

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ И КАЧЕСТВО ЦВЕТКОВ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО

Д.В. Моисеев*¹, канд. фарм. наук,

Г.П. Яковлев², докт. биол. наук, профессор

¹Витебский государственный медицинский университет;

Республика Беларусь, 210023, Витебск, пр. Фрунзе, д. 27

²Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия;

197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14

E-mail: ussr80@yandex.ru

Приведены данные о влиянии условий хранения (герметичная и негерметичная упаковка, влажность сырья и температура) цветков лабазника вязолистного на количественный и качественный состав флавоноидов, антиоксидантную и противовоспалительную активность сырья при различных условиях и длительности хранения.

Ключевые слова: лабазник вязолистный, *Filipendula ulmaria* L., ВЭЖХ, флавоноиды, хранение, ускоренные испытания.

В последние годы значительно возрос интерес к лабазнику вязолистному (*Filipendula ulmaria* L.) как источнику биологически активных

веществ (БАВ). В Российской Федерации трава лабазника вязолистного выпускается в качестве биологически активной добавки. В Европейскую и Государственную фармакопею Республики Беларусь (ГФ РБ) как фармакопейный вид включена трава лабазника, которая стандартизируется по содержанию эфирных масел, а цветки лабазника (по ГФ РБ) – по сумме флавоноидов [1].

Химический состав лабазника вязолистного включает разнообразные группы веществ: фенольные кислоты, флавоноиды, салицилаты, эфирные масла, танины [2]. Значительная часть фармакологических эффектов (кардиопротекторный, про-

тивовоспалительный, антиоксидантный, ноотропный и др.) обусловлена высоким содержанием в лабазнике флавоноидных соединений, в частности гликозидов кверцетина и кемпферола. В траве и цветках лабазника идентифицированы флавоноиды — кверцетин, рутин, гиперозид, кверцетин-3-О-арабинозид, изокверцитрин, кверцетин-4'-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкуронид, кемпферол-4'-О-глюкозид [2].

В зависимости от упаковки лекарственного растительного сырья (ЛРС) деструкция БАВ, по которым проводится стандартизация, в течение срока годности может достигать 50%. Для оценки влияния внешних факторов на стабильность синтетических фармацевтических субстанций и выработки решений по упаковке широко применяются стресстесты. Для оценки стабильности лекарственных средств при хранении используются ускоренные испытания при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности $70 \pm 5\%$ в течение периода не менее 6 мес. В научной литературе имеются работы по методологии проведения подобных испытаний для лекарственных средств на основе ЛРС и результаты оценки деструкции активных веществ для листьев левзеи сафлоровидной и листьев брусники обыкновенной [3–5].

По вопросам фармакологической активности и качества ЛРС до и после хранения встречаются единичные работы [6]. Цель данной работы заключается в сравнительной оценке качественного и количественного состава флавоноидов и фармакологической (противовоспалительной и антиоксидантной) активности *in vitro* цветков лабазника вязолистного после хранения в различных условиях.

Экспериментальная часть

Цветки лабазника вязолистного измельчали до размера крупного порошка (2000 мкм). Сырье помещали в контейнеры (стеклянные флаконы) как допускающие газообмен с внешней средой, так и герметично закупоренные (резиновая пробка под обкатку). При этом в герметично закупоренных контейнерах создавали искусственную влажность (потерю в массе при высушивании) для сырья около 9% (кратковременно подсушивали сырье при температуре 85°C), около 13% (естественная влажность при воздушно-теневого сушке) и 25% (к навеске сырья с установленной влажностью добавляли рассчитанный объем воды до влажности 25%, перемешивали на вортекс-шейкере и сразу закупоривали). Хранение с периодическим переконтролем осуществляли в естественных условиях ($20 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 3 лет) и при температуре 60°C (68 дней).

Качественное и количественное определение флавоноидов в цветках лабазника вязолистного, заготовленного в Республике Беларусь (окрестности

Витебска), осуществляли по разработанной нами и валидированной методике [7] на жидкостном хроматографе Agilent HP 1100 с диодно-матричным детектором G1315B. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводились с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

В круглодонную колбу со шлифом помещали 0,5000 г измельченного (180 мкм) растительного сырья (точная навеска), прибавляли 25,0 мл 40% этилового спирта, взвешивали с точностью до 0,01 г и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником, в течение 2 ч, периодически перемешивая. После охлаждения колбу взвешивали, при необходимости доводили 40% этиловым спиртом до первоначальной массы и перемешивали. Содержимое фильтровали через стеклянный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, и 10 мкл инжестировали в хроматограф. Для разделения использовали хроматографическую колонку Zorbax SB C-18 (размер частиц 5 – мкм, длина – 250 мм, диаметр – 4,6 мм). Система растворителей: 0,01 М раствор дигидрофосфата калия, доведенный до значения $\text{pH}=3,0$ концентрированной ортофосфорной кислотой и ацетонитрил (80:20 по объему), температура колонки – 30°C . Длина волны детекции соответствовала максимумам пиков, выбиралась после записи спектров поглощения при длинах волн 190–400 нм. Для количественного определения суммы флавоноидов в сырье до и после хранения использовался стандартный образец кверцетина.

Противовоспалительную активность оценивали *in vitro* по подавлению гиперпродукции цитокина — трансформирующего фактора роста бета (ТФР- β) активированными опухолевыми клетками, что обуславливает противовоспалительный и иммуносупрессорный эффекты [8].

В эксперименте использовали макрофаги праймированной линии мышей RAW 264.7, которые относились к опухолевым клеточным линиям, сильно реагирующим на различные экзогенные факторы и вырабатывающим при этом различный спектр цитокинов. Их культивирование осуществляли в жидкой питательной среде 199, содержащей 10% (по объему) эмбриональной сыворотки теленка. Дозы (концентрации), которые вносили в культуру макрофагов, рассчитывали как отношение химического количества суммы флавоноидов в свежепереработанном растительном сырье в пересчете на кверцетин (отношение абсолютной массы суммы данных соединений к молярной массе кверцетина) к объему жидкой питательной среды. В результате расчета получили следующие дозы: 29 нмоль/л (доза высокого уровня); 2,9 нмоль/л (доза среднего уровня) и 0,29 нмоль/л (доза нижнего уровня). Дозу высокого уровня получали путем

растворения сухого остатка в определенном объеме воды для инъекций. Сухой остаток растворялся в воде для инъекций полностью, создавая раствор без видимых механических включений. Дозы среднего и нижнего уровня получали путем последовательного разведения дозы высокого уровня водой для инъекций.

Постановку реакции осуществляли по следующей схеме. В стерильные стеклянные флаконы вносили 5,0 мл среды 199; 0,2 мл 0,1% раствора каминацина сульфата для подавления роста и развития сопутствующей микрофлоры, затем вносили 100 мкл суспензии макрофагов, содержащей 2 млн клеток в 1 мл. В одни флаконы добавляли 25 мкг липополисахарида *Shigella flexneri* и по 20 мкл исследуемого средства в различных дозах (исследуемые пробы); в другие – 25 мкг липополисахарида и 20 мкл воды для инъекций (контрольные пробы). В остальные дополнительно вносили только 20 мкл среды 199 (интактные пробы). Культивирование осуществляли в течение 3 сут (96 ч) при температуре 37°C. На 4-е сутки культуры клеток центрифугировали для отделения культуральной жидкости от клеточных элементов при 5000g в течение 10 мин. В культуральной жидкости определяли концентрацию общего ТФР-β методом твердофазного двухсайтового иммуноферментного анализа при помощи наборов «Biosource». Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340 с программным обеспечением «Aifm». Концентрацию общего ТФР-β рассчитывали по формуле 1:

$$X = \frac{A \cdot C_{\text{изв}}}{A_{\text{изв}}} \quad (1),$$

где X – концентрация общего ТФР-β в культуральной жидкости (нг/мл); A – оптическая плотность исследуемых образцов; C_{изв} – концентрация образца раствора с известной концентрацией общего ТФР-β (15 нг/мл); A_{изв} – оптическая плотность образца раствора с известной концентрацией общего ТФР-β.

Противоопухолевый эффект регистрировали в виде значения коэффициента подавления выработки ТФР-β (K_{под}), который рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{под}} = \frac{C_{\text{кон}} - C_{\text{инт}}}{C_{\text{ис}}} \quad (2),$$

где C_{кон} – концентрация общего ТФР-β в контрольных пробах;

C_{инт} – концентрация общего ТФР-β в интактных пробах; C_{ис} – концентрация общего ТФР-β в исследуемых пробах.

Антиоксидантную активность оценивали с помощью спектрометрической методики, основанной на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила), растворенного в спирте, с образцом антиоксиданта: к 2,0 мл DPPH добавляли 0,1 мл хлористоводородной кислоты, перемешивали и через 60 с измеряли оптическую плотность при длине волны 517 нм, затем прибавляли 0,1 мл экстракта из цветков лабазника, перемешивали, выдерживали в течение 10–15 мин (плато протекания реакции) и измеряли оптическую плотность на регистрирующем спектрофотометре Specord-250. Раствором сравнения служил 96% этанол. П, % – процент поглощения радикалов рассчитывали по формуле:

$$П = 1 - \frac{A_{\text{исс}}}{A_{\text{контр}}} \cdot 100 \quad (3),$$

где A_{контр} – оптическая плотность реактива DPPH; A_{исс} – оптическая плотность реактива DPPH после добавления испытуемого раствора или раствора сравнения.

На 1-м этапе оценивали изменение качественного и количественного состава флавоноидов в цветках лабазника до и после хранения (рис. 1, табл. 1). Установлено, что при длительном хранении при температуре 20°C в негерметичной упаковке происходит снижение концентрации флавоноидов за 3 года на 9,6%, при влажности 25% – на 58%. При

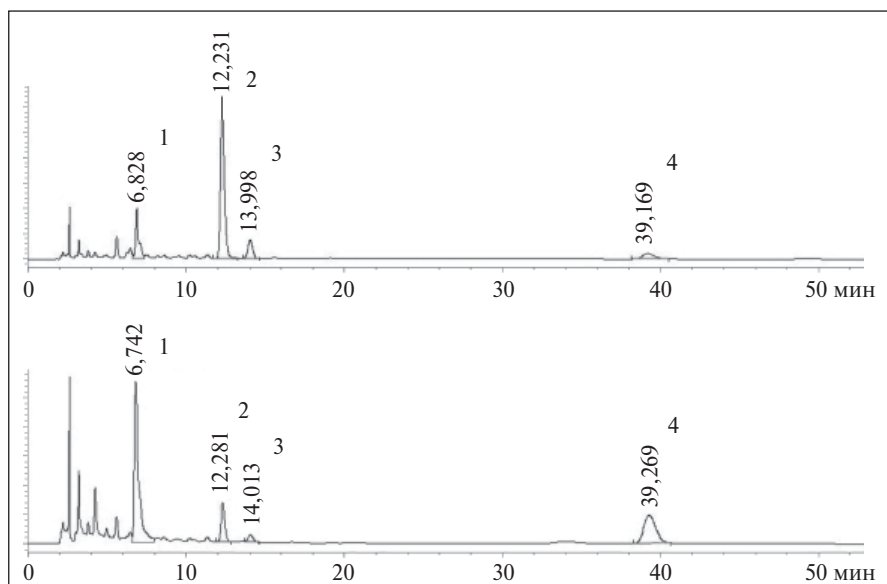


Рис. 1. Хроматограммы экстракта цветков лабазника свежепереработанного (вверху) и после хранения при температуре 20°C и влажности сырья 25% (внизу) при длине волны поглощения 370 нм (1 – изокверцитрин; 2 – спиреозид; 3 – неидентифицированный флавоноид; 4 – кверцетин)

ИЗМЕНЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА ЭКСТРАКТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВОДНО-СПИРТОВЫХ СМЕСЕЙ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ (n=3; p=0,95)

Условия хранения сырья	Сумма флавоноидов в сырье, %	Содержание флавоноидов, в сумме, %			
		изокверцитрин	спиреозид	неидентифицированный флавоноид	кверцетин
Свежепереработанное	10,5	12,7	68,9	11,5	6,9
20°C, негерметичная упаковка, 3 года	9,5	19,7	61,8	10,4	8,1
20°C, 25%, 3 года	4,4	2,0	15,0	7,6	75,4
60°C, негерметичная упаковка, 68 сут	8,1	14,2	70,4	11,5	3,9
60°C, 25%, 68 сут	0,6	18,1	34,6	9,6	37,7

краткосрочном хранении (68 сут) при температуре 60°C, согласно правилу Вант–Гоффа, скорость химических реакций должна увеличиваться в 2–4 раза при повышении температуры на каждые 10°C. В нашем случае при повышении температуры происходило снижение содержания флавоноидов на 23,2% в негерметичной упаковке, и на 94,0% – при влажности сырья 25%. Стоит отметить, что при длительном хранении при 20°C и пониженной влажности сырья (9%) в герметичной упаковке содержание суммы флавоноидов соответствовало хранению в негерме-

тичной упаковке, а при влажности 13% снижалось на 18% за 3 года.

Антиоксидантная активность всего исследуемого растительного сырья находилась на высоком уровне (более 90% по отношению к свежепереработанному сырью). Снижение антиоксидантной активности для различных режимов хранения (рис. 2) имеет невысокую степень корреляции с содержанием суммы флавоноидов в сырье после хранения. При всех способах хранения антиоксидантная активность сохранялась в пределах от 91% (повышенная влажность и температура хранения) до 101% (хранение в негерметичной упаковке при повышенной температуре). Этот факт, по-видимому, можно объяснить тем, что в процессе хранения флавоноиды деструктурируются до более простых соединений, также обладающих восстановительными свойствами.

Впервые *in vitro* установлена противовоспалительная активность экстрактов из цветков лабазника вязолистного. Наибольшая противовоспалительная активность наблюдалась в ряду (по мере снижения) для свежепереработанного сырья, а также сырья, хранившегося при температуре 20°C в течение 3 лет в негерметичной упаковке, при температуре 20°C в течение 3 лет с повышенной влажностью, при температуре 60°C в негерметичной упаковке и при температуре 60°C в течение 3 лет в условиях повышенной влажности (табл. 2). Можно предположить, что основные причины

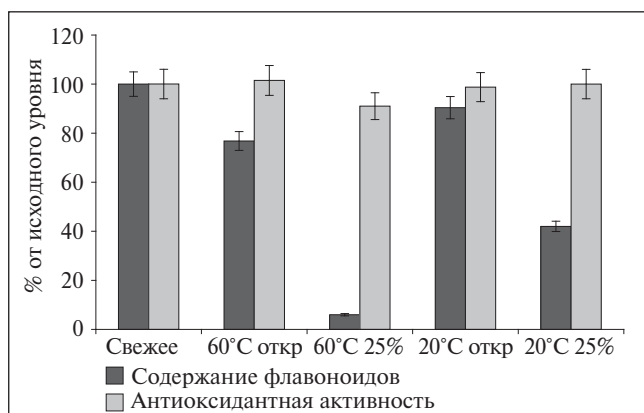


Рис. 2. Антиоксидантная активность цветков лабазника вязолистного при различных условиях хранения

ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ (КОЭФФИЦИЕНТ ПОДАВЛЕНИЯ) ДЛЯ 3 РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО (n=3; p=0,95)

Показатель	Свежее	60°C, негерметичное	60°C, 25%	20°C, негерметичное	20°C, 25%
29 н/моль	2,75	0,82	0,70	1,85	1,34
2,9 н/моль	3,30	0,91	0,62	2,77	1,55
0,29 н/моль	3,94	0,92	0,69	3,12	1,47
Средний коэффициент подавления для трех доз	3,33±0,60	0,88±0,06	0,67±0,04	2,58±0,66	1,45±0,10

ЛИТЕРАТУРА

снижения противовоспалительной активности при хранении сырья – это повышенная температура. При длительном хранении в естественных условиях противовоспалительная активность снижается на 20–25% от исходной, в то же время содержание флавоноидов снижается примерно на 10%. Как и в случае с антиоксидантной активностью, корреляции между количественным содержанием флавоноидов и противоопухолевой активностью не наблюдалось.

Выводы

1. Установлено влияние температуры и влажности на качественный и количественный состав цветков лабазника, его антиоксидантную и противовоспалительную активность.

2. Повышенная влажность при хранении в герметичной упаковке является основным деструктурирующим фактором для количественного содержания флавоноидов в сырье.

3. Антиоксидантная активность практически не изменяется при хранении цветов лабазника в изученных условиях. Высокая температура хранения способствует снижению противовоспалительной активности.

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья. Центр экспертиз и испытания в здравоохранении. (под ред. А.А. Шерякова) Молодечно: «Победа», 2008; 472.
2. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. (под ред. Г.П. Яковлева) СПб. : СпецЛит, 2010; 863.
3. 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: 106–111.
4. Моисеев Д.В. Новый метод определения сроков годности лекарственного растительного сырья (листья *Rhaponticum Carthamoides*) на основе стресс-теста «ускоренное старение». Рецепт, 2012; 2: 47–54.
5. 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; 10 (3): 403–413.
6. Темердашев З.А., Фролова Н.А., Цюпко Т.Г., Чупрынина Д.А. Оценка стабильности фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях в процессе их хранения. Химия растительного сырья, 2011; 4: 193–198.
7. Моисеев Д.В. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в соцветиях лабазника вязолистного методом жидкостной хроматографии. Вестник фармации, 2011; 4 (54): 36–42.
8. Хайтов Р.М. Иммунология. М: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 528.

Поступила 1 декабря 2014 г.

IMPACT OF STORAGE CONDITIONS ON THE EFFICACY AND QUALITY OF MEADOWSWEET (*Filipendula ulmaria* L.) FLOWERS

D.V. Moiseev¹, PhD; Professor G.P. Yakovlev², PhD

¹Vitebsk State Medical University; 27, Frunze Pr., Vitebsk 210023, Republic of Belarus

²Saint Petersburg State Chemopharmaceutical Academy; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376

SUMMARY

The paper considers new methodical approaches to investigating the impact of storage conditions of medicinal plant raw material on its quality. It proposes to study the chemical and pharmacological activity changes occurring in the raw material under storage conditions at higher temperature (up to 60°C) and moisture (up to 25%). Long-term (3-year) storage of meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) flowers in the non-hermetic package was established to cause a decrease in flavonoid concentrations by 9.6% at 20°C and by 58% at 25% moisture. Their short-term (68-day) storage in the non-hermetic package at 60°C reduced flavonoids concentrations by 23.2% and by 94% at 25% moisture. Their antioxidant activity was virtually unchanged when the raw material was stored under the examined conditions. *In vitro* studies first detected the ability of meadowsweet flowers to inhibit the hyperproduction of the cytokine transforming growth factor beta (TGF-β) with activated tumor cells, determining anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Higher storage temperature promoted the lower anti-inflammatory activity of meadowsweet flowers.

Key words: meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.), high-performance liquid chromatography, flavonoids, storage, accelerated tests.

REFERENCES

1. The State pharmacopoeia of the Republic of Belarus . Vol. 2 . Quality control of auxiliary substances and medicinal plants . Centre for Expertise and Testing in Healthcare (ed. A.A.Sheryakova), Molodechno: «Pobeda», 2008; 472 (in Russian).
2. Pharmacognosy . Medicinal raw materials of vegetable and animal origin (ed. G.P.Yakovlev). SPb. «SpetzLit», 2010; 863 (in Russian).
3. Moiseev D.V. The kinetics of degradation reactions in the leaves cranberries arbutine common in storage in natural and stress conditions . Kursk scientific-practical herald «Man and his health». 2013; 2: 106–111 (in Russian).
4. Moiseev D.V. A new method for determining the shelf life of medicinal plants (leaves *Rhaponticum carthamoides*) on the basis of the stress test «accelerated aging». Receipt, 2012; 2: 47–54 (in Russian).
5. 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; 10 (3): 403–413.
6. Temerdashev Z.A. , Frolova N.A., Tsyupko I.G., Chuprynina D.A. Estimate the stability of flavonoids and phenolic compounds in herbs during storage. Chimiya rastitel'nogo syrya, 2011; 4: 193–198 (in Russian).
7. Moiseev D.V. Development and validation of methods for determining flavonoids in inflorescences meadow-sweet by liquid chromatography. Vestnik Farmatsiyi, 2011; 4: 36–42 (in Russian).
8. Khaitov RM Immunology . Moscow: «GEOTAR-Media», 2013; 528 (in Russian).