

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БИОЛОГИЧНОАКТИВНИ ВЕЩЕСТВА В ЕКСТРАКТИ ОТ *FOLIA BETULAE*

*С. Димитрова**, *В. Андонова***, *П. Пенева***, *Д. Пенков***,
*М. Касърова***, *Л. Луканов**

**Медицински университет – Пловдив,*

Фармацевтичен факултет, катедра „Химия и биохимия“

*** Медицински университет – Пловдив,*

Фармацевтичен факултет, катедра „Фармацевтични науки“

ABSTRACT

Birch leaves contain a wide range of biologically active substances (BAS) – flavonoids, tannins and terpenes. They have diuretic, gall removing, inflammatory, antimicrobial, constipating and urine chasing action. They determine the therapeutic use of the extract.

Extracts of birch leaves are obtained by different technological methods – maceration and percolation, extraction with different concentrations of ethanol, changes in temperature regime. The influence of technological factors on the content of the BAS are examined. The study presents the phytochemical characterization of the extract and its standardizing according to important groups of biologically active substances – flavonoids (rutin, quercetin) and terpenes (betulin and betulinic acid), by means of modern highly effective methods for proving and quantitative defining.

The present HPLC method creates a possibility of reliable analysis of leaves of birch extracts and other medicinal forms content them.

Key words: Folia Betulae, rutin, quercetin, betulin, betulinic acid

УВОД

При фитохимични проучвания на растителни дроги от бреза е установено наличието на различни групи биологично активни вещества: флавоноиди, танини, терпени, гликозиди, етерични масла (1, 2, 3, 4).

Флавоноидите са най-широко разпространената група фенолни съединения в растенията и се срещат както в свободно състояние така и под формата на гликозиди. В литературата се откриват данни за изследвана противовъзпалителна (5), противотуморна (6), антиоксидантна (1) и антимикробна (7, 8) активност на флавоноидите. Те образуват комплекси с повърхностно разположените протеини от бактериалната клетъчната стена или разрушават клетъчната мембрана на микроорганизмите и така проявяват антимикробна активност *in vitro* (9).

Терпени също са доказани в различни видове *Betulae* (10, 11). Голям брой изследвания показват антибактериална (12), противовирусна, антифунгална (13) и антиоксидантна (14) активност на терпеновите съединения. Проведени са проучвания върху активността на тритерпеноиди от дамаранов тип, изолирани от листа на бреза, спрямо туморни клетки (*Ehrlich ascite carcinoma*). Установен е цитотоксичен ефект на екстракта, адитивен с противотуморното действие на антрациклиновите антибиотици (3). Установен е антипролиферативен ефект на бетулиновата киселина спрямо различни туморни клетъчни култури (10, 15, 16). Тритерпените от дамаранов тип проявяват противотуморен ефект, който се изразява в промяна на пермеабилитета и микровискозитета на мембраните на туморните клетки (2).

За определяне на вещества от посочените групи е подходящ HPLC методът. По този начин Abreu и сътр. (17) определят кверцетин, рутин и бетулинова киселина в *Hypericum brasiliense*, Y. Zu и сътр. (18) предлагат такъв за едновременно анализиране на пет флавоноида (катехин, рутин, кверцетин, камферол, изорамнетин) в екстракт от листа на зърнастец (*Hippophae rhamnoides* L.), а G. Zhao и сътр. (11) – бетулин и бетулинова киселина в екстракт от кора на бяла бреза.

Целта на настоящото изследване е количествено определяне на рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин в етанолови екстракти на *Folia Betulae alba*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и технология на получаване на екстрактите

1.1. Материали – листа от бреза (*Folia Betulae Alba*), етилов алкохол 96%, етилов алкохол 60% (Valerus).

1.2. Листата са събрани и изсушени при спазване на най-благоприятните условия за събиране на дроги. Определени са контролните показатели на изсушените листа. Дрогата отговаря на изискванията на Европейската фармакопея по основните показатели.

Листата от бреза са оситнени до 0.5 mm. Приготвят се четири течни екстракта, получени по метода на перколация (USP 24,1151, Process P), мацерация (USP 24, 1151, Process M) и мацерация при повишена температура – 50-60 °C (табл.1).

Таблица 1. Означение на екстракта, използван метод, екстрагент и температура

Означение на екстракта	Метод	Екстрагент	Температура
П96	Перколация	Етилов алкохол 96%	До 25°C
П60	Перколация	Етилов алкохол 60%	До 25°C
М96	Мацерация	Етилов алкохол 96%	До 25°C
Д60	Мацерация	Етилов алкохол 60%	Загриване до 50-60°C

2. HPLC определяне на рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин

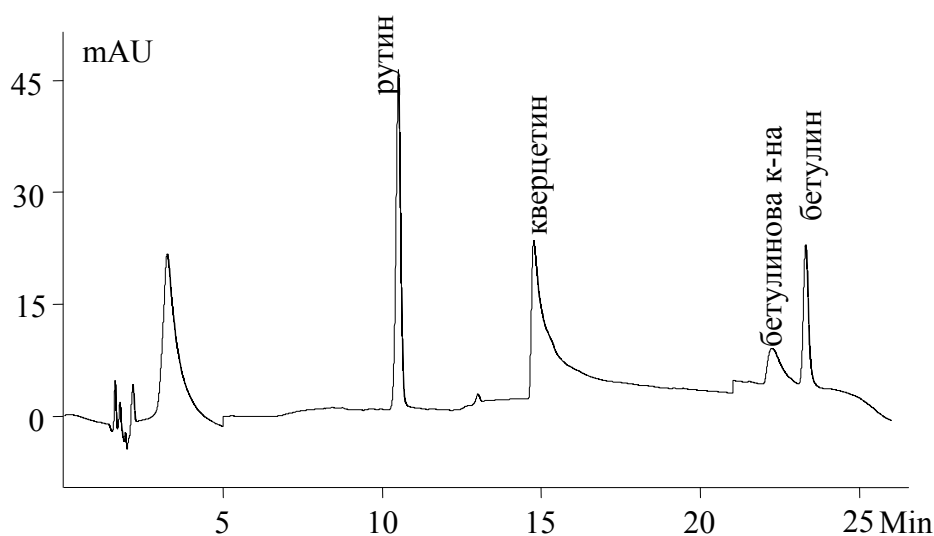
Анализът се извършва на HPLC система Varian Prostar с колона Microsorb-MV C₁₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) и PDA детектор. Използвана е подвижна фаза А (H₂O, рН=3):В (CH₃CN) (Labscan) в градиентен режим от 90(А):10(В) до 10(А):90(В) и скорост на потока 1 ml/min. Рутин и кверцетин се детектират при 368 nm, бетулинова киселина и бетулин при 210 nm. Идентификацията на веществата се прави по времената на задържане спрямо тези на чистите такива, а количественото определяне – по метода на външния стандарт. Стандартната права е построена по 6 калибрационни нива, съответстващи на разтвори с концентрации 5; 10; 20; 30; 40; 50 μg/ml на смес от чистите вещества рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин (Sigma), използвани като свидетели. Преди инжектиране анализираниите разтвори се филтруват през микрофилтър (0,20μm). За обработка на данните е използван софтуер Star Chromatography Workstation Version 6.30 (build 5).

3. Статистически анализ

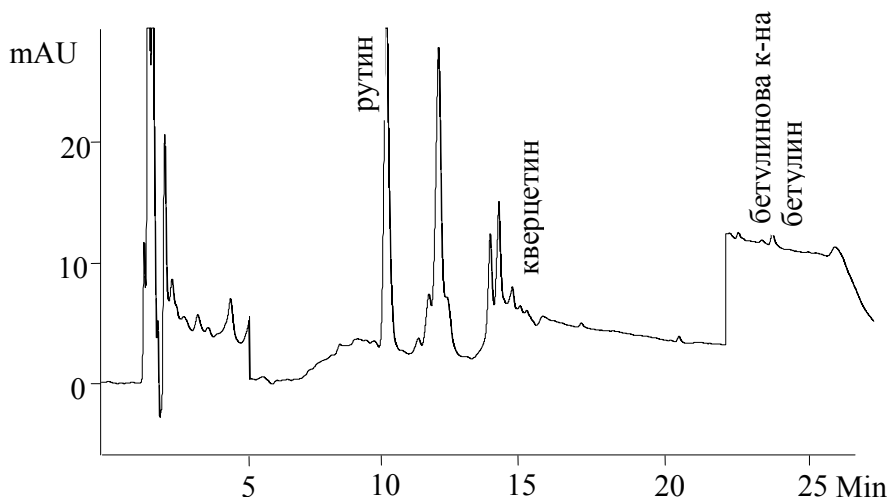
Статистическата достоверност на разликите е оценявана с помощта на критерия t за сравняване на показатели за относителен дял, при ниво на значимост $\alpha < 0.05$. Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

HPLC методът за едновременно количествено определяне е разработен въз основа на посочените в литературата (11, 17, 18) като е съобразен с природата на изследваните вещества и хроматографската система, с която разполагаме. На фиг. 1 е показана хроматограма на стандартна смес от рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин, а на фиг. 2 – на екстракт Д60.



Фигура 1. Хроматограма на стандартна смес от рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин



Фигура 2. Хроматограма на етанолов екстракт Д60 от *Folia Betulae Alba*

Използването на различни технологични подходи и екстрагенти обуславя разликата в концентрацията на биологично активните вещества. Получените данни представени на табл. 2 показват, че рутин се извлича в по-голяма степен при повишена температура и по-ниска концентрация на етанол (Д60), което се определя от неговата гликозидна структура. Неполярната структура на бетулина и бетулиновата киселина вероятно е причината за по-доброто им извличане с високо концентриран етилов алкохол (М96). Резултатите показват, че при екстракт П60 има само следи от бетулин, а при М96 концентрацията му е най-висока. Известно е, че бетулинът е нестабилен и лесно се окислява до бетулинова киселина (19). В екстракт М96 съдържанието на кверцетин е най-високо в сравнение с другите модели. Температурата също е фактор за по-пълното извличане на изследваните вещества. При мацерация с 60%-ен етанол и нагряване се постига ефекта на 96%-ия етанол при перколация върху екстракцията на кверцетин, бетулинова киселина и бетулин.

Таблица 2. Съдържание на рутин, кверцетин, бетулинова к-на и бетулин в моделните екстракти

Вещество, ($\mu\text{g/ml}$)	Рутин	Кверцетин	Бетулинова киселина	Бетулин
Екстракт				
П96	26.3 \pm 1.4	7.5 \pm 0.5	46.4 \pm 2.5	19.1 \pm 1.5
П60	35.4 \pm 2.7	6.0 \pm 0.3	34.4 \pm 2.1	следи
М96	27.5 \pm 2.1	8.9 \pm 0.5	76.6 \pm 3.1	35.0 \pm 1.9
Д60	38.6 \pm 2.9	6.5 \pm 0.3	46.3 \pm 2.7	18.4 \pm 1.1

Получаването на екстракти може да бъде провеждано по различен начин в зависимост от желания ефект върху различни патологични състояния.

Изследванията са финансирани по проект НО-8/2009 от Фонд „Научни изследвания“ към Медицински университет – Пловдив.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nuengchamnong N., Hermans-Lokkerbol A., Ingkaninan K. (2004) Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal*, 12, 25-37
2. Prokofeva N., Anisimov M., Kiseleva M., Rebachuk N., Pokhilo N. (2002) Cytotoxic activity of dammarane triterpenoids from birch leaves. *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, 645-649
3. Setzer W., Setzer M. (2003) Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem.*, 3, 540-56
4. Demirci B., Paper D., Demirci F., Can Baser K., Franz G., Essential Oil of *Betula pendula* Roth. Buds. *Advance Access Publication* 6 October 2004
5. Klinger W., Hirschelmann R., Süß J.(1989) Birch sap and birch leaves extract: screening for antimicrobial, phagocytosis-influencing, antiphlogistic and antipyretic activity. *Pharmazie.*, 44, 558-60
6. Kandaswami C., Lee L., Lee P., Hwang J., Ke F., Huang Y., Lee M. (2005) The antitumor activities of flavonoids, *In Vivo.*, 19, 895-909
7. Smullen J., Koutsou G., Foster H., Zumbé A., Storey D. (2007) The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, 41, 342-9
8. Cushnie T., Lamb A. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, 26, 343-56
9. Pepeljnjak S., Kalodera Z., Zovko M. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Herit. *Acta Pharm.*, 55, 431-435
10. Drag M., Surowiak P., Drag-Zalesinska M., Dietel M., Lage H., J. Oleksyszyn, (2009) Comparison of the Cytotoxic Effects of Birch Bark Extract, Betulin and Betulinic Acid Towards Human Gastric Carcinoma and Pancreatic Carcinoma Drug-sensitive and Drug-Resistant Cell Lines. *Molecules.*, 14, 1639-1651
11. Zhao G., Yan W. , Cao D. (2007) Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 43, 959–962
12. Cowan M. (1999) Plant products as Antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, October, 564-582
13. Webster D., Taschereau P., Belland R., Sand C., Rennie R. (2008) Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol.*, 115, 140-146
14. Grassman J. (2005) Terpenoids as antioxidants. *Vitam. Horm.*, 72, 505-535
15. Ju E., Lee S., Hwang H., Kim J. (2004) Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla var. japonica*, *Life Sci.*, 74, 1013-1026
16. Rzeski W., Stepulak A., Szymański M., Sifringer M., Kaczor J., Wejksza K., Zdzisińska B., Kandefer-Szerszeń M. (2006) Betulinic acid decreases expres-

- sion of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 374, 11-20
17. Abreu I., Porto A., Marsaioli A., Mazzafera P., (2004) Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science.*, 167, 949–954
 18. Y. Zu, C. Li, Y. Fu and C. Zhao, (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 41, 714-719
 19. C. Qi-he, L. Jing, Z. Hai-feng, He Guo-qing, Fu Ming-liang (2009) The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 175–180