

УДК 615.32/.31

## ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ ОЛЬХИ ЧЕРНОЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ

© Д.В. Моисеев

*Витебский государственный медицинский университет, пр. Фрунзе, 27,  
Витебск, 210000 (Республика Беларусь), e-mail: ussr80@yandex.ru*

Изучены количественные изменения содержания эллаговой кислоты и гиперозида в листьях ольхи черной при различных условиях хранения. Представлены данные об изменении содержания биологически активных веществ в измельченном (2000 мкм) и цельном растительном сырье, хранившемся в интервале температур от 20 до 60 °С и влажности сырья от 9 до 25%. Образцы анализировались методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) через 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 и 36 месяцев хранения. Результаты данного исследования указывают на то, что присутствующие вещества растительного происхождения стабильны в условиях хранения при комнатной температуре (20 °С) и низкой влажности сырья в течение 36 месяцев. Деструкция гиперозида усиливается с повышением температуры хранения и исходной влажности растительного сырья. Содержание эллаговой кислоты увеличивается в первый год хранения в несколько раз, а затем уменьшается. Данные о кинетике деструкции изученных активных компонентов и предлагаемый метод исследования могут использоваться в фитотерапевтической промышленности с целью получения эффективных и стабильных лекарственных средств на основе растений.

*Ключевые слова:* ольха черная, стабильность, гиперозид, эллаговая кислота, ускоренное старение.

### **Введение**

В связи с устойчивым спросом в аптеках на фитопрепараты возрастает необходимость поиска новых источников биологически активных веществ и внедрения в практику отечественного здравоохранения новых видов лекарственного растительного сырья (ЛРС) и продуктов их переработки. Одним из новых видов ЛРС, вызывающим интерес своей фармакологической активностью и химическим составом, являются листья ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., сем. *Betulaceae*). В Государственную фармакопею Республики Беларусь (ГФ РБ) они внесены как лекарственное растительное сырье, обладающее противовоспалительной и антиоксидантной активностью. Методом ВЭЖХ в листьях ольхи черной было подтверждено присутствие в значительных количествах следующих фенольных соединений: эллаговая кислота (до 2,1%) и гиперозид (до 2,3%), а также хлорогеновая и кофейная кислоты, кверцетин [1–3]. Согласно ГФ РБ листья ольхи черной стандартизируются по количественному содержанию эллаговой кислоты не менее 0,5%, гиперозида – не менее 0,3% (методом ВЭЖХ) и не менее 5% суммы фенольных соединений в пересчете на эллаговую кислоту (методом спектрофотометрии) [4].

При стандартизации лекарственного растительного сырья по количественному содержанию биологически активных веществ (БАВ) в фармакопейных статьях обычно используется подход, при котором указывается не «коридор» допустимых значений, как для большинства синтетических лекарственных средств, а только нижняя граница содержания. Поэтому содержание биологически активных веществ, а следовательно, и фармакологической активности для разных серий одного и того же наименования растительного сырья может различаться в несколько раз. Еще одним важным отличием лекарственного растительного сырья от синтетических лекарственных средств является то, что при хранении деструкция биологически активных веществ (эфирные масла, алкалоиды), по которым проводится стандартизация, в течение срока

---

Моисеев Дмитрий Владимирович – заведующий кафедрой стандартизации лекарственных средств, кандидат фармацевтических наук, доцент, e-mail: ussr80@yandex.ru

годности может достигать 50%. Однако в руководящих документах Комитета по лекарственным растениям Европейского медицинского агентства

(ЕМЕА/НРМС) считается приемлемым отклонение в количественном содержании вещества, по которому проводится стандартизация, (аналитический маркер) в  $\pm 10\%$  от начальной величины в течение предполагаемого срока годности [5]. Поэтому первостепенную важность для увеличения сроков годности ЛРС приобретает упаковка, в максимальной степени обеспечивающая сохранность БАВ в растительном сырье при хранении.

Для оценки влияния внешних факторов на стабильность синтетических фармацевтических субстанций и выработки решений по упаковке в настоящее время широко используются стресс-тесты (кислотный и щелочной гидролиз, нагревание, окисление, действие катионов железа и меди, а также облучения) [6]. Для оценки стабильности синтетических лекарственных средств при хранении используются ускоренные испытания. Для стран Европейского региона согласно действующей редакции они проводятся при температуре  $40 \pm 2$  °С и влажности  $70 \pm 5\%$  в течение периода не менее 6 месяцев [6].

Методология проведения подобных испытаний и результаты оценки деструкции активных веществ в лекарственном растительном сырье, в частности для листьев левзеи сафлоровидной и листьев брусники обыкновенной, были подробно рассмотрены в наших публикациях [7, 8], а методология исследований лекарственных средств на основе растительного сырья представлена в работах З.А. Темердашева с соавт. и Н. Khalid et al. [9, 10].

Цель данной работы – оценка степени влияния деструктирующих факторов (температура и влажность) и измельченности на сохранность БАВ в листьях ольхи черной при длительном хранении в различных условиях в герметичной и негерметичной видах упаковки.

### **Экспериментальная часть**

Исследования выполняли на жидкостном хроматографе фирмы Agilent 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D. Условия хроматографирования воспроизводили в соответствии с фармакопейной статьей [4]. Перед проведением анализов сырье измельчали до размера частиц 500 мкм.

При проведении исследований использовали стандартные образцы гиперозида (кверцетин-3 $\beta$ -D-галактозида) и эллаговой кислоты (пр-во «Sigma-Aldrich»). Градуировочный график линейен при концентрациях эллаговой кислоты в диапазоне 0,24–250 мкг/мл ( $R=0,99995$ ), гиперозида 0,49–500 мкг/мл ( $R=0,99995$ ). Заготовку листьев ольхи черной проводили в окрестностях г. Витебска (Республика Беларусь) в начале июня в соответствии с рекомендациями ГАСР (Надлежащая практика сельскохозяйственного производства лекарственного растительного сырья) [11]. Исходное содержание эллаговой кислоты в листьях ольхи черной в пересчете на абсолютно сухое сырье составляло 0,9%, гиперозида – 0,7%. Листья высушивали (воздушно-сухое сырье) и измельчали до размера частиц 2000 мкм (порошкообразное) или использовали цельные. Сырье помещали в контейнеры (стеклянные флаконы), как допускающие газообмен с внешней средой, так и герметично закупоренные (резиновая пробка под обкатку). Для оценки влияния влажности на сохранность БАВ в герметично закупоренных контейнерах искусственным путем создавали влажность (потерю в массе при высушивании) для сырья около 9% (кратковременно подсушивали сырье при температуре 85 °С), около 12% (естественная влажность при воздушно-теновой сушке) и 25% (к навеске сырья с установленной влажностью добавляли рассчитанный объем воды до влажности сырья 25%, перемешивали на вортекс-шейкере и сразу закупоривали). Для оценки влияния температуры на ускорение процессов деструкции использовали метод «ускоренного старения». Суть данного метода заключается в том, что при увеличении температуры хранения на каждые 10 °С скорость химических реакций деструкции БАВ, происходящих в субстратах, увеличивается в 2–4 раза (правило Вант-Гоффа). Хранение с периодическим переконтролем осуществляли в естественных условиях ( $20 \pm 5$  °С в течение трех лет), при 40 °С (270 сут.) и при 60 °С (68 сут.), что соответствовало трем годам при условии, что при увеличении температуры хранения на каждые 10 °С скорость химических реакций увеличивается в 2 раза.

**Обсуждение результатов**

На рисунке 1 представлены хроматограммы листьев ольхи черной (измельченное сырье) в начале хранения и после хранения при повышенной температуре и влажности. Наблюдается уменьшение площади пика гиперозида (пик 1) и, соответственно, увеличение площади пика кверцетина (пик 3), что можно объяснить гидролизом. Увеличение содержания эллаговой кислоты при хранении, по всей видимости, связано с гидролизом более сложных по химической структуре фенольных соединений до эллаговой кислоты.

Результаты изменения количественного содержания БАВ в целомом и измельченном сырье при различных условиях хранения представлены в таблицах 1 (для гиперозида) и 2 (для эллаговой кислоты).

Как следует из данных таблицы 1, полученные данные изменения количественного содержания гиперозида на всем протяжении хранения для всех температурных режимов хранения и влажности хорошо коррелируются между собой. Используя данные таблицы 1, можно установить порядок и скорость реакций деструкции гиперозида в процессе хранения, а также предварительно рассчитать сроки годности лекарственного растительного сырья. Методика расчетов приведена в наших публикациях [7, 8].

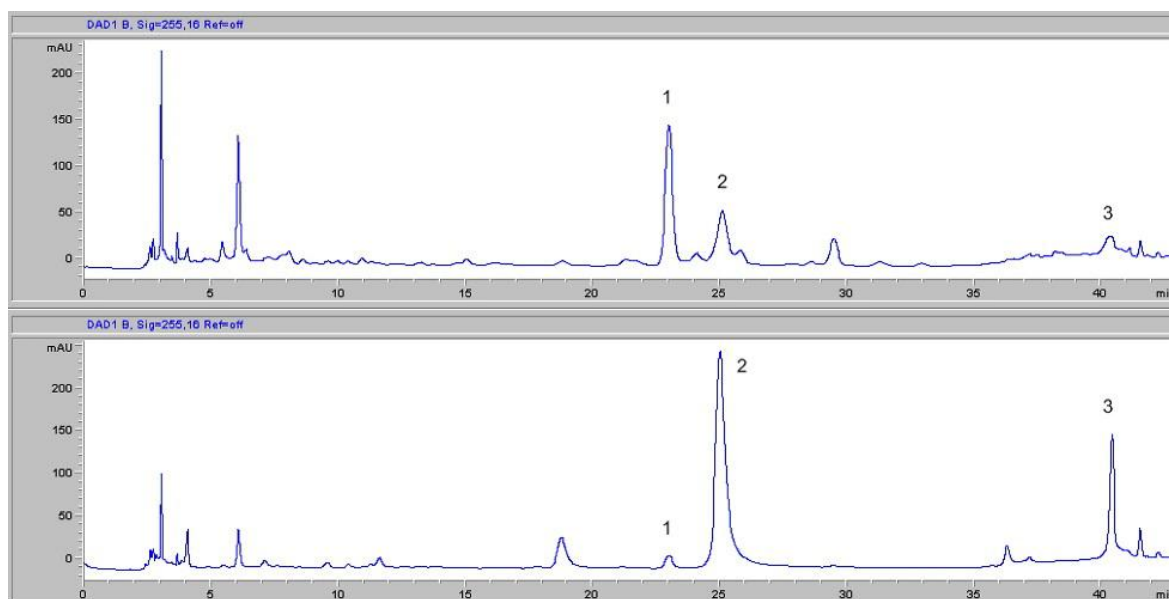


Рис. 1. Хроматограмма листьев ольхи черной до хранения (вверху) и после хранения в течение 36 месяцев при влажности 25% (внизу). Порядок выхода пиков веществ: 1 – гиперозид, 2 – эллаговая кислота, 3 – кверцетин

Таблица 1. Изменение содержания гиперозида в листьях ольхи черной в процессе хранения (по месяцам) для измельченного и цельного сырья

Месяцы	°C	0		3		6		9		12		18		24		36	
		изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел
Открытое сырье	20	100	100	99	98	96	97	95	97	95	97	94	95	93	94	92	93
	40	100	100	98	99	95	95	94	95	94	95	92	93	89	92	87	91
	60	100	100	97	97	93	95	92	94	91	94	86	92	84	90	83	89
Минимальная влажность (9%)	20	100	100	98	99	97	99	97	98	97	98	97	97	95	96	94	95
	40	100	100	98	98	96	97	95	97	94	96	92	95	90	95	88	92
	60	100	100	88	93	85	90	82	86	80	83	75	80	72	78	68	78
Средняя влажность (12%)	20	100	100	99	99	98	98	96	97	96	96	95	95	93	94	91	93
	40	100	100	97	98	96	98	94	96	94	95	93	93	89	91	86	90
	60	100	100	83	93	73	87	68	81	63	76	56	66	51	58	42	54
Высокая влажность (25%)	20	100	100	60	50	59	44	55	40	49	34	41	22	37	13	27	9
	40	100	100	60	70	51	53	43	41	37	33	30	31	13	18	12	13
	60	100	100	53	63	37	53	28	46	20	39	15	23	12	18	6,5	11

Примечания: изм – измельченное сырье, цел – цельное сырье.

Таблица 2. Изменение содержания эллаговой кислоты в листьях ольхи черной в процессе хранения (по месяцам) для измельченного и цельного сырья

Месяцы	°С	0		3		6		9		12		18		24		36	
		изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел	изм	цел
Открытое сырье	20	100	100	113	106	123	114	139	149	170	173	139	132	124	117	121	110
	40	100	100	216	233	235	288	211	266	185	223	137	179	128	134	116	107
	60	100	100	124	139	161	295	198	273	222	265	246	233	226	232	205	221
Минимальная влажность (9%)	20	100	100	119	100	129	114	144	145	168	171	132	98	122	95	115	93
	40	100	100	210	211	234	200	182	165	165	121	150	95	147	95	134	90
	60	100	100	234	140	309	237	387	234	458	231	444	230	437	227	415	220
Средняя влажность (12%)	20	100	100	130	151	165	175	173	179	188	188	184	216	178	179	170	173
	40	100	100	227	232	257	220	209	217	163	208	159	196	148	174	145	169
	60	100	100	345	134	393	414	428	473	495	546	525	534	512	514	501	517
Высокая влажность (25%)	20	100	100	346	448	379	549	386	573	403	586	469	565	411	507	374	443
	40	100	100	399	419	444	563	467	594	482	626	536	602	506	577	465	513
	60	100	100	423	486	453	577	511	613	595	646	629	637	613	621	580	596

Примечания: изм – измельченное сырье, цел – цельное сырье.

Через три года хранения в естественных условиях, как в открытых, так и в герметичных упаковках, количественное содержание гиперозида колеблется в пределах  $\pm 10\%$  от исходного содержания (рис. 2). По изменению количественного содержания гиперозида как маркерного компонента данное сырье соответствует рекомендациям Комитета по лекарственным растениям Европейского медицинского агентства [5] и требованиям фармакопейной статьи [4].

Интересно отметить, что содержание эллаговой кислоты в листьях ольхи черной вне зависимости от измельченности сырья, влажности и условий хранения в начальном периоде хранения во всех случаях увеличивается, а затем снижается (рис. 3). Данный факт, по всей видимости, можно объяснить следующим: в начальном периоде хранения процессы деструкции более сложных компонентов до эллаговой кислоты преобладают над собственной деструкцией эллаговой кислоты. Данный процесс заканчивается через 9–12 месяцев хранения, и в дальнейшем деструктируется только эллаговая кислота.

На примере изменения содержания эллаговой кислоты можно убедиться в несовершенстве рекомендаций ЕМЕА/НМРС к изменению содержания маркерных соединений в лекарственном растительном сырье при хранении [5]. При этом изученное сырье на всем протяжении срока годности соответствует требованиям фармакопейной статьи [4].

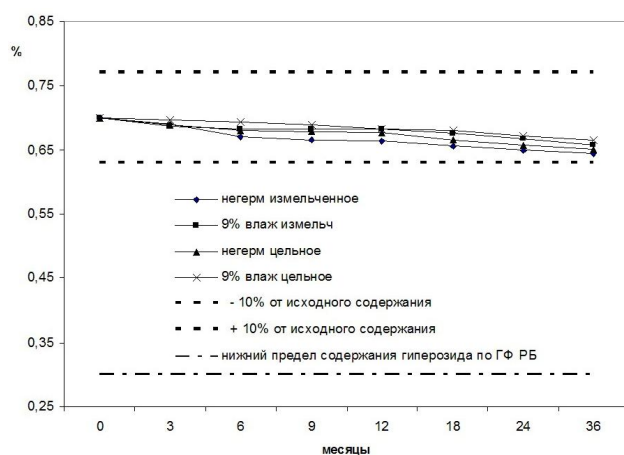


Рис. 2. Изменение содержания гиперозида для цельного и измельченного сырья при хранении в естественных условиях в герметичной и негерметичной упаковке (представлен коридор значений  $\pm 10\%$  и нижний предел содержания)

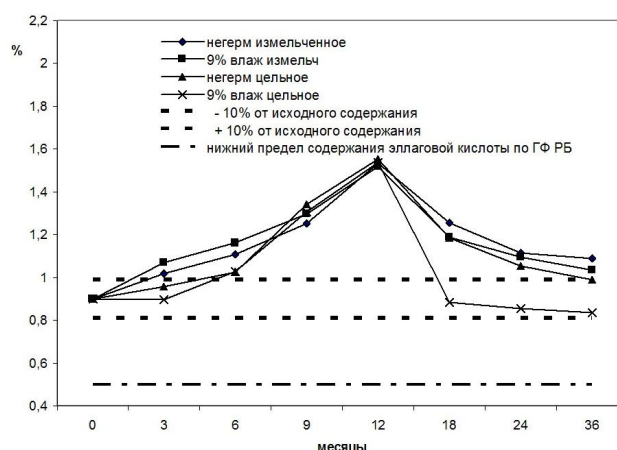


Рис. 3. Изменение содержания эллаговой кислоты для цельного и измельченного сырья при хранении в естественных условиях в герметичной и негерметичной упаковке (представлен коридор значений  $\pm 10\%$  и нижний предел содержания)

### Выводы

Установлено, что в зависимости от условий хранения содержание гиперозида в листьях ольхи черной может снижаться до 10 раз. Основным деструктирующим фактором является исходная влажность сырья (при хранении в герметичной упаковке). Данный процесс происходит примерно с одинаковой скоростью как в измельченном, так и в цельном сырье. Содержание эллаговой кислоты вне зависимости от температуры хранения и влажности увеличивается к 9–12 месяцам хранения (в аналогичные периоды в пересчете по правилу Вант-Гоффа для 40 и 60 °С), а затем снижается. Одним из основных факторов, влияющих на ее содержание, является исходная влажность сырья. Поэтому логично предположить, что накопление эллаговой кислоты происходит за счет гидролиза более сложных структурных соединений. Содержание эллаговой кислоты при влажности 25% и хранении при 40 и 60 °С увеличивается в 5–6 раз и составляет до 6% в пересчете на абсолютно сухое сырье. Следовательно, гидролиз при повышенной температуре можно рассматривать как перспективный путь для получения эллаговой кислоты из растительного сырья.

Учитывая то, что процессы и направления деструкции БАВ в листьях ольхи черной коррелируются для всех температур хранения, можно использовать метод «ускоренного старения» для данного сырья с целью обоснования выбора упаковочных материалов и подтверждения стабильности при хранении.

### Список литературы

1. Моисеев Д.В., Шелюто В.Л., Бузук Г.Н. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. 2011. №1. С. 35–38.
2. Моисеев Д.В. Определение фенольных кислот в растениях методом ВЭЖХ // Химия растительного сырья. 2014. №3. С. 171–174.
3. Моисеев Д.В., Мушкина О.В. Влияние сроков заготовки и условий первичной переработки на содержание фенольных соединений в листьях ольхи серой и ольхи черной // Рецепт. 2012. №2. С. 39–46.
4. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2: Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / Центр экспертиз и испытания в здравоохранении / под общ. ред. А.А. Шерякова. Молодечно, 2008. 472 с.
5. Guideline on quality of herbal medicinal products/ traditional herbal medicinal products EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2. London, September. 2011. 13 p.
6. Stability testing of new drug substances and products EMA/CPMP/ICH/2736/99 Q1A(R2). London, February. 2003. 18 p.
7. Моисеев Д.В. Новый метод определения сроков годности лекарственного растительного сырья (листья *Rhaponticum Carthamoides*) на основе стресс-теста «ускоренное старение» // Рецепт. 2012. №2. С. 47–54.
8. Моисеев Д.В. Кинетика реакции деструкции арбутина в листьях брусники обыкновенной при хранении в естественных и стрессовых условиях // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2013. №2. С. 106–111.
9. Khalid H. Accelerated Stability and Chemical Kinetics of Ethanol Extracts of Fruit of *Piper sarmentosum* Using High Performance Liquid Chromatography // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2011. Vol. 10, N3. Pp. 403–413.
10. Темердашев З.А., Фролова Н.А., Цюпко Т.Г., Чупрынина Д.А. Оценка стабильности фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растений в процессе их хранения // Химия растительного сырья. 2011. №4. С. 193–198.
11. Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin EMEA/HMPC/246816. London, February. 2006. 11 p.

Поступило в редакцию 3 мая 2015 г.

*Moiseev D.V. CHANGES IN THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THE ALDER BLACK LEAVES UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS FACTORS*

*Vitebsk State Medical University, Frunze Avenue, 27, Vitebsk, 210023 (Republic of Belarus), e-mail: ussr80@yandex.ru*

The quantitative content of ellagic acid and hyperoside in the leaves of Black alder under various conditions of storage were studied. Data about maintenance change of active components in powdered (2000 microns) and leaves of Black alder which were stored at interval of temperature from 20 to 60 °C and humidity of herbal substances from 9 to 25%. The samples were analyzed at 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 and 36 months by high performance liquid chromatography (HPLC). Results of this study indicate that herbal substances are stable at room temperature (20 °C) and low humidity for 36 months. Destructions hyperoside are amplified with increase in temperature of storage and humidity of herbal substances. The maintenance of ellagic acid increases in the first year of storage in several times, and then decreases. The chemical kinetic data of the changes in the content analytical markers used to quantify the markers may be useful for phytopharmaceutical industry to produce efficacious and stable the herbal substances and the medicinal preparations.

*Keywords:* Black alder, stability, hyperoside, ellagic acid, accelerated tests.

**References**

1. Moiseev D.V., Sheliuto V.L., Buzuk G.N. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2011, no. 1, pp. 35–38. (in Russ.).
2. Moiseev D.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2014, no. 3, pp. 171–174. (in Russ.).
3. Moiseev D.V., Mushkina O.V. *Retsept*, 2012, no. 2, pp. 39–46. (in Russ.).
4. *Gosudarstvennaia farmakopeia Respubliki Belarus'. T. 2. Kontrol' kachestva vspomogatel'nykh veshchestv i lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ia*. [The State pharmacopoeia of the Republic of Belarus. Vol. 2. Quality control auxiliaries and le medicament vegetable raw materials.]. Ed. A.A. Sheriakov. Molodechno, 2008, 472 p. (in Russ.).
5. Guideline on quality of herbal medicinal products/ traditional herbal medicinal products EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2. London, September. 2011. 13 p.
6. Stability testing of new drug substances and products EMA/CPMP/ICH/2736/99 Q1A(R2). London, February. 2003. 18 p.
7. Moiseev D.V. *Retsept*, 2012, no. 2, pp. 47–54. (in Russ.).
8. Moiseev D.V. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. [Kursk scientific-practical herald «Man and his health»]. 2013, no. 2, pp. 106–111. (in Russ.).
9. Khalid H. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 403–413.
10. Temerdashev Z.A., Frolova N.A., Tsiupko T.G., Chuprynina D.A. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2011, no. 4, pp. 193–198. (in Russ.).
11. Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin EMEA/HMPC/246816. London, February. 2006. 11 p.

*Received May 3, 2015*

*Revised May 28, 2015*