeva O.V. *Kompleksnoe issledovanie soderzhaniya i spetsificheskogo profilya biologicheskii aktivnykh veshchestv plodov oblepikh krushinovidnoi, Voronezh, Izdatel'skii dom VGU*, 2016, 224 p.
21. Isachkin A.V., Zubik I.N., Potapova A.V., Ermakov M.A., *Vestnik Kurskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii*, 2019, No 2, pp. 64-69.