

УДК 615.322:547.586.2

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ И АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ИХ НАКОПЛЕНИЯ В ЛИСТЬЯХ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ

Н.В. Нестерова*, И.А. Самылина, Н.В. Бобкова, А.Н. Кузьменко,
И.И. Краснюк (мл.), А.А. Евграфов

(ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России;

*e-mail: nestero-nadezhda@yandex.ru)

С использованием ВЭЖХ-анализа установлено наличие гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной (*Malus sylvestris* Mill.) и яблони домашней (*Malus domestica* Borkh.). Количественное определение гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную осуществляли методом спектрофотометрического анализа. Установлено, что максимальное количество гидроксикоричных кислот накапливается в растении в фазу плодоношения.

Ключевые слова: яблоня лесная, гидроксикоричные кислоты, ВЭЖХ, спектрофотометрия.

Яблоня лесная (*Malus sylvestris* Mill.) – древесное растение, относящееся к роду *Malus* семейства Розоцветные (Rosaceae), широко распространенное в европейской части РФ. Встречается в подлеске широколиственных и смешанных лесов, среди кустарников, по опушкам, полянам [1]. Листья и плоды яблони лесной издавна использовались в медицине разных народов. В трактате «О медицине» римского врача-энциклопедиста Авла Корнелия Цельса более сорока раз упоминаются яблоки, используемые для лечения различных заболеваний желудочно-кишечного тракта, в гинекологической практике, для лечения лихорадки [2]. Гиппократ широко практиковал назначение яблочной диеты, что, по его мнению, само по себе способствовало оздоровлению организма. Плоды и листья яблони использовали для лечения различных воспалений Гален и Диоскорид. Характеристике сырья яблони посвящен отдельный раздел «Канона врачебной науки» Абу Али Ибн Сины – «Туффах» (Яблоки) [3], в котором приводится характеристика различных сортов яблок, а также способы их применения. По мнению автора, «...листья яблони и выжатый сок яблок полезны в начале образования горячих опухолей, заживляют раны и язвы... укрепляют сердце, помогают, если больной угнетен от жара» [3]. В традиции врачевания народов России был популярен взвар из лесных яблок, которым лечили различные лихорадки. В более поздний период сырье яблони вошло во многие Европейские Фармакопеи, в том числе Российские. Так, в Российских Фармакопеях с первого по восьмое издания присутствуют статьи «Fructus Mali Recentis» и «Extractum Martis Pomatum s. Malatis Ferri». Од-

нако впоследствии данный вид сырья был незаслуженно забыт и на сегодняшний день не является официальным. В последнее время плоды и листья яблони лесной и домашней вновь стали привлекать внимание исследователей, что обусловлено наличием в них широкого спектра биологически активных веществ различных групп, а также разнообразным фармакологическим действием. Установлено наличие в сырье яблони антиоксидантов, способных противостоять окислительному стрессу, который, как известно, имеет ключевое значение в патогенезе старения [4, 5]. С использованием хроматографических методов в плодах и листьях яблони домашней установлено наличие гидроксикоричных кислот, флавоноидов, сапонинов [6, 7]. При этом анализ сырья яблони лесной, образующей в РФ значительные промысловые массивы, не проводился. Все вышеизложенное свидетельствует о том, что изучение сырья яблони лесной является перспективной и актуальной проблемой, решение которой позволит расширить ассортимент отечественного лекарственного растительного сырья.

Цель работы – изучение состава и количественное определение гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной в различные фазы вегетации.

Материалы и методы исследования

Объектом нашего исследования стали листья яблони лесной от дикорастущих популяций, произрастающих в подлеске смешанного леса Чеховского и Истринского районов Подмосковья, заготовленные в фазу цветения, плодоношения и в осенний период опадания плодов (сентябрь

2017 г.), а также листья яблони домашней позднеспелых сортов, наиболее широко культивируемых в РФ.

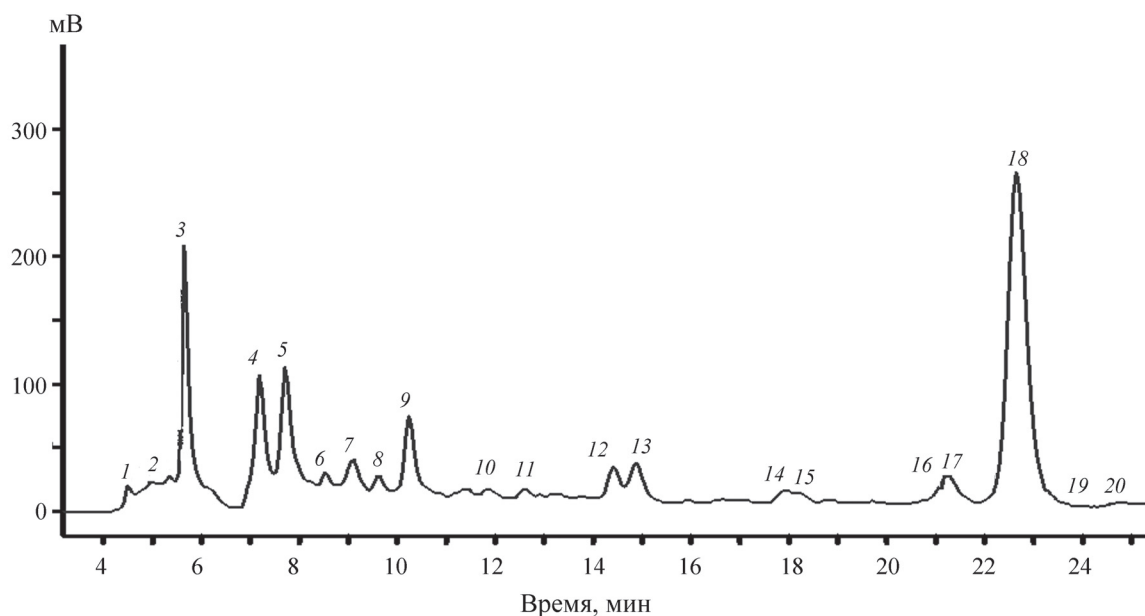
Все использованные в исследовании реактивы имели степень чистоты «ч.д.а.». Качественный состав биологически активных веществ изучали, используя извлечения из листьев яблони, полученные экстракцией 70%-м этиловым спиртом, на высокоэффективном жидкостном хроматографе «GILSON», модель 305 (Франция). Использовали ручной инжектор (модель «RHEODYNE 7125 USA») с последующей компьютерной обработкой резуль-

татов исследования с помощью программы Мультихром для Windows. В качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку Kromasil C18 размером 4,6×250 мм, размер частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила, воды и концентрированной фосфорной кислоты в соотношении 20:80:0,05. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента составляла 1,0 мл/мин. Продолжительность анализа от 40 до 60 мин. Для детектирования использовали УФ-детектор «GILSON UV/VIS» модель 151 при длине волны 370 нм.

Т а б л и ц а 1

Результаты исследования фенольных соединений в сухом и свежем сырье – листья яблони лесной, методом ВЭЖХ

Время, мин	Площадь	Площадь	Название
4,464	86,71	0,12	кофейная кислота
4,945	52,11	0,07	не идентифицирован
5,317	64,34	0,09	галловая кислота
5,624	2088,28	2,90	цикориевая кислота
7,161	1741,89	2,42	катехин
7,695	2093,01	2,91	эпикатехин
8,507	331,60	0,46	хлорогеновая кислота
9,063	582,90	0,81	виценин
9,594	152,45	0,21	неохлорогеновая кислота
10,22	908,78	1,26	рутин
11,84	87,84	0,12	кумарин
12,56	94,00	0,13	ЭГКГ
14,4	438,15	0,61	не идентифицирован
14,86	588,03	0,82	не идентифицирован
17,9	217,32	0,30	кверцетин
18,14	90,67	0,13	флоретин
21,1	186,74	0,26	не идентифицирован
21,22	262,50	0,36	флоридзин
21,32	205,58	0,29	не идентифицирован
21,95	2,27	0,00	не идентифицирован
22,63	7422,06	10,31	не идентифицирован
23,65	19,94	0,03	коричная кислота
23,86	14,28	0,02	не идентифицирован
24,07	2,96	0,00	не идентифицирован
24,49	6,54	0,01	апигенин
24,58	12,90	0,02	не идентифицирован
27,67	0,00	0,00	не идентифицирован
28,74	25,73	0,04	не идентифицирован
37,49	54243,52	75,31	не идентифицирован



Хроматограмма спиртового извлечения из листьев яблони лесной методом ВЭЖХ: 1 – кофейная кислота; 3 – галловая кислота; 4 – цикориевая кислота; 5 – катехин; 6 – эпикатехин; 7 – хлорогеновая кислота; 8 – Виценин; 9 – неохлорогеновая кислота; 10 – рутин; 11 – кумарин; 12 – ЭГКГ; 13 – кверцетин; 14 – флоретин; 15 – флоридзин; 16 – флоретин; 17 – флоридзин; 18 – флоридзин; 19, 20 – неидентифицированы

Определение количественного содержания гидрооксикоричных кислот в листьях яблони лесной осуществляли методом спектрофотометрии в пересчете на кислоту кофейную (3,4-дихлорокоричная кислота, 3-(3,4-дигидрофенил)-2-пропеновая кислота). Предварительно измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, сырье массой 2 г (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 200 мл и приливали 70 мл дистиллированной воды. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 15 мин. Экстракцию осуществляли повторно. Полученные экстракты охлаждали при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр. Извлечения количественно переносили в мерную колбу емкостью 200 мл и доводили объем раствора дистиллированной водой

до метки. Затем в мерную колбу емкостью 50 мл переносили 1 мл полученного ранее экстракта и доводили объем раствора до метки с использованием 20%-го этилового спирта. Измерение оптической плотности полученного раствора проводили при длине волны 325 нм, поскольку данное значение является аналитическим для кислоты кофейной. В качестве раствора сравнения использовали 20%-й этиловый спирт.

Содержание суммы гидрооксикоричных кислот (X , %) в листьях яблони лесной в пересчете на кислоту кофейную вычисляли по формуле

$$X = \frac{A_x \times 200 \times 50 \times 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \times V_a \times (100 - W)},$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения

Таблица 2

Результаты количественного определения гидрооксикоричных кислот в листьях яблони в пересчете на кислоту кофейную в период цветения

Номер образца	Исследуемый объект	Содержание гидрооксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	листья яблони лесной, заготовленные в Истринском р-не Московской обл.	1,881±0,96
2	листья яблони лесной, заготовленные в Чеховском р-не Московской обл.	2,340±0,74
3	листья яблони домашней сорта Антоновка	1,794±0,92
4	листья яблони домашней сорта Ренет Симиренко	1,657±0,72

кислоты кофейной при 325 нм, составляющий 782; m – масса навески измельченных листьев яблони лесной; V_a – объем аликвоты, мл; W – влажность, %.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли в соответствии с требованиями ОФС 42-0111-09 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Валидация методики количественной оценки гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной проводили в соответствии с рекомендациями [8, 9] по следующим показателям: правильность, прецизионность, специфичность, линейность, аналитическая область (диапазон применения).

Результаты и обсуждение

Хроматографический анализ этанольного извлечения из листьев яблони лесной, заготовленных в различные фазы вегетации, показал идентичность биологически активных веществ, состав которых представлен в табл. 1 и на рисунке.

Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в листьях яблони в пересчете на кислоту кофейную в период плодоношения, гидроксикоричных кислот в листьях яблони в пересчете на кислоту кофейную в осенний период

опадания и сбора плодов (в случае яблони домашней), а также метрологические характеристики методики количественного определения гидроксикоричных кислот в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной представлены в табл. 2–4. Результаты статистической обработки данных пяти параллельных измерений количественного содержания гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной в пересчете на кофейную кислоту представлены в табл. 5. Для листьев яблони сортов Антоновка обыкновенная и Ренет Симиренко количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной в пересчете на кофейную кислоту колебалось от $1,8706 \pm 0,84$ до $1,1250 \pm 0,79$.

Таким образом, на основании анализа данных ВЭЖХ-анализа фенольных производных установлено наличие класса гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной и домашней. Методом спектрофотометрического анализа установлено содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту в зависимости от фазы вегетации. Установлено, что максимальное количество гидроксикоричных кислот накапливается в растении в фазу плодоношения.

Таблица 3

Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в листьях яблони в пересчете на кислоту кофейную в осенний период опадания и сбора плодов (в случае яблони домашней)

Номер образца	Исследуемый объект	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	листья яблони лесной, заготовленные в Истринском р-не Московской обл.	1,3182±0,95
2	листья яблони лесной, заготовленные в Чеховском р-не Московской обл.	1,4050±0,81
3	листья яблони домашней сорта Антоновка	1,2430±0,97
4	листья яблони домашней сорта Ренет Симиренко	1,1250±0,79

Таблица 4

Метрологические характеристики методики количественного определения гидроксикоричных кислот в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной, заготовленных в Истринском районе Подмосковья

n	f	$X_{cp.}$	S^2	S_x	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X_{cp.}$	$\epsilon_{cp.}, \%$
фаза цветения								
5	4	1,881	0,0002115	0,00145	95	2,78	0,01808	0,96
фаза плодоношения								
5	4	1,9644	0,0002072	0,0144	95	2,78	0,017896	0,91
фаза опадания плодов								
5	4	1,6182	0,0001535	0,01238	95	2,78	0,015400	0,95

Обозначения: f – число степеней свободы, $X_{cp.}$ – среднее значение выборки, S^2 – дисперсия, S_x – стандартное отклонение, $P, \%$ – вероятность, $\Delta X_{cp.}$ – полуширина доверительного интервала, $t(P, t)$ – критерий Стьюдента, ϵ – относительная ошибка.

Количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной в пересчете на кофейную кислоту

Район сбора плодов	Период		
	цветения	плодоношения	опадания плодов
Истринский	1,881±0,96	1,9644±0,91	1,3182±0,95
Чеховский	2,340±0,74	2,7480±0,75	1,4050±0,81

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб; М., 2009. С. 205.
2. Цельс Авл Корнелий. О медицине. Соч. 21–25 гг. н.э. М., 1959. С. 512.
3. Абу Али Ибн Сина. Канон врачебной науки. Кн. 2. 1972. Ташкент, С. 619.
4. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis R., Kviklis D., Uselis N., Janulis V. // The Scientific World Journal . 2014. Vol. 76. N 2. P. 155.
5. Leontowicz M., Gorinstein S., Leontowicz H. // J. Agric. FoodChem. 2003. N 51. P. 5780.
6. Petkovsek M., Slatnar A., Stampar F., Veberic R. // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2010. Vol. 90. N 14. P. 2366.
7. Gosch C., Halbwirth H., Kuhn J., Miosic S. // Plant Science. 2009. Vol. 176. N 2 P. 223.
8. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1. Основные положения и определения. М., 2002. С. 124.
9. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2 // Фармация. 2008. № 4. С. 3.

Поступила в редакцию 15.02.18
После доработки 05.04.18
Принята к публикации 05.09.18

QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROXYCORIC ACIDS AND THE ANALYSIS OF THE DYNAMICS OF THEIR ACCUMULATION IN THE LEAVES OF THE MALUS SYLVESTRIS

N.V. Nesterova*, I.A. Samylina, N.V. Bobkova, A.N. Kuzmenko, I.I. Krasnyuk (Jr), A.A. Evgrafov

*(I.M. Sechenov First Moscow State Medicine University;
e-mail: nesteronadezhda@yandex.ru)

Using HPLC analysis, the presence of hydroxycinnamic acids in the leaves of *Malus sylvestris* Mill. and *Malus domestica* Borkh. Was established. The quantitative determination of hydroxycinnamic acids was carried out by spectrophotometric analysis. It was found that the maximum amount of hydroxycinnamic acids accumulates in the plant during the fruiting phase.

Key words: *Malus sylvestris* Mill., hydroxycinnamic acids, HPLC, spectrophotometry.

Сведения об авторах: *Нестерова Надежда Викторовна* – аспирант кафедры фармацевтического естествознания ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (nesteronadezhda@yandex.ru); *Самылина Ирина Александровна* – профессор ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук, чл.-корр. РАН (laznata@mail.ru); *Бобкова Наталья Владимировна* – доцент ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (bobkovamta@mail.ru); *Кузьменко Алексей Николаевич* – профессор ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (kuzmenko.mta@mail.ru); *Краснюк Иван Иванович (мл.)* – зав. кафедрой аналитической, физической и коллоидной химии ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (krasnyuk.79@mail.ru); *Евграфов Александр Александрович* – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. фарм. наук (afkx_farm@mail.ru).