



ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 615.32:547.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ПЛОДАХ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN FRUITS CHOKEBERRY ARONIA

Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин
E.E. Logvinova, T.A. Brezhneva, A.I. Slivkin

Воронежский Государственный университет
394036, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1
Voronezh State University
394036, Voronezh, Universitetskaya Square, 1

e-mail: liza-ugl@mail.ru

Резюме. Известно, что природные биологически активные соединения, как исходные в производстве лекарств, имеют целый ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с субстанциями химического происхождения. В этой связи особый интерес представляет изучение лекарственных растений, содержащих богатейший комплекс природных БАВ. Одним из таких растений является Рябина черноплодная (*Aronia melanocarpa*).

Органические кислоты – это большая и разнообразная по своим свойствам группа биологически активных соединений, которая содержится в большинстве пищевых и лекарственных растений. Содержание органических кислот в растениях подвержено суточным и сезонным, а также видовым и сортовым изменениям, причем различия касаются не только суммарного содержания органических кислот, но и качественного состава.

Целью исследования являлось установление качественного состава и количественное определение органических кислот плодов Рябины черноплодной изучение влияния различных способов консервации на количественное содержание данных БАВ в сырье.

Объектом исследования служили свежесобранные и высушенные плоды аронии, заготовленные на территории Воронежской области в период сентябрь-октябрь 2014 года. Лекарственное растительное сырье было стандартизовано согласно требованиям НД.

Для качественной идентификации органических кислот плодов Рябины черноплодной использовали метод тонкослойной хроматографии.

Анализ проводили на хроматографических пластинах марки «Sorbifil». Высота подъема фронта – 8 см.

На следующем этапе подбирали оптимальные значения объема наносимой на пластину пробы, позволяющего обеспечить наилучшее качество хроматографических зон. Полученные извлечения из исследуемого ЛРС наносили на линию старта хроматографической пластины в объеме 10, 20, 30, 40 мкл.

Далее было определено суммарное содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в свежесобранных и высушенных плодах аронии с применением титриметрического метода.

В ходе проведенных исследований была выбрана оптимальная система для идентификации и разделения органических кислот в извлечениях из лекарственного растительного сырья – плодов Рябины черноплодной. Была проведена идентификация и сравнительная оценка содержания органических кислот в полученных извлечениях с помощью алкалинметрического метода и метода капиллярного электрофореза.

Summary. It is known that the natural bioactive compounds such as in the production of the starting drugs have a number of advantages compared with substances of chemical origin. In this regard, of particular interest is the study of medicinal plants, containing a rich complex of natural biologically active substances. One such plant is the black chokeberry (*Aronia melanocarpa*).



Organic acids – a large and diverse group with properties of biologically active compounds, which is found in most food and medicinal plants. The content of organic acids in plants exposed to daily and seasonal, as well as species and varietal changes, the differences are not only the total content of organic acids, but also qualitative composition.

The aim of the study was to establish qualitative composition and quantitative determination of organic acids black chokeberry fruits study the effect of different methods of preserving the quantitative data content of BAS in the feed.

The object of the study were freshly harvested and dried fruits chokeberry, harvested in the Voronezh region in the period September-October 2014года. Herbal drugs was standardized according to the requirements of ND. For the qualitative identification of organic acids black chokeberry fruits used by TLC.

Analysis was performed on chromatographic plates brand «Sorbifil». Lifting height front – 8 cm.

In the next step select the optimum values of the volume of the sample applied to the plate, to ensure the best quality of chromatographic zones. Extract obtained from the sample line RL applied to the chromatographic plate starting at 10, 20, 30,40 microliters.

Further, it was determined the total content of organic acids in terms of malic acid and freshly dried fruits chokeberry using the titrimetric method. In the course of the research was chosen the optimal system for the identification and separation of organic acids in the extracts of medicinal plants – black chokeberry fruits. Was carried out identification and comparative assessment of the content of organic acids in the extracts obtained using alkali metric method and the method of capillary electrophoresis.

Ключевые слова. Органические кислоты, плоды рябины черноплодной, лекарственное растительно сырье, водные извлечения, тонкослойная хроматография.

Key words: Organic acids, black chokeberry fruits, medicinal herbs, water extraction, thin layer chromatography.

Введение

Известно, что природные биологически активные соединения, как исходные в производстве лекарств, имеют целый ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с субстанциями химического происхождения. В этой связи особый интерес представляет изучение лекарственных растений, содержащих богатейший комплекс природных БАВ. Одним из таких растений является Рябина черноплодная (*Aronia melanocarpa*) используемая в медицинских целях в виде свежесобранных и высушенных плодов Аронии.

Органические кислоты – это большая и разнообразная по своим свойствам группа биологически активных соединений, которая содержится в большинстве пищевых и лекарственных растений. Особенность органических кислот заключается в том, что некоторые из них образуются в процессе метаболизма веществ первичного биосинтеза или являются ключевыми соединениями главных путей биосинтеза. В различных органах растений органические кислоты распределены неравномерно: в плодах и ягодах преобладают свободные кислоты, в листьях содержатся, главным образом, связанные кислоты [1].

Содержание органических кислот в растениях подвержено суточным и сезонным, а также видовым и сортовым изменениям, причем различия касаются не только суммарного содержания органических кислот, но и качественного состава. На процесс их накопления значительно влияют широта местности, полив, фаза развития растений, степень зрелости плодов, сроки хранения и температура [2, 3].

Органические кислоты содержатся почти во всех плодах и овощах, придавая им приятный вкус, задерживают рост бактерий, оказывают положительное влияние на работу желудочно-кишечного тракта и другие системы организма.

Цель работы

Целью исследования являлось установление качественного состава и количественное определение органических кислот плодов Рябины черноплодной изучение влияния различных способов консервации на количественное содержание данных БАВ в сырье.

Материалы и методы

Объектом исследования служили свежесобранные и высушенные плоды аронии, заготовленные на территории Воронежской области в период сентябрь-октябрь 2014года. Лекарственное растительное сырье было стандартизовано согласно требованиям НД.

Для качественной идентификации органических кислот плодов Рябины черноплодной использовали метод тонкослойной хроматографии.



Анализ проводили на хроматографических пластинах марки «Sorbifil». Высота подъема фронта – 8 см.

Около 1г (т.н.) высушенного и измельченного сырья помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляли 10 мл воды очищенной. Навеску свежего сырья отбирали из гомогенизированной массы, полученной при измельчении свежих плодов в мельнице – «волчке». Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане 120 минут. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры, извлечение фильтровали через бумажный фильтр и наносили на линию старта пластинки. Хроматографическую пластину с нанесенными пробами помещали в хроматографическую камеру, которую предварительно насыщали парами элюента. Зоны органических кислот на хроматограммах бесцветны, поэтому хроматограммы обрабатывали индикаторными смесями.

В ходе исследований были использованы хроматографические системы с различными значениями полярности, позволяющие идентифицировать и разделить органические кислоты.

Таблица 1

Элюирующие системы
Eluent system

№ п/п	Состав элюента	Полярность
1	н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (5:0.5:2)	5.72
2	н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:5)	7.26
3	н-бутанол – кислота муравьиная (3:1)	4.43
4	н-бутанол – кислота муравьиная – вода (250:25:297)	7.25
5	Этилацетат – кислота муравьиная (4:1)	4.72
6	Этилацетат – кислота муравьиная – вода (3:1:1)	5.88
7	Этилацетат – кислота уксусная – кислота муравьиная – вода (100:11:11:25)	5.62
8	Гексан – диэтиловый эфир (8:2)	0.34
9	Хлороформ – спирт этиловый (9:1)	4.12

Лучшее разделение и качество хроматографических зон было достигнуто в системе № 7, поэтому именно она была выбрана и рекомендована для определения органических кислот свежесобранных и высушенных плодов Аронии.

На следующем этапе подбирали оптимальные значения объема наносимой на пластину пробы, позволяющего обеспечить наилучшее качество хроматографических зон. Полученные извлечения из исследуемого ЛРС наносили на линию старта хроматографической пластины в объеме 10, 20, 30, 40 мкл.

Оптимальным был признан объем пробы 20 мкл.

В подобранных условиях был проведен хроматографический анализ извлечений из свежесобранных и высушенных сразу после заготовки плодов Аронии. В качестве стандартных образцов использовали ГСО щавелевой, янтарной, аскорбиновой, винной, лимонной и яблочной кислот. Пластинки высушивали в сушильном шкафу до исчезновения запаха растворителя. Детектирующим реагентом служил спиртовой раствор бромкрезолового зеленого 0.2%. При этом органические кислоты проявлялись в виде пятен желтого цвета на синем фоне пластинки. Общий вид полученной хроматограммы представлен на рисунке :

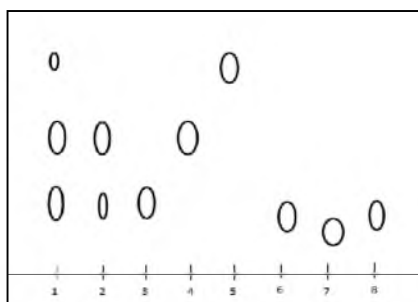


Рис. Результаты ТСХ-анализа органических кислот свежесобранных и высушенных плодов Рябины черноплодной: 1- водное извлечение свежесобранных плодов; 2 – водное извлечение высушенных плодов; 3 – лимонная кислота; 4 – аскорбиновая кислота; 5 – янтарная кислота; 6 – винная кислота; 7- щавелевая кислота; 8 – яблочная кислота

The results of TLC analysis of organic acids and freshly dried fruits black chokeberry: 1 water extraction of freshly picked fruit; 2 – water extract of dried fruit; 3 – citric acid; 4 – ascorbic acid; 5 – succinic acid; 6 – tartaric acid; 7- oxalic acid; 8 – malic acid



Результаты и их обсуждение

Анализируя данные рисунка 1, можно сделать вывод о том, что состав органических кислот в извлечениях из свежесобранных и высушенных плодов аронии несколько отличен. Так, в извлечении, полученном из свежесобранных плодов, обнаружены 3 зоны, соответствующие по величине Rf ГСО кислоты лимонной, аскорбиновой и янтарной соответственно (Rf= 0.28, 0.56, 0.94). В извлечении, полученном из высушенных плодов, наблюдается 2 зоны, соответствующие кислоте лимонной и кислоте аскорбиновой. Это может быть связано с тем, что свежие плоды содержат в своем составе как свободные органические кислоты, так и связанные. При высушивании при температуре 60°C в клеточном соке лекарственного растительного сырья протекают процессы гидролиза (ферментативного и не ферментативного), которые могут сопровождаться изменением состава органических кислот в сырье.

Далее было определено суммарное содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в свежесобранных и высушенных плодах аронии с применением титриметрического метода.

Около 25.0 г. (т.н.) измельченного и высушенного сырья помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, добавляли 200 мл воды и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Полученное извлечение охлаждали и фильтровали. Фильтрат переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводили водой до метки. 10 мл полученного раствора переносили в колбу вместимостью 500 мл и добавляли 200-300 мл свежeproкипяченной воды, прибавляли 2 мл 0.1% спиртового раствора метиленового синего с 1 мл 1% раствором фталеина и титровали 0.1M раствором натрия гидроксида до появления в пене лилово-красного оттенка.

Содержание суммы органических кислот рассчитывали по формуле:

$$X = V * 0,0067 * 25 * 100 * 100 / a * 10 * (100 - W),$$

где:

- V- объем титранта, мл
 - a – навеска сырья, г
 - W- потеря в массе при высушивании сырья, %
- Полученные результаты представлены в табл. 2

Таблица 2

Количественное содержание суммы органических кислот в плодах Аронии
The quantitative content of the amount of organic acids in fruits chokeberry

Содержание суммы органических кислот, %	Свежесобранные плоды	Высушенные плоды
		5.0

Анализ табличных данных позволяет сделать вывод о том, что наибольшее количество органических кислот было обнаружено в свежесобранных плодах аронии. Сушка сырья приводит к снижению содержания в нем органических кислот.

Так как при алкалиметрическом титровании происходит окисление фенольных гидроксидов большинства полифенольных соединений, присутствующих в ЛРС, данная методика не совершенна в отношении количественного определения суммы кислот.

В связи с этим, на следующем этапе исследования было проведено определение в плодах качественного состава и количественного содержания ряда индивидуальных органических кислот. Для определения использовали метод капиллярного электрофореза на приборе марки «Капель-105/105М». Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Содержание органических кислот (%) в плодах рябины черноплодной
(метод капиллярного электрофореза)
Organic acid content (%) in the fruit black chokeberry (capillary electrophoresis)

Наименование показателей	НД на методы испытания	Высушенные плоды Аронии черноплодной
Яблочная	М 04-74-2012	1.188
Янтарная		0.015
Масляная		Менее 0.05*
Молочная		0.03
Фумаровая		0.006
Лимонная		0.309
Уксусная		0.036
Прошионовая		0.03
Сорбиновая		0.042

Примечание: *нижний предел измерения



Анализируя полученные данные, представленные в таблице 3, можно сделать заключение, что в анализируемом образце содержатся следующие органические кислоты: яблочная, янтарная, масляная, молочная, фумаровая, лимонная, уксусная, пропионовая и сорбиновая. Было найдено наибольшее количество яблочной и лимонной кислот. Количественное содержание остальных кислот значительно ниже. В наименьшем количестве содержится кислота масляная.

Выводы

В ходе проведенных исследований была выбрана оптимальная система для идентификации и разделения органических кислот в извлечениях из лекарственного растительного сырья – плодов Рябины черноплодной. Была проведена идентификация и сравнительная оценка содержания органических кислот в полученных извлечениях с помощью алкали метрического метода и метода капиллярного электрофореза.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в анализируемом образце содержатся следующие органические кислоты: яблочная, янтарная, масляная, молочная, фумаровая, лимонная, уксусная, пропионовая и сорбиновая. Установлено наибольшее количество яблочной и лимонной кислот.

Показано, что сушка лекарственного растительного сырья приводит не только к изменению качественного состава органических кислот, но и снижает их общее содержание в сырье.

Литература

Алехин А. П., Маркеев А. М., Гудкова С. А. 2010. Использование атомарно-слоевого осаждения диоксида титана для придания биоактивных свойств поверхности титановых имплантатов. *Институт стоматологии*. 2: 68-69.

Волков А. В., Бадалян В. А., Кулаков А. А. 2012. Гистоморфологические исследования взаимоотношений костной ткани с дентальным имплантатом. *Биомедицина*. 4: 96-100.

Воробьев А. А., Шемонаев В. И., Михальченко Д. В., Величко А. С. 2009. Взгляд на проблему дентальной имплантации в свете современных научных представлений. *Бюллетень Волгоградского научного медицинского центра*. 2: 20-25.

Калита В. И., Маланин Д. А., Мамаева В. А. 2009. Модификация поверхностей внутрикостных имплантатов: современные исследования и нанотехнологии». *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 4 (32): 17-23.

Коржевский Д. Э., Гиляров А. В. 2010. *Основы гистологической техники*, СПб., СпецЛит, 95.

Кулаков А. А., Гветадзе Р. Ш. 2012. Высокие технологии в дентальной имплантологии. *Стоматология*. 5(2): 57-59.

Лепилин А. В., Вениг С. Б., Лясникова А. В. 2011. Исследования морфологии и химических свойств биокomпозиционного серебросодержащего покрытия дентальных имплантатов. *Российский стоматологический журнал*. 2: 6-9.

Новочадов В. В., Гайфуллин Н. М., Залевский Д. А. 2013. Остеоинтеграция имплантатов с биоактивной поверхностью, модифицированной напылением хитозана в эксперименте у крыс. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2: 30-35.

Carlsson G. E. 2014. Implant and root supported overdentures – a literature review and some data on bone loss in edentulous jaws. *J. Adv. Prosthodont*. 4: 245–252.

Chang P.-C., Lang N. P., Giannobile W. V. 2010. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review. *Clin. Oral. Implants Res*. 21(1): 1–12.

Literature

Alekhin A. P., Markeev A. M., Gudkova S. A. 2010. Using atomic-layer deposition of titanium dioxide to give the bioactive properties of the surface of titanium implants. *Institut stomatologii*. 2: 68-69.

Volkov A. V., Badalyan V. A., Kulakov A. A. 2012. Histomorphological study the relationship of bone with dental implants. *Biomeditsina*. 4: 96-100.

Vorob'ev A. A., Shemonaev V. I., Mikhal'chenko D. V., Velichko A. S. 2009. A look at the problem of dental implantation in the light of modern scientific concepts. *Byulleten' Volgogradskogo nauchnogo meditsinskogo tsentra*. 2: 20-25.

Kalita V. I., Malanin D. A., Mamaeva V. A. 2009. Surface modification of intraosseous implants: current research and nanotechnology. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 4 (32): 17-23.

Korzhevskiy D. E., Gilyarov A. V. 2010. *Basics of histologic techniques (Osnovy gistologicheskoy tekhniki)*, SPb., SpetsLit, 95.

Kulakov A. A., Gvetadze R. Sh. 2012. High technology in dental implantology. *Stomatologiya*. 5(2): 57-59.



Lepilin A. V., Venig S. B., Lyasnikova A. V. 2011. Studies of morphology and chemical properties of biocomposite the silver coating of dental implants. *Rossiyskiy stomatologicheskiy zhurnal*. 2: 6-9.

Novochadov V. V., Gayfullin N. M., Zalevskiy D. A. 2013. Osteointegration of implants with a bioactive surface modified chitosan coated experimentally in rats. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2: 30-35.

Carlsson G. E. 2014. Implant and root supported overdentures – a literature review and some data on bone loss in edentulous jaws. *J. Adv. Prosthodont*. 4: 245–252.

Chang P.-C., Lang N. P., Giannobile W. V. 2010. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review. *Clin. Oral. Implants Res*. 21(1): 1–12.