

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ ТОПОЛЯ ЧЕРНОГО

Е.А. Куприянова, В.А. Куркин

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

Для цитирования: Куприянова Е.А., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации листьев тополя черного // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 5–6. – С. 17–21. doi: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.17-21

Поступила в редакцию: 27.07.2018

Принята к печати: 10.09.2018

▪ Работа посвящена вопросам фитохимического изучения листьев тополя черного (*Populus nigra* L.) в качестве перспективного вида сырья, содержащего флавоноиды. В результате исследования были определены оптимальные условия экстракции флавоноидов в листьях тополя черного: экстрагент — 70 % этиловый спирт; соотношение «сырье – экстрагент» — 1 : 30; время экстракции — 60 мин. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием государственного стандартного образца рутина при длине волны 414 нм. Содержание суммы флавоноидов для листьев тополя черного варьирует от 2,04 до 2,99 %. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95 % составляет ±3,21 %.

▪ **Ключевые слова:** тополь черный; *Populus nigra* L.; листья; флавоноиды; рутин; стандартизация; спектрофотометрия.

THE DEVELOPMENT OF APPROACHES TO STANDARDIZATION OF THE *POPULUS NIGRA* LEAVES

E.A. Kupriyanova, V.A. Kurkin

Samara State Medical University

For citation: Kupriyanova EA, Kurkin VA. The development of approaches to standardization of the *Populus nigra* leaves. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhya*. 2018;(5-6):17-21. doi: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.17-21

Received: 27.07.2018

Accepted: 10.09.2018

▪ The article studies the problems of phytochemical research of *Populus nigra* L. leaves, which are considered perspective raw material containing flavonoids. The investigation resulted in the determination of the optimal conditions for the extraction of flavonoids in the leaves of *Populus nigra*: 70% ethyl alcohol as extragent; ratio between raw material and extragent is 1 : 30; extraction time equals 60 min. The method of quantitative determination of the total flavonoids in the leaves of *Populus nigra* by differential spectrophotometry using the state standard sample of rutin at a wave length of 414 nm was developed. The content of the total flavonoids for *Populus nigra* leaves varies from 2.04% to 2.99%. The error of a single determination with a 95% confidence probability is 3.21%.

▪ **Keywords:** *Populus nigra* L.; leaves; flavonoids; rutin; standardization; spectrophotometry.

Введение

Тополь черный (*Populus nigra* L.) является одним из фармакопейных видов растений, включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания: в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) зарегистрированы почки (ФС.2.5.0042.15) [2]. Препараты на основе почек тополя обладают широким спектром фармакологической активности: противогрибковым, антисептическим, ранозаживляющим и противовоспалительным действием [1, 3–5].

На наш взгляд, не менее интересными с точки зрения источника биологически активных соединений (БАС) являются и другие части растения, в том числе листья тополя черного. Известен опыт народного применения листьев тополя в качестве средства, обладающего противовоспалительными и антибактериальными свойствами, однако в настоящее время степень изученности химического состава данного вида сырья является недостаточной.

С целью введения листьев тополя черного в Государственную фармакопею Российской

Федерации необходимо проведение комплекса фармакогностических исследований, включая разработку нормативной документации, подтверждающей качество ЛРС [7].

Цель настоящего исследования — разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного.

В задачи исследования входило:

- разработка методики количественного анализа суммы флавоноидов в листьях тополя черного;
- определение содержания суммы флавоноидов для изучаемого вида сырья;
- определение нижнего предела содержания действующих веществ для листьев тополя черного.

Результаты и их обсуждение

Тополь черный — *Populus nigra* L., быстро растущее, широко распространенное растение на территории Российской Федерации [5].

Особый интерес наряду с фармакопейным сырьем — почками представляют листья данного растения. Так, в листьях тополя черного содержатся фенольные соединения, витамины, органические кислоты, дубильные вещества [6].

Объектом исследования служили листья тополя черного, заготовленные в июне и сентябре 2012–2018 гг. в п. Алексеевка и с. Гаврилова Поляна Самарской области.

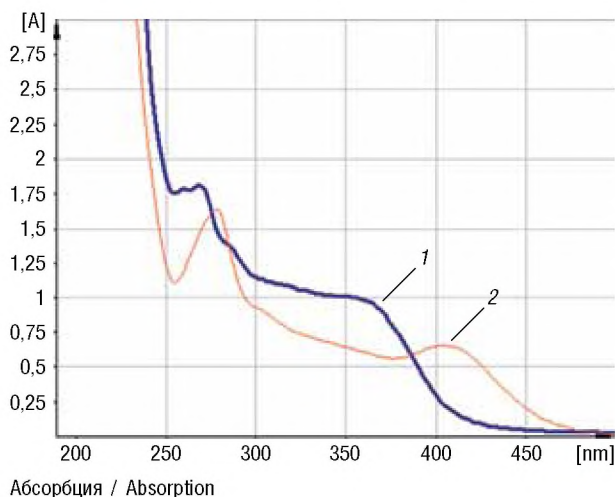


Рис. 1. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из листьев тополя черного: 1 — раствор извлечения; 2 — раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

Fig. 1. Electronic spectra of solutions of water-alcohol extraction from *Populus nigra* leaves: 1 — extraction solution; 2 — extraction solution with aluminium chloride

В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из данного сырья (рис. 1 и 2). Определено, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения тополя черного наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 1), как и в случае рутин (рис. 3). Изучение УФ-спектров Государственного стандартного образца (ГСО) рутин показало, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при длине волны 414 нм (рис. 3). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из листьев тополя черного в дифференциальном варианте обнаруживается при длине волны 414 нм максимум поглощения (рис. 4), который соответствует максимуму поглощения раствора рутин.

Таким образом, рутин может быть использован в методике анализа в качестве ГСО.

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов нами подобраны оптимальные условия экстракции флавоноидов в листьях тополя черного: экстрагент 70 % этиловый спирт; соотношение «сырье – экстрагент» — 1 : 30; время экстракции — извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 мин (табл. 1).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь

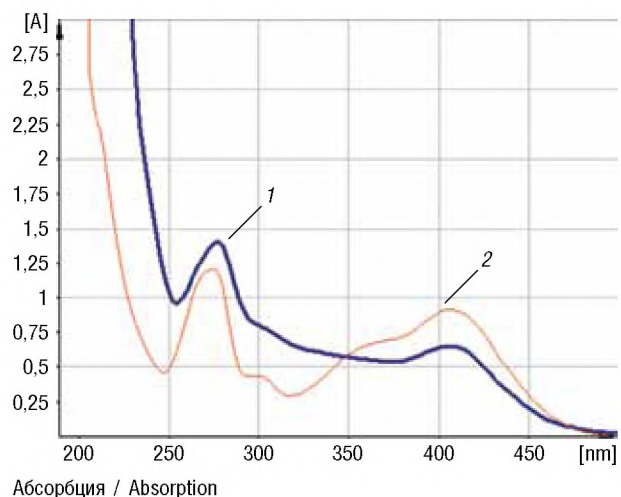
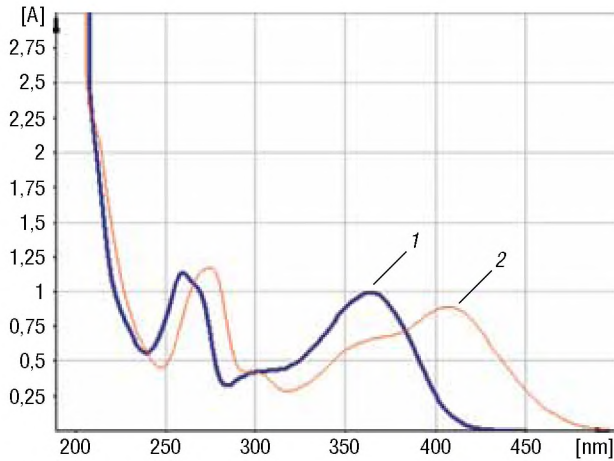


Рис. 2. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из листьев тополя черного: 1 — раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида; 2 — раствор рутин с добавлением алюминия хлорида

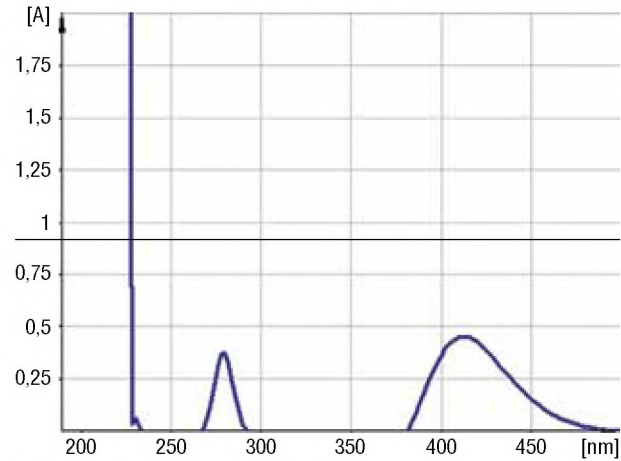
Fig. 2. Electronic spectra of solutions of water-alcohol extraction from *Populus nigra* leaves: 1 — extraction solution with aluminium chloride; 2 — rutin solution with aluminium chloride



Абсорбция / Absorption

Рис. 3. Электронные спектры спиртовых растворов рутина: 1 — исходный раствор; 2 — раствор с добавлением алюминия хлорида

Fig. 3. Electronic spectra of alcohol solutions of rutin: 1 — primary solution; 2 — solution with aluminium chloride



Абсорбция / Absorption

Рис. 4. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из листьев тополя черного (дифференциальный вариант)

Fig. 4. The electronic spectrum of a solution of water-alcohol extraction of the leaves of *Populus nigra* (differential version)

Таблица 1 / Table 1

Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из листьев тополя черного

The dependence of the efficiency of extraction of the total flavonoids from the leaves of the *Populus nigra*

| № п/п | Экстрагент | Соотношение сырье : экстрагент | Время экстракции, мин | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (в %) |
|-------|---------------------|--------------------------------|-----------------------|---|
| 1 | 40 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 2,71 ± 0,11 |
| 2 | 50 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 2,79 ± 0,08 |
| 3 | 60 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 2,92 ± 0,09 |
| 4 | 70 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 2,99 ± 0,08 |
| 5 | 80 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 2,89 ± 0,12 |
| 6 | 96 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 0,85 ± 0,10 |
| 7 | 70 % этиловый спирт | 1 : 30 | 30 | 2,52 ± 0,07 |
| 9 | 70 % этиловый спирт | 1 : 30 | 45 | 2,62 ± 0,08 |
| 12 | 70 % этиловый спирт | 1 : 30 | 90 | 2,69 ± 0,09 |
| 14 | 70 % этиловый спирт | 1 : 30 | 120 | 2,88 ± 0,09 |
| 15 | 70 % этиловый спирт | 1 : 30 | 60 | 2,74 ± 0,08 |
| 16 | 70 % этиловый спирт | 1 : 20 | 60 | 2,68 ± 0,07 |
| 17 | 70 % этиловый спирт | 1 : 50 | 60 | 2,47 ± 0,08 |

сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин.

Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора

Таблица 2 / Table 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного
Metrological characteristics of methods for the quantitative determination of the total flavonoids in the leaves of the
Populus nigra

| <i>f</i> | \bar{X} | <i>S</i> | <i>P</i> , % | <i>t</i> (<i>P</i> , <i>f</i>) | $\pm X$ | <i>E</i> , % |
|----------|-----------|----------|--------------|----------------------------------|-------------|--------------|
| 10 | 2,83 | 0,4472 | 95 | 2,23 | $\pm 0,091$ | $\pm 3,21$ |

алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытываемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 414 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1 : 30) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки.

Примечание: Приготовление раствора рутина — стандартного образца. Около 0,025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 70 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70 % этиловым спиртом до метки (раствор А рутина). 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытываемый раствор Б рутина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 414 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б рутина).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_o \cdot 30 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{D_o \cdot m \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где *D* — оптическая плотность испытуемого раствора; *D_o* — оптическая плотность раствора ГСО рутина; *m* — масса сырья, г; *m_o* — масса ГСО рутина, г; *W* — потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения — 240.

$$X = \frac{D \cdot 30 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 240 \cdot (100 - W)},$$

где *D* — оптическая плотность испытуемого раствора; *m* — масса сырья, г; 240 — удельный показатель поглощения (*E_{1cm}^{1%}*) ГСО рутина при 414 нм; *W* — потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в листьях тополя черного представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 3,21$ %.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев тополя черного и рутина с алюминия хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутина (с концентрациями в диапазоне от 0,00880 до 0,03520 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,98953.

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора рутина с известной концентрацией (25, 50 и 75 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98 %.

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд образцов листьев тополя черного (табл. 3) и при этом определено, что содержание суммы флавоноидов варьирует от 2,04 до 2,99 %, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела для сырья данного растения содержание суммы флавоноидов не менее 2,0 %.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации листьев тополя черного путем определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 414 нм в пересчете на рутин.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях тополя черного методом дифференциаль-

Таблица 3 / Table 3

Содержание суммы флавоноидов в образцах листьев тополя черного
The content of the total flavonoids in samples of *Populus nigra* leaves

| № п/п | Характеристика образца сырья | Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на рутин |
|-------|---|---|
| 1 | Самарская область, п. Алексеевка (июнь 2012 г.) | 2,99 ± 0,11 |
| 2 | Самарская область, п. Алексеевка (июнь 2017 г.) | 2,87 ± 0,08 |
| 3 | Самарская область, с. Гаврилова Поляна (сентябрь 2018 г.) | 2,04 ± 0,09 |

ной спектрофотометрии с использованием ГСО рутина при аналитической длине волны 414 нм.

2. Содержание суммы флавоноидов для листьев тополя черного варьирует от 2,04 до 2,99 %. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95 % составляет ±3,21 %.
3. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать для листьев тополя черного нижний предел содержания суммы флавоноидов не менее 2,0 %.

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Браславский В.Б., Куркин В.А., Жданов И.П. Антимикробная активность экстрактов и эфирных масел почек некоторых видов *Populus L.* // Растительные ресурсы. – 1991. – Т. 27. – № 2. – С. 77–81. [Braslavskiy VB, Kurkin VA, Zhdanov IP. Antimikrobnaya aktivnost' ekstraktov i firnykh masel pochek nekotorykh vidov *Populus L.* *Rastitel'nye resursy.* 1991;27(2):77-81. (In Russ.)]
2. pharmacopoeia.ru [интернет]. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е издание. [доступ от 18.11.2018]. Доступ по ссылке <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/>. [Pharmacopoeia.ru [Internet]. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. [cited 2018 Nov 18]. Available from: <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/>. (In Russ.)]
3. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. Почка тополя — перспективный источник антимикробных и противогрибковых лекарственных средств // Традиционная медицина и питание: теоретиче-

ские и практические аспекты: материалы Первого Международного научного конгресса. – М., 1994. – С. 172. [Kurkin VA, Braslavskiy VB, Zapesochnaya GG. Pochki topolya — perspektivnyy istochnik antimikrobnnykh i protivogribkovykh lekarstvennykh sredstv. In: Traditsionnaya meditsina i pitaniye: teoreticheskie i prakticheskie aspekty: materialy Pervogo Mezh-dunarodnogo nauchnogo kongressa. Moscow; 1994. P. 172. (In Russ.)]

4. Куркин В.А., Варина Н.Р., Авдеева Е.В., и др. Разработка комбинированных лекарственных фитопрепаратов для стоматологии и лор-практики // Наука и инновации в медицине. – 2016. – № 4. – С. 51–57. [Kurkin VA, Varina NR, Avdeeva EV, et al. The development of the combined medicinal herbal remedies for stomatological and otorhinolaryngological practice. *Nauka i innovatsii v meditsine.* 2016;(4):51-57. (In Russ.)]
5. Фармакогнозия: Учебник для студентов фарм. вузов / Под ред. В.А. Куркина. – Самара, 2016. [Farmakognoziya: Uchebnik dlya studentov farmats. vuzov. Ed. by V.A. Kurkin. Samara; 2016. (In Russ.)]
6. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Paoniaceae – Thymelaeaceae* / Под ред. О.Д. Барнаулова. – Л.: Наука, 1986. [Rastitel'nye resursy SSSR: Tsvetkovye rasteniya, ikh khimicheskii sostav, ispol'zovanie; Semeystva *Paoniaceae – Thymelaeaceae.* Ed. by O.D. Barnaulov. Leningrad: Nauka, 1986. (In Russ.)]
7. Шагалиева Н.Р. Экспериментальное обоснование методик качественного и количественного анализа нового комплексного лекарственного фитопрепарата для челюстно-лицевой хирургии и стоматологии // Аспирантский вестник Поволжья. – 2011. – № 5–6. – С. 276–279. [Shagalieva NR. The experimental grounds of approaches to qualitative and quantitative analysis of a new complex phytopreparation medicine for maxillofacial surgery and dentistry. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya.* 2011;(5-6):276-279. (In Russ.)]

■ Информация об авторах

Елена Александровна Куприянова — аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: lenoka-09@mail.ru.

Владимир Александрович Куркин — доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru.

■ Information about the authors

Elena A. Kupriyanova — Postgraduate student, Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy. E-mail: lenoka-09@mail.ru.

Vladimir A. Kurkin — Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy. E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru.