

УДК 615.19

СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ НАДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ КИПРЕЯ УЗКОЛИСТНОГО (*CHAMAENERION ANGUSTIFOLIUM L.*)*

© Д.И. Бояринцев**, И.В. Кузьминов, К.В. Брютова, О.А. Русакова

Тюменский государственный медицинский университет, ул. Одесская, 54,
Тюмень, 625023, Россия, bdy0710@yandex.ru

Актуальность. Сырье, полученное из надземных органов кипрея узколистного (*Ch. angustifolium*), применяется в народной медицине в качестве противовоспалительного и антимикробного средства. На сегодняшний день в Государственной фармакопее РФ отсутствует статья по данному виду. Для ее разработки необходимо провести стандартизацию сырья.

Цель – провести количественное определение БАВ кипрея узколистного в надземных органах в разные филогенетические фазы с целью стандартизации и внедрения в официальную медицину.

Методология и научные подходы. Заготовка сырья – травы кипрея проводилась согласно фармакопейным методикам. Определялись числовые показатели сырья. Дубильные вещества и витамин С устанавливались титриметрическими методами. Анализ флавоноидов проводили с использованием методов хроматографии и дифференциальной спектрофотометрии. Оценка антиоксидантной активности флавоноидов проводилась дезоксирибозным методом. Для выявления диагностических признаков проведен микроскопический анализ препаратов данного сырья.

Результаты исследования и выводы. Содержание витамина С в траве и цветках свежеобранного сырья согласуется со значениями 22.48 и 30.73 мг% соответственно. Общее содержание в траве флавоноидов – 3.45%, дубильных веществ – 11.2%; антоцианов в цветках – 0.05%. В траве кипрея обнаружен рутин, кверцетин. В цветках найден хризантемин. Сумма флавоноидов снижает скорость генерации гидроксильного радикала на 56%. По данным микроскопии в траве обнаружены рафиды как диагностический признак.

Практическая значимость. Полученные данные позволят разработать фармакопейную статью и использовать данное сырье в официальной медицине.

Ключевые слова: кипрей, флавоноиды, стандартизация, антоцианы, микроскопия.

Для цитирования: Бояринцев Д.И., Кузьминов И.В., Брютова К.В., Русакова О.А. Стандартизация сырья, полученного из надземных органов кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium L.*) // Химия растительного сырья. 2024. №3. С. 177–187. DOI: 10.14258/jcprm.20240312495.

Введение

Кипрей узколистный – многолетнее травянистое растение, распространенное на территории всего Северного полушария. Произрастает практически на всей территории России [1]. Перспективными объектами в качестве лекарственного сырья являются надземные (трава, цветки, листья) и подземные органы (корневища) растения [2, 3]. Известно, что вегетативная часть растения содержит в своем составе комплекс вторичных метаболитов: флавоноиды (рутин), дубильные вещества, полифенольные соединения, кумарины, ауруны, эфирные масла, аскорбиновая кислота. В траве и подземных органах обнаружены первичные метаболиты: полисахариды, аминокислоты, пептиды, белковые вещества и липиды. Подробно был изучен аминокислотный состав растения. В траве обнаружены все протеиногенные аминокислоты с преимущественным содержанием аспартата и глутамата. Липидный состав представлен триглицеридами, преимущественно содержащими свободные жирные кислоты с сопряженными двойными связями (линолевая, линоленовая). Установлено наличие свободных жирных кислот в стеблях и листьях растения. В подземных органах обнаружено наличие полисахаридов (инулина, крахмала), слизей и пектиновых веществ [1].

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20240312495s

** Автор, с которым следует вести переписку.

Наличие полифенольных соединений (флавоноидов, дубильных веществ, фенолокислот) обуславливает возможность использования водных извлечений в качестве наружного противовоспалительного средства в народной медицине [4–7]. Настои из травы и листьев кипрея применяются при язвенной болезни, гастрите, в гинекологической практике [1].

Однако на сегодняшний день до сих пор данное сырье не внедрено в официальную медицину [8]. Не разработана фармакопейная статья, описывающая нормативные числовые показатели для данного растения. Не рассматривается микроскопия органов и тканей с целью стандартизации кипрея. Внедрение данного вида растения в медицинскую и фармацевтическую практику является перспективным, поскольку получение галеновых и новогаленовых препаратов из данного растения, выделение и очистка БАВ из кипрея, их характеристика может быть основой для разработки новых оригинальных отечественных лекарственных средств. При этом синтез вторичных метаболитов и БАВ в растениях во многом определяется условиями их произрастания и фазой жизненного цикла растения.

Учитывая данные о химическом составе растения, основной группой действующих веществ могут быть полифенольные соединения с Р-витаминной активностью – флавоноиды. Биологическая активность данных соединений может быть обусловлена их антиоксидантной активностью, хелатирующей способностью или свойствами ферментативных эффекторов [6, 9–12]. Ранее было установлено, что в составе травы кипрея был обнаружен гликозид рутин [1], однако довольно существенный перечень терапевтических эффектов не может быть обусловлен только данным флавоноидом. Поэтому возникает необходимость проведения фракционирования суммы флавоноидов и идентификации их методами хроматографии.

Цель – провести количественное определение вторичных метаболитов кипрея узколистного в надземных органах в разные фазы жизненного цикла с целью стандартизации и внедрения в официальную медицину.

Задачи:

1. Определение концентрации аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ и антоцианов в составе сырья, собранного в разные фенологические фазы.
2. Идентификация полифенольных соединений в составе травы кипрея узколистного и оценка их антиоксидантной активности.
3. Микроскопия надземной части кипрея, выявление специфических гистологических признаков надземного сырья с целью стандартизации.

Материалы и методы исследования

Объект исследования. Высушенная трава кипрея узколистного. Сырье было собрано авторами статьи в Кунгурском районе Пермского края в 2022 году (филогенетическая фаза – фаза цветения) и в 2017 году (филогенетическая фаза – фаза плодоношения). Трава высушивалась в хорошо проветриваемом помещении, без доступа прямых солнечных лучей при температуре не выше 40 °С [8].

Определение влажности сырья. Потерю в массе при высушивании определяли в соответствии с ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья». Суть метода заключается в отборе точной навески испытуемого вещества, в нашем случае это трава кипрея узколистного, предварительно высушенной до постоянной массы и взвешенной в условиях проведения испытания бюкс без крышки. Пробу высушивали в течение 2 ч в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С. Затем открытый бюкс вместе с крышкой помещали в эксикатор для охлаждения на 50 мин, после чего закрывали крышкой и взвешивали. Последующие взвешивания проводили после каждого часа дальнейшего высушивания до достижения постоянной массы (не более 0.0005 г.).

Количественное определение витамина С. Для определения концентрации аскорбиновой кислоты в составе сырья был использован титриметрический метод, основанный на реакции окисления 2,6-дихлориндофенолята натрия [13, 14]. Точную навеску исследуемого материала листьев 4.481 г, цветов – 2.686 г, травы – 3.215 г, кипрея узколистного экстрагировали в воде в соотношении 1 : 10 при температуре 60 °С. Затем фильтровали через воронку и складчатый бумажный фильтр в отдельную колбу, фильтрат использовали для количественного определения витамина С. Для титрования отмеривали в коническую колбу 1 мл фильтрата, добавляли 4 мл 2%-ного раствора соляной кислоты и титровали из 0.001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления, не исчезающего в течение 30 сек розового окрашивания. Титрант предварительно стандартизировали методом йодатометрии.

Расчет количества аскорбиновой кислоты в пробе производили по формуле:

$$X = \frac{T \cdot A \cdot B \cdot 100}{B \cdot \Gamma},$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах; T – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте, т.е. это количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; A – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл), израсходованное на титрование, за вычетом контроля; B – количество мл вытяжки, взятое для титрования; B – общее количество вытяжки (мл); Г – количество вещества в граммах, взятое для анализа; 100 – количество граммов исследуемого материала, взятое для вычисления процентного содержания.

Количественное определение флавоноидов. Общее содержание флавоноидов определяли методом спектрофотометрии после проведения систематического анализа известных фармакопейных статей [15–18]. Точную навеску сырья (около 5.033 г) помещали в колбу объемом 100 мл, добавляли 50 мл спирта этилового 70% и кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Извлечение фильтровали в мерную колбу объемом 100 мл. Экстракцию сырья повторяли еще один раз, используя 50 мл того же экстрагента на втором этапе. Извлечения объединяли, после чего раствор в мерной колбе доводили до метки спиртом этиловым 70%. Приготовление испытуемого раствора: 1 мл извлечения помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70% (раствор Ат). 5 мл раствора Ат помещали в мерную колбу объемом 25 мл, добавляли 5 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводили до метки спиртом этиловым 70%. Для приготовления раствора сравнения 5 мл раствора Ат помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70%

Приготовление раствора СО. Навеску рутин 0.011 г помещали в мерную колбу объемом 100 мл, растворяли в 50 мл спирта этилового 70% и доводили до метки тем же растворителем (раствор Б). 1 мл раствора Б помещали в мерную колбу объемом 10 мл добавляли 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводили тем же растворителем до метки.

Раствор сравнения. 1 мл раствора рутин (раствор Б) помещали в мерную колбу объемом 10 мл и доводили тем же растворителем до метки.

Измерение оптической плотности полученных растворов проводили при аналитической длине волны 550 нм. Содержание в сырье суммы флавоноидов в пересчете на рутин, в процентах определяли по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_{cm} \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{cm} \cdot b_1 \cdot V_{cm} \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где X – содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (%); A₁ – оптическая плотность исследуемого раствора; A_{ст} – оптическая плотность раствора СО; a_{ст} – навеска СО, г; a₁ – навеска сырья, г; b₁ – аликвота испытуемого образца, взятая для разведения; V₁ – объем извлечения испытуемого образца, мл; V₂ – объем разведенного извлечения испытуемого образца, мл; V_{ст} – объем раствора СО, мл; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Определение содержания антоцианов в цветках кипрея. Поскольку антоцианы обладают способностью к поглощению в видимой области спектра, мы использовали спектрофотометрический метод для определения их концентрации [19–24]. Навеску сырья (1 г) растирали в ступке с 20 мл 1% раствором хлористоводородной кислоты. Содержимое ступки переносили в термостойкую колбу и экстрагировали при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр. В фильтрате определяли оптическую плотность раствора при длине волны 510 нм на спектрофотометре СФ-2000. Экстракт был использован для дальнейшей идентификации антоцианов. Концентрацию антоцианов определяли по формуле:

$$X = \frac{\left(D_1 \cdot -\frac{1}{3} D_2\right) \cdot V \cdot 100}{E \cdot A \cdot (100 - B)},$$

где X – суммарное содержание антоцианов, %; D₁ – оптическая плотность раствора при длине волны 510 нм; D₂ – оптическая плотность раствора при длине волны 657 нм; V – объем экстракта; E – удельный показатель поглощения цианидин-3,5-дигликозида при длине волны 510 нм в 1%-ном водном растворе соляной кислоты, равный 453; A – масса навески сырья.

Идентификация флавоноидов в траве кипрея узколистного. Траву кипрея экстрагировали 70 и 95% этанолом для выделения из них гликозидов и агликонов флавоноидов соответственно [15–17]. Для специфической экстракции антоцианов из цветков кипрея использовали 1% раствор хлористоводородной кислоты. Экстракцию проводили при условиях, указанных выше, полученные экстракты высушивали под вакуумом и получали точные навески сухих нативных экстрактов (10 мг/мл). Экстракты листьев и травы подвергали очистке при добавлении к ним избытка хлороформа (1 : 10) для удаления хлорофилла, лигнанов, липидов и прочих гидрофобных соединений. Хлороформную фазу удаляли и процедуру очистки повторяли дважды на делительной воронке. Полярную фазу высушивали и перерастворяли в воде или этаноле. Полярная фаза содержала сумму флавоноидов, поскольку в данной фракции давали положительные результаты при постановке пробы Шинода, борно-лимоннокислой реакции, реакции с 5% раствором хлорида алюминия. При добавлении к полярной фазе 5% раствора ацетата свинца образовался желтый осадок растворимый в сильных кислотах [18, 19].

Для определения групповой принадлежности флавоноидов к полярной фазе, полученной после хлороформной очистки этанольных экстрактов, проводилась дополнительная процедура жидкость-жидкостной экстракции. Полярные фракции смешивали с органическими растворителями (этилацетатом, н-гексаном, изоамиловым спиртом, диоксаном, бутанолом-1) в соотношении 1 : 1. Экстракцию проводили дважды. Растворители удаляли под вакуумом. Компоненты полученных фракций наносили на пластинку «Allufol» и хроматографировали в системе растворителей н-бутанол: уксусная кислота: вода (4 : 1 : 5). Пластинки проявляли в УФ-свете при длине волны 254 нм, а также обработкой хроматограмм 5% раствором хлорида алюминия и парами аммиака.

Идентификацию флавоноидов также проводили методом дифференциальной спектрофотометрии после экстрагирования травы 70% этанолом. Далее снимали УФ-спектр суммарного экстракта на спектрофотометре СФ-2000. Параллельно снимали спектр комплексного соединения, образующегося при добавлении к флавоноидам травы кипрея 5% раствора хлорида алюминия. Для идентификации флавоноидов снимали подобные УФ-спектры рутина и кверцетина (образцов сравнения).

Очистка и идентификация антоцианов из кипрея. Для выделения и очистки антоцианов из цветков кипрея было получено суммарное кислотное извлечение из цветков кипрея по методике, указанной выше. Суммарный экстракт вносили в концентрирующий патрон ДИАПАК С-16. Антоцианы сорбировались на патроне, а другие низкомолекулярные вещества смываются водой. Сорбированные пигменты элюировали с патрона 70% этанолом. Антоцианы концентрировали, высушивали, перерастворяли в 0.1 М HCl и снимали УФ-спектр полученной фракции.

Определение содержания дубильных веществ в траве кипрея в пересчете на танин. Около 2 г (точная навеска) измельченной травы кипрея помещали в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливали 250 мл нагретой до кипения воды и кипятили с обратным холодильником течение 30 мин при периодическом перемешивании. Полученное извлечение охлаждали до комнатной температуры и фильтровали, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. 25.0 мл полученного водного извлечения помещали в коническую колбу вместимостью 1000 мл, прибавляли 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором 0.02 М калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания. Параллельно проводили контрольный опыт: в коническую колбу вместимостью 1000 мл помещают 525 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании калия перманганата 0.02 М раствором до золотисто-желтого окрашивания. 1 мл калия перманганата раствора 0.02 М соответствовал 0.004157 г дубильных веществ в пересчете на танин. Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0.004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где V – объем калия перманганата раствора 0.02 М, израсходованного на титрование водного извлечения, мл; V_1 – объем калия перманганата раствора 0.02 М, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 0.004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл калия перманганата раствора 0.02 М (в пересчете на танин), г; a – навеска сырья или лекарственного растительного препарата, г; W – влажность лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, %; 250 – общий объем водного извлечения, мл; 25 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Экстрактивные вещества. Траву и листья кипрея узколистного экстрагировали 70% этанолом по методике, указанной выше. Цветки экстрагировали 1% раствором HCl. Экстракты высушивали и определяли массу сухих остатков.

Микроскопический анализ. Анатомическое строение различных органов иван-чая узколистного анализировали микроскопическим методом путем приготовления временных препаратов, при этом использовали микроскоп бинокулярный «Микмед-5».

Оценка антиоксидантной активности суммы флавоноидов. Антиоксидантную активность этилацетатной фракции, содержащей сумму флавоноидов, оценивали с помощью дезоксирибозного метода [25], основанного на генерации в тест-системе гидроксильного радикала (ОН^{*}). К 0.4 мл 2.8 мМ раствора дезоксирибозы добавляли 0.4 мл фосфатного буферного раствора (PBS, pH=7.4), 0.1 мл раствора сульфата железа (Fe²⁺) в растворе ЭДТА (10 мМ FeSO₄, 10 мМ ЭДТА), 0.1 мл раствора пероксида водорода (10 мМ) и 0.1 мл раствора, исследуемых флавоноидов. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 4 ч. Затем к пробе добавляли 0.05 мл 1% раствора тиобарбитуровой кислоты. В пробе протекает реакция Фентона и генерируется гидроксильный радикал, который окисляет тиобарбитурат до окрашенного продукта, количество которого оценивали с помощью спектрофотометра при длине волны 492 нм. Антиоксидантную активность халкона выражали в % по сравнению с контролем. В качестве положительного контроля использовали растворы рутина и аскорбиновой кислоты разной концентрации.

Статистическая обработка результатов. Объем выборки составлял 15 анализов в каждом из показателей (n=15). Полученные значения (случайные величины) подвергались нормальному распределению Гаусса. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова Смирнова. Для оценки достоверности полученных данных мы использовали параметрический критерий t-Стьюдента. Значимыми считали различия при уровне вероятности 95% ($\alpha=0.05$ – уровень значимости результатов; $p < 0.05$).

Обсуждение результатов

Потеря в массе при высушивании при анализе сырья кипрея узколистного составила 14%. Данный показатель был использован при расчетах количественного содержания БАВ в экстрактах. Общее содержание экстрактивных веществ в листьях составила 0.50 г; в траве – 0.45 г; в цветках – 0.30 г.

В таблице указаны результаты определения концентрации витамина С и флавоноидов, антоцианов и дубильных веществ надземных органах кипрея узколистного, собранных летом 2022 г. (свежесобранное сырье) и летом 2017 г. (несвежесобранное сырье).

Наибольшее содержание аскорбиновой кислоты обнаружено в цветках кипрея. Это может быть связано с антиоксидантным действием данного витамина и необходимостью защиты от окисления антоцианов, присутствующих в наибольшем количестве в данном сырье по сравнению с листьями.

Примечательно, что общее содержание витамина Р в траве кипрея узколистного оказалось в 1.15 раза больше, чем в фармакопейном растительном сырье, в котором главным числовым показателем является рутин или другие флавоноиды [16, 17]. При определении групповой принадлежности флавоноидов Кипрея было установлено, что в составе травы и листьев растения присутствуют производные флавонола (гликозиды и агликоны). По данным ТСХ в составе 70% этанольного извлечения были обнаружены флавоноидные гликозиды, в составе 95%-ного – гликозиды и агликоны (рис. 1). В составе 70% этанольного экстракта также был идентифицирован рутин, так как максимумы поглощения исследуемого экстракта и стандартного образца рутина соответствовали значению 360 нм. При добавлении к экстракту хлорида алюминия наблюдался bathochromный сдвиг спектра, что совпадает со значениями максимумов поглощения 420–430 нм рутина и кверцетина (рис. 2).

В составе этилацетатного извлечения травы кипрея были обнаружены флавоноидные гликозиды, совпадающие по значению R_f с рутином и кверцетином. Для дальнейшего исследования была выбрана этилацетатная фракция, полученная при очистке 95% этанольного извлечения травы кипрея, поскольку данная фракция содержала агликоны отдельно от гликозидов и являлась наиболее гомогенной. В данной фракции был идентифицирован кверцетин, однако профиль элюции по данным ВЭЖХ содержал набор пиков оптической плотности. Фракция содержала не только кверцетин, но и набор других флавоноидных соединений (рутин и другие флавоноиды). Это было подтверждено результатами качественных реакций (проба Шинода) после их проведения с элюатом, полученным после разделения данных соединений на колонке Диасорб С-

18. В составе цветков Кипрея был обнаружен цианин и другие антоцианы, которые элюировались с препаративной колонки системой растворителей муравьиная кислота : ацетонитрил : вода (10 : 10 : 90) (хроматограммы представлены в электронном приложении к статье). Этилацетатная фракция, содержащая сумму флавоноидов из травы кипрея, снижает скорость генерации гидроксильного радикала на 56% (антиоксидантная активность) (рис. 4).

При рассмотрении листа с верхней и нижней стороны видны клетки эпидермиса с извилистыми стенками и устьица аномоцитного типа (рис. 5). По краю листа и по крупным жилкам встречаются одноклеточные, тонкостенные, обычно согнутые волоски. В поверхностных препаратах с обеих сторон листа хорошо заметны на просвет многочисленные идиобласты – продолговатые клетки, содержащие слизь и пучок рафид, располагающиеся преимущественно вдоль жилок. Рафиды можно считать диагностическим признаком для кипрея узколистного, так как они встречаются практически во всех надземных органах растения.

Количественное содержание БАВ (%) в составе свежесобранной (СС) и не свежесобранной (НСС) травы, листьев, цветков и плодов в сырье кипрея узколистного (*Ch. angustifolium*)

Группа БАВ	Трава (СС)	Трава (НСС)	Листья (СС)	Листья (НСС)	Цветки	Плоды
Витамин С*	22.48	12.45	2.01	2.8	30.73	0.1
Содержание флавоноидов (в пересчете на рутин)	3.45	3.1	3.25	2.8	–	–
Антоцианы	–	–	–	–	0.05	–
Дубильные вещества	12.1	13.0	9.3	11.4	–	–
Экстрактивные вещества**	230	210	180	150	120	–

Примечание. *содержание аскорбиновой кислоты выражено в мг%; **общее содержание в мг.

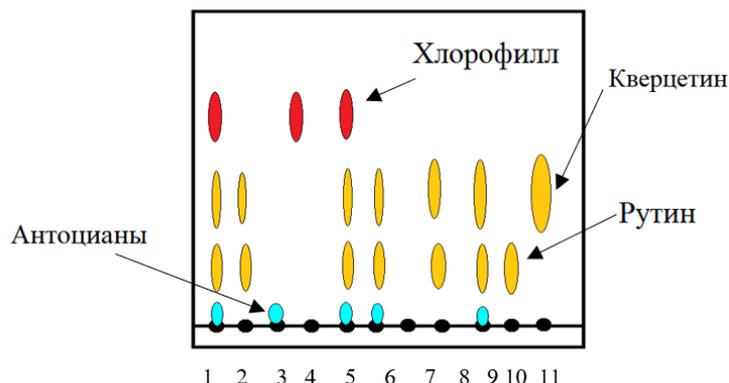


Рис. 1. Хроматографическое разделение компонентов фракций, полученных из травы кипрея узколистного (*Ch. angustifolium*) методом ТСХ. Условия хроматографирования: n-ButOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 5). Проявление: 254 нм (1 – исходный экстракт травы; 2, 3 – полярная и неполярная фаза смеси исходный экстракт : этилацетат 1 : 1; 4, 5 – полярная и неполярная фаза смеси исходный экстракт : хлороформ 1 : 1; 6, 7 – полярная и неполярная фаза смеси исходный экстракт : n-гептан 1 : 1; 8, 9 – полярная и неполярная фаза смеси исходный экстракт : диоксан 1 : 1); 10 – рутин (Rf=0.54); 11 – кверцетин (Rf=0.7)

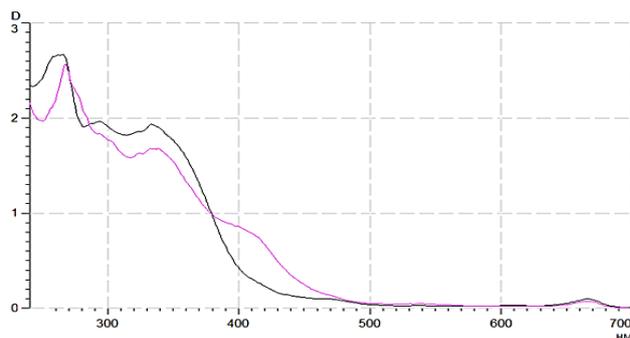


Рис. 2. УФ-спектр 70% этанольного экстракта травы *Ch. angustifolium* (черный спектр) и комплекса с 5% раствором хлорида алюминия (розовый спектр). Максимумы поглощения соответствуют длинам волн 360 и 420 нм

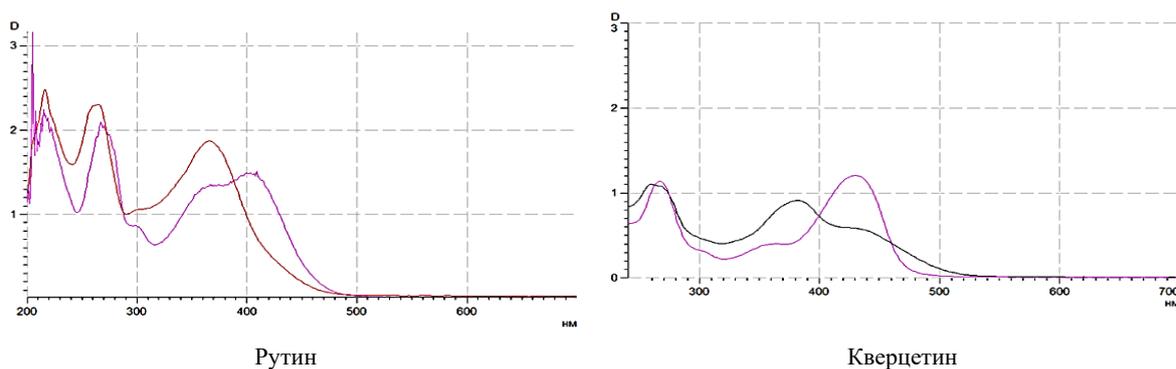


Рис. 3. УФ-спектр стандартных образцов рутина (красный спектр) и кверцетина (черный спектр) и их комплексных соединений с $AlCl_3$ (розовые спектры). Максимумы поглощения для рутина: 360 нм; кверцетина 385 нм алюминиевых комплексов 420, 430 нм

Рис. 4. Антиоксидантная активность суммы флавоноидов выделенных из травы *Ch. angustifolium*. Концентрации антиоксидантов (витамина С, рутина, танина) подбирались в соответствии с результатами, представленными в таблице

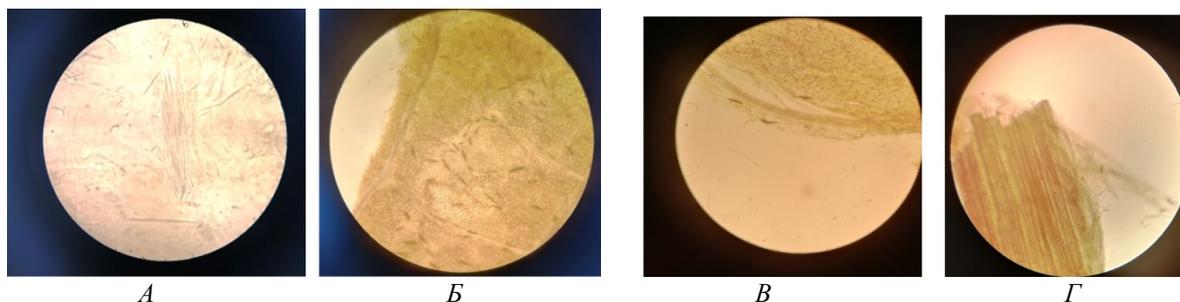
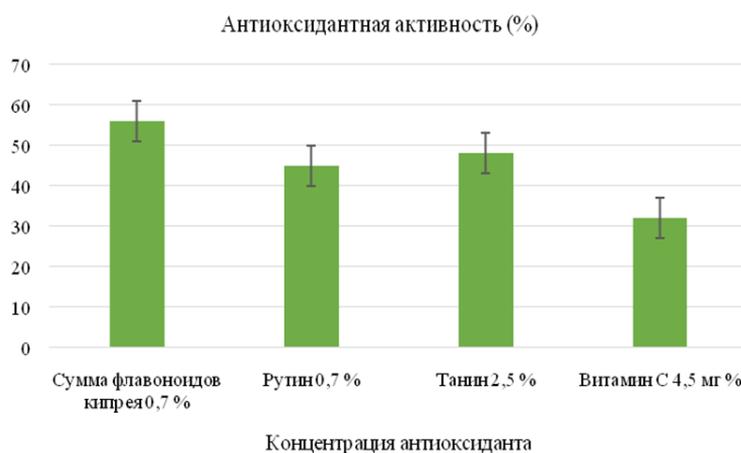


Рис. 5. Микроскопический анализ травы кипрея узколистного. А – рафи́ды в составе стебля (10×40 увеличение); Б – рафи́ды в составе листа (поверхностный препарат, увеличение 10×10); В – рафи́ды и волоски в составе чашелистика (увеличение 10×10); Г – сосуды в давленом стебле (увеличение 10×10)

При рассмотрении давленого препарата стебля видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса, на поверхности встречаются клетки с рафи́дами, механические волокна; в состав проводящих пучков входят пористые, сетчатые, лестничные и спиральные сосуды.

Числовые показатели, определенные в экстрактах травы кипрея, можно использовать для оценки качества данного сырья. В составе травы обнаружен гликозид рутин и агликон кверцетин. При этом в составе цветков выявлена сумма антоцианов (0.05%), обнаружен гликозид хризантемин (цианидин-3-глюкозид). Сумма флавоноидов, выделенная из травы кипрея, проявляет выраженную антиоксидантную активность, более существенную, чем антиоксиданты сравнения. Полученные результаты трактуются с данными представленными в научных исследованиях М.С. Антоненко [26] и Е.Ю. Олейница [27]. В данных исследованиях представлены результаты количественного определения флавоноидов в траве кипрея узколистного,

произрастающего в разных районах России. Количественное содержание флавоноидов в основном варьируется от 2.4–5.9%. Содержание дубильных веществ увеличено у сырья, собранного в 2017 году (несвежесобранное сырье в фенологической фазе плодоношения) с заметным снижением концентрации аскорбиновой кислоты и флавоноидов (в сравнении с сырьем свежесобраным 2022 года в фенологическую фазу цветения). Длительное хранение травы кипрея сопровождается перераспределением БАВ в органах и тканях растения, усилением синтеза дубильных веществ с одновременной деструкцией и окислением витамина С. Вероятно, это может быть связано с необходимостью обеспечивать защиту антоцианов и флавоноидов от окисления, так как заметно увеличено содержание витамина С в составе свежих цветков кипрея (30.73%) по сравнению с травой, где отсутствуют антоцианы. Дальнейшее исследование биологической активности компонентов экстракта травы кипрея (эффektorных свойств флавоноидов) позволит сформулировать основные направления использования данного сырья в медицинской практике и сформировать фармакопейную статью. Основной группой действующих веществ, вероятно, будут флавоноиды, поскольку данная группа БАВ зачастую обуславливает комплекс полезных эффектов при использовании растительных экстрактов в медицине и тех эффектов, которые выявлены на сегодняшний день у иван-чая. В проекте фармакопейной статьи должны быть представлены результаты микроскопических исследований. Рафиды, обнаруженные в сырье, можно расценивать как основополагающий диагностический признак. Обязательным пунктом в статье также должно быть представление методики количественного определения флавоноидов (в пересчете на рутин) как основную группу вторичных метаболитов данного сырья, так как антиоксидантные свойства наиболее выражены именно у данной группы соединений по сравнению с дубильными веществами и аскорбиновой кислотой.

Выводы

1. В составе свежесобранной травы кипрея узколистного (2022 года) содержание витамина С – 25 мг%, дубильных веществ – 12.1% и флавоноидов в пересчете на рутин 3.45%. При длительном хранении сырья происходит уменьшение содержания аскорбиновой кислоты в траве до 12.45%. Содержание дубильных веществ возрастает до 13%. В составе свежих цветков кипрея обнаружено 30.71 мг% витамина С и 0.05% антоцианов. В плодах кипрея содержание витамин С снижается до 0.1%, что свидетельствует о возможном протекторном антиокислительном действии аскорбата по отношению к антоцианам и флавоноидов.

2. В составе травы кипрея узколистного идентифицирован рутин, кверцетин, хризантемин разными хроматографическими методами. Также в составе экстрактов присутствует набор неидентифицированных флавоноидов иного строения. Основной группой действующих веществ в составе травы кипрея являются флавоноиды, поскольку компоненты этилацетатной фракции, содержащей сумму производных флавонола, подавляют процесс свободнорадикального окисления на 56%.

3. Основным диагностическим признаком для микроскопической идентификации и оценки доброкачественности травы кипрея являются внутриклеточные образования рафиды, которые можно расценивать как специфический признак.

Дополнительная информация

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprm.20240312495s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Финансирование

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Тюменского государственного медицинского университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Царёв В.Н., Базарнова Н.Г., Дубенский М.М. Кипрей узколистный (*Chamaenerion angustifolium* L.) химический состав, биологическая активность (обзор) // Химия растительного сырья. 2016. №4. С. 15–26. DOI: 10.14258/jcrpm.2016041549.
2. Володина С.О., Володин В.В., Некрасова Е.В., Сыров В.Н., Хушбактова З.А. Стресс-протекторное действие водного настоя ферментированных листьев кипрея узколистного *Chamaenerion angustifolium* (L.) // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 267–272. DOI: 10.14258/jcrpm.2020047677.
3. Бушуева Г.Р., Сыроешкин А.В., Максимова Т.В., Скальный А.В. Кипрей узколистный – перспективный источник биологически активных соединений // Микроэлементы в медицине. 2016. №17(2). С. 15–23. DOI: 10.19112/2413-6174-2016-17-2-15-23.
4. Зверев Я.Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18 (2). С. 181–194. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
5. Зверев Я.Ф. Антиромботическая активность флавоноидов // Растительные ресурсы. 2018. Т. 54(2). С. 171–189.
6. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино, 2013. 310 с.
7. Зверев Я.Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Антиоксидантная и противовоспалительная активность // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15, №4. С. 5–13. DOI: 10.17816/RCF1545-13.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд. М., 2018. URL: <https://femb.ru/record/pharmacorea14>
9. Бояринцев Д.И., Кузьминов И.В. др. Выделение флавоноидных ингибиторов ксантиноксидазы из травы горца перечного: химическая природа и механизм действия // Химия растительного сырья. 2022. №1. С. 133–140. DOI: 10.14258/jcrpm.2022019814.
10. Рыжикова М.А., Фархутдинова Р.Р., Сибирак С.В., Загудиллин Ш.З. Влияние водных извлечений из лекарственных растений на процессы свободно-радикального окисления // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. Т. 62, №2. С. 36–38.
11. Gutteridge V., Westermarck T., Halliwell B. Oxygen damage in biological systems. Free radical, Aging and Degenerative Disease. New York, 1986.
12. Matsubara K., Higaki T., Matsubara Y., Nawa A. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia // Int. J. Mol. Sci. 2015. Vol. 16 (3). Pp. 4600–4614.
13. Докучаева Е.А., Сяхович В.Э., Богданова Н.В. Общая биохимия: Витамины: практикум. Минск, 2017. 52 с.
14. ГОСТ 24556-89. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С. М., 1990. 11 с.
15. Феськова Е.В. и др. Условия экстракции и идентификации флавоноидов, стимулирующих регенерацию тканей // Труды БГТУ. Сер. 2. Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2019. №1. С. 49–53.
16. ФС.2.5.0034.15. Пустырника трава (Государственная фармакопея XIV изд. Т. 4).
17. ФС.2.5.0067.18. Горца перечного трава (Государственная фармакопея XIV изд. Т. 4).
18. Милевская В.В. и др. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71, №7. С. 768–774.
19. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991. 544 с.
20. Ханько П.Н., Брайкова А.М. Спектрофотометрическое определение содержания антоцианов в винограде // Современный механизм функционирования торгового бизнеса и туристической индустрии: реальность и перспективы: материалы III Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, г. Минск, 6–7 декабря 2018 г. Минск, 2019. С. 396–398.
21. Тьянная И.И. Разделение, концентрирование и анализ антоцианов и бетацианинов в экстрактах растительного сырья с применением оптических и хроматографических методов: дис. ... канд. хим. наук. Белгород, 2015. 147 с.
22. Wrolstad R.E. Color Analysis // Food Analysis. 2010. Vol. 32. Pp. 573–586; Andersen O.M. Anthocyanins // Encyclopedia of life sciences. MacMillan Publishers Ltd., London, 2002. Pp. 597–605.
23. He B. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace // Food Chemistry. 2016. Vol. 204. Pp. 70–76.
24. Liu X. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology // Food Chemistry. 2013. Vol. 141, no. 3. Pp. 3034–3041.
25. Мальцева Е.М., Егорова Н.О., Егорова И.Н., Мухамадияров Р.А. Антиоксидантная и антирадикальная активность in vitro экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития // Медицина в Кузбассе. 2017. Т. 16 (2). С. 32–38.
26. Антоненко М.С., Зуйкова Е.Ю., Дул В.Н., Маланкина Е.Л. Особенности накопления флавоноидов в сырье кипрея узколистного (*Epilobium angustifolium* L.) в зависимости от происхождения и морфологической группы сырья // Овощи России. 2023. №1. С. 38–43. DOI: 10.18619/2072-9146-2023-1-38-43.
27. Олейниц Е.Ю., Блинова И.П., Дейнека Л.А., Кульченко Я.Ю., Дейнека В.И., Селеменев В.Ф. Антоцианы и другие фенольные соединения напитка иван-чая и его антиоксидантная активность // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. №1. С. 7–14.

Поступила в редакцию 20 января 2023 г.

После переработки 7 февраля 2024 г.

Принята к публикации 9 февраля 2024 г.

Boyarintsev D.I.*, Kuz'minov I.V., Bryutova K.V., Rusakova O.A. STANDARDIZATION OF RAW MATERIALS OBTAINED FROM AERIAL ORGANS OF NATURAL FIRE-BROAD (*CHAMAENERION ANGUSTIFOLIUM* L.)

Tyumen State Medical University, Odesskaya st., 54, Tyumen, 625023, Russia, bdy0710@yandex.ru

Relevance. Raw materials obtained from the above-ground organs of narrow-leaved cypress (*Ch. angustifolium*) are used in folk medicine as an anti-inflammatory and antimicrobial agent. To date, there is no article on this species in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. For its development it is necessary to carry out standardization of raw materials.

The aim is to carry out quantitative determination of BAV of Cypress narrow-leaved in above-ground organs in different phylogenetic phases for the purpose of standardization and introduction into ophthalmic medicine.

Methodology and scientific approaches. Harvesting of raw materials - herbs of Cypress was carried out according to pharmacopoeial methods. Numerical parameters of raw materials were determined. Tannins and vitamin C were determined by titrimetric methods. Flavonoids were analyzed using chromatography and differential spectrophotometry methods. The antioxidant activity of flavonoids was evaluated by deoxyribose method. Microscopic analysis of preparations of these raw materials was carried out to identify diagnostic features.

Results of the study and conclusions. The content of vitamin C in the herb and flowers of freshly collected raw materials corresponds to the value of 22.48 and 30.73 mg%, respectively. The total content of flavonoids in the herb – 3.45%, tannins – 11.2%; anthocyanins in flowers – 0.05%. Rutin, quercetin were found in the herb of cypreus. Chrysanthemum was found in the flowers. The sum of flavonoids reduces the rate of hydroxyl radical generation by 56%. According to microscopy data, raphides were found in the herb as a diagnostic sign.

Practical significance. The obtained data will allow to develop a pharmacopoeial article and use this raw material in ophthalmic medicine.

Keywords: cypress, flavonoids, standardization, anthocyanins, microscopy.

For citing: Boyarintsev D.I., Kuz'minov I.V., Bryutova K.V., Rusakova O.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 3, pp. 177–187. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240312495.

References

1. Tsarov V.N., Bazarnova N.G., Dubenskiy M.M. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 4, pp. 15–26. DOI: 10.14258/jcprm.2016041549. (in Russ.).
2. Volodina S.O., Volodin V.V., Nekrasova Ye.V., Syrov V.N., Khushbaktova Z.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 267–272. DOI: 10.14258/jcprm.2020047677. (in Russ.).
3. Bushuyeva G.R., Syroyeshkin A.V., Maksimova T.V., Skal'nyy A.V. *Mikroelementy v meditsine*, 2016, no. 17(2), pp. 15–23. DOI: 10.19112/2413-6174-2016-17-2-15-23. (in Russ.).
4. Zverev Ya.F. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*, 2019, vol. 18 (2), pp. 181–194. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181–194. (in Russ.).
5. Zverev Ya.F. *Rastitel'nyye resursy*, 2018, vol. 54(2), pp. 171–189. (in Russ.).
6. Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov Ye.N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina*. [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino, 2013, 310 p. (in Russ.).
7. Zverev Ya.F. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*, 2017, vol. 15, no. 4, pp. 5–13. DOI: 10.17816/RCF1545-13. (in Russ.).
8. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii, XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed.]. Moscow, 2018. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>. (in Russ.).
9. Boyarintsev D.I., Kuz'minov I.V. dr. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2022, no. 1, pp. 133–140. DOI: 10.14258/jcprm.2022019814. (in Russ.).
10. Ryzhikova M.A., Farkhutdinova R.R., Sibiryak S.V., Zagudillin Sh.Z. *Ekspertimetal'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 1999, vol. 62, no. 2, pp. 36–38. (in Russ.).
11. Gutteridge V., Westermark T., Halliwell B. *Oxygen damage in biological systems. Free radical, Aging and Degenerative Disease*. New York, 1986.
12. Matsubara K., Higaki T., Matsubara Y., Nawa A. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16 (3), pp. 4600–4614.
13. Dokuchayeva Ye.A., Syakhovich V.E., Bogdanova N.V. *Obshchaya biokhimiya: Vitaminy: praktikum*. [General biochemistry: Vitamins: practical course]. Minsk, 2017, 52 p. (in Russ.).
14. *GOST 24556-89. Produkty pererabotki plodov i ovoshchey. Metody opredeleniya vitamina C*. [GOST 24556-89. Processed fruit and vegetable products. Methods for determination of vitamin C]. Moscow, 1990, 11 p. (in Russ.).
15. Fes'kova Ye.V. i dr. *Trudy BGTU. Ser. 2, Khimicheskiye tekhnologii, biotekhnologii, geoekologiya*, 2019, no. 1, pp. 49–53. (in Russ.).
16. *FS.2.5.0034.15. Pustyrnika trava (Gosudarstvennaya farmakopeya XIV izd. T. 4)*. [FS.2.5.0034.15. Motherwort herb (State Pharmacopoeia XIV ed. Vol. 4)]. (in Russ.).
17. *FS.2.5.0067.18. Gortsa perechnogo trava (Gosudarstvennaya farmakopeya XIV izd. T. 4)*. [FS.2.5.0067.18. Knotweed herb (State Pharmacopoeia XIV ed. Vol. 4)]. (in Russ.).
18. Milevskaya V.V. i dr. *Zhurnal analiticheskoy khimii*, 2016, vol. 71, no. 7, pp. 768–774. (in Russ.).
19. Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K. *Spravochnik biokhimiya*. [Biochemist's Handbook]. Moscow, 1991, 544 p. (in Russ.).

* Corresponding author.

20. Khan'ko P.N., Braykova A.M. *Sovremennyy mekhanizm funktsionirovaniya torgovogo biznesa i turisticheckoy industrii: real'nost' i perspektivy: materialy III Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov i molodykh uche-nykh, Minsk, 6–7 dekabrya 2018 g.* [Modern mechanism of functioning of trade business and tourism industry: reality and prospects: materials of the III International scientific and practical conference of students and young scientists, Minsk, December 6-7, 2018]. Minsk, 2019, pp. 396–398. (in Russ.).
21. Туняная И.И. *Razdeleniye, kontsentrirovaniye i analiz antotsianov i betatsianinov v ekstraktakh rastitel'no-go syr'ya s primeneniym opticheskikh i khromatograficheskikh metodov: dis. ... kand. khim. nauk.* [Separation, concentration and analysis of anthocyanins and betacyanins in plant extracts using optical and chromatographic methods: diss. ... Cand. of Chemical Sciences]. Belgorod, 2015, 147 p. (in Russ.).
22. Wrolstad R.E. *Food Analysis*, 2010, vol. 32, pp. 573–586; Andersen O.M. *Encyclopedia of life sciences*. MacMillan Publishers Ltd., London, 2002, pp. 597–605.
23. He B. *Food Chemistry*, 2016, vol. 204, pp. 70–76.
24. Liu X. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 3, pp. 3034–3041.
25. Mal'tseva Ye.M., Yegorova N.O., Yegorova I.N., Mukhamdiyarov R.A. *Meditcina v Kuzbasse*, 2017, vol. 16 (2), pp. 32–38. (in Russ.).
26. Antonenko M.S., Zuykova Ye.Yu., Dul V.N., Malankina Ye.L. *Ovoshchi Rossii*, 2023, no. 1, pp. 38–43. DOI: 10.18619/2072-9146-2023-1-38-43. (in Russ.).
27. Oleynits Ye.Yu., Blinova I.P., Deyneka L.A., Kul'chenko Ya.Yu., Deyneka V.I., Selemenev V.F. *Vestnik VGU, Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2018, no. 1, pp. 7–14. (in Russ.).

Received January 20, 2023

Revised February 7, 2024

Accepted February 9, 2024

Сведения об авторах

Бояринцев Даниэль Игоревич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией хроматографии и элементного анализа, bdy0710@yandex.ru

Кузьминов Илья Вячеславович – студент, bdy0710@yandex.ru

Брютова Ксения Владимировна – студент, bdy0710@yandex.ru

Русакова Ольга Александровна – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры химии и фармакогнозии, bdy0710@yandex.ru

Information about authors

Boyarintsev Daniel Igorevich – candidate of biological sciences, head of the laboratory of chromatography and elemental analysis, bdy0710@yandex.ru

Kuzminov Ilya Vyacheslavovich – student, bdy0710@yandex.ru

Brutova Ksenia Vladimirovna – student, bdy0710@yandex.ru

Rusakova Olga Aleksandrovna – doctor of biological sciences, professor, professor of the department of chemistry and pharmacognosy, bdy0710@yandex.ru