

ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОБЕГОВ ИВЫ ПУРПУРНОЙ (SALIX PURPUREA L.) И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИХ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ

Фролова О. О., Шевченко О. И., Компанцева Е. В., Лысенко Т. А.

Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: dskompanceva@mail.ru

Известно, что ива проявляет выраженную противовоспалительную активность и может быть с успехом использована для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата. Ива пурпурная была выбрана как объект исследования, поскольку этот вид распространен на территории Российской Федерации. Найдено, что в побегах ивы пурпурной содержатся такие биологически активные вещества, как флавоноиды, дубильные вещества, салицин, фенолокислоты. Полученные результаты позволяют предположить наличие фармакологической активности данного растительного сырья. При определении противовоспалительной активности водного извлечения однолетних побегов ивы пурпурной показано, что оно проявляет выраженное антиэкссудативное и антипролиферативное действие, сравнимое с лекарственным препаратом – кислотой ацетилсалициловой и с водным извлечением коры ивы пурпурной. Выявленные эффекты водного извлечения побегов ивы пурпурной обеспечивают регенерацию в очаге воспаления. В связи с этим побеги ивы пурпурной можно рассматривать как перспективное лекарственное растительное сырье для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Ключевые слова: ива пурпурная, побеги, флавоноиды, дубильные вещества, салицин, фенолокислоты, противовоспалительная активность.

CHEMICAL RESEARCH OF THE PURPLE WILLOW (SALIX PURPUREA L.) BRANCHES AND STUDYING OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THEIR WATER EXTRACT

Frolova O. O., Shevchenko O. I., Kompanceva E. V., Lysenko T. A.

Pyatigorsk branch of the State Budgetary Educational Establishment of Higher Professional Education "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Public Health Services of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, Kalinin avenue, 11), e-mail: dskompanceva@mail.ru

It is known, that willow exhibits the manifested anti-inflammatory effect and can be successfully applied for treatment of the locomotive system diseases. Purple willow (*Salix purpurea* L.) has been chosen as object of investigation because it's common on the territory of Russian Federation. There was determined content of such pharmacological active compounds as flavonoids, tannins, salicine and phenolic acids in the purple willow branches. The data obtained permit to assume pharmacological activity on this raw material. Anti-inflammatory activity of water extracts of a purple willow current-year branches was defined. Purple willow current-year branches decoction possess the expressed anti-exudative and antiproliferative activity, comparable with a medicinal preparation - acetylsalicylic acid and purple willow bark decoction. The taped effects of purple willow current-year branches decoction promote regeneration in the inflammation center. So, the purple willow current-year branches should be surveyed as perspective medicinal raw materials for treatment of the locomotive system diseases.

Keywords: purple willow, branches, flavonoids, tannins, salicine, phenolic acids, anti-inflammatory activity.

Введение

Весьма распространенные на сегодняшний день заболевания опорно-двигательного аппарата часто приводят к ограничению физической трудоспособности и инвалидности. В связи с этим профилактика и лечение данных нозологических форм представляет серьезную медицинскую и социальную проблему. Ассортимент лекарственных средств для терапии заболеваний суставов представлен в основном синтетическими противовоспалительными

препаратами (ПВП). Однако их существенным недостатком являются побочные эффекты, возникающие при длительном приеме (прежде всего, это эрозивно-язвенные поражения желудочно-кишечного тракта). В то же время известно о наличии лекарственных растений, обладающих противовоспалительным эффектом. Мировые тенденции свидетельствуют о росте их применения в терапии заболеваний суставов. Чаще всего речь идет о сочетанном приеме, позволяющем существенно снизить дозу синтетических ПВП и предотвратить побочные эффекты гастротоксического характера [6, 10].

В России на данный момент появляются биологически активные добавки на растительной основе, однако, их ассортимент пока недостаточен. В связи с этим особенно актуально создание новых отечественных лекарственных препаратов и лечебно-профилактических средств для применения при заболеваниях суставов. Для этого необходимы значительные ресурсы лекарственных растений, произрастающих на территории России. Известно, что при заболеваниях опорно-двигательного аппарата во многих зарубежных странах эффективно используются различные виды ивы и препараты на их основе. Важным преимуществом этого растения является то, что во многих регионах России имеются большие запасы дикорастущего сырья. Кроме того, научно обоснована и возможность успешного культивирования ивы. Все вышеперечисленное, несомненно, открывает перспективы для подробного изучения отечественных видов ивы с целью включения в Государственную Фармакопею, а также создания лекарственных препаратов и лечебно-профилактических продуктов.

Объектом нашего исследования является ива пурпурная (*Salix purpurea* L.), ареал которой занимает практически все районы Европейской части России, Западной Сибири, Кавказа [7]. Проведены исследования, свидетельствующие о возможности культивирования данного вида в пойме рек Центрально-Черноземного региона и Кубано-Приазовской низменности (продуктивность составляет от 9,5 до 25,9 т/га) [2,3].

Цель исследования – определение содержания биологически активных веществ в однолетних побегах ивы пурпурной и оценка противовоспалительного действия их водного извлечения.

Материал и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы побегов (однолетних ветвей) ивы пурпурной, заготовленные в июле 2009 г. и 2010 г. в Ставропольском крае (г. Пятигорске, берег реки Подкумок). Сбор сырья проводился путем срезки ветвей с помощью ножа или секатора. Побеги были высушены в естественных условиях. Следует отметить, что в официальной медицине чаще применяется кора ивы, реже – листья. Нами предлагаются побеги, которые объединяют в себе биологически активные вещества (БАВ) и коры, и

листьев. Использование побегов позволяет упростить заготовку сырья и существенно увеличить сырьевую массу.

Изучение химического состава

1. Для идентификации **флавоноидов** получали извлечения экстракцией спиртом этиловым 70 % (без гидролиза) и спиртом этиловым 70 % с добавлением 1 % кислоты хлористоводородной концентрированной (кислотный гидролиз). Соотношение сырье экстрагент составляло 1 : 10.

Качественное определение **флавоноидов** проводили с помощью цианидиновой пробы; реакции с кислотой борной; с ванилином; с раствором свинца ацетата основного; с раствором аммиака и методом тонкослойной хроматографии. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах Silufol в системе растворителей: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4: 1: 2). В качестве проявителей использовали пары аммиака и 2 % спиртовой раствор алюминия хлорида. Детектирование зон адсорбции проводили в видимом свете и в УФ-свете при длинах волн 254 нм и 360 нм [9]. В качестве стандартных образцов использовали 0,05 % растворы стандартных образцов (СО) рутин, нарингина, лютеолина, кверцетина, изосалипурпозид в спирте этиловом 70 %.

Количественное содержание флавоноидов в пересчете на рутин определяли методом дифференциальной спектрофотометрии, основанным на реакции комплексообразования с алюминием хлоридом согласно ГФ XI (вып.2, 1990, с.323). Аликвота извлечения составляла 5 мл. Определение проводили на спектрофотометре СФ-2000 с УФ-детектором.

2. Наличие **дубильных веществ (ДВ)** в водных извлечениях побегов ивы пурпурной (1:10) доказывали химическими реакциями (с железом аммониевыми квасцами; с кислотой уксусной и свинца ацетатом) [9]. Количественное содержание **ДВ** определяли перманганатометрическим методом согласно ГФ XI изд. (вып.1, 1987, с.286).

3. Идентификацию **салицина** проводили методом ТСХ в водном извлечении, полученном в соотношении 1 : 25. Хроматографирование осуществляли на пластинах Silufol в системе растворителей этилацетат-кислота, муравьиная-вода (80:13:7). Сравнение проводили с 0,1 %-ным раствором СО салицина в спирте этиловом 70 % [8].

Количественное содержание салицина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с методическими указаниями [6]. Анализ водного извлечения (1:100) проводили на хроматографе жидкостном микроколоночном «Милихром-5-3» с использованием системы регистрации и обработки спектрометрической информации «Unichrom 4.6». Условия хроматографирования: подвижная фаза – смесь ацетонитрила и 2 % раствора кислоты муравьиной (5:95), доведенная 1 М раствором натрия гидроксида до значения pH=3. Скорость потока

подвижной фазы – 100 мкл/мин; объем пробы 10 мкл; детектирование осуществляли при длине волны 270 нм. Время анализа составляло 20 минут. В колонку хроматографа попеременно вводили равные объемы 0,05 % водного раствора СО салицина и испытуемого водного извлечения и измеряли площади пиков салицина. После ввода каждой пробы проводили регенерацию колонки

4. Качественное определение **фенолокислот** проводили методом ТСХ на пластинах Silufol в системе растворителей н-пропанол–аммиак (2:1). Хроматографировали этилацетатное извлечение, полученное для количественного определения, в сравнении с 0,1 % растворами СО (кислот феруловой, коричной, салициловой, п-аминобензойной, кофейной) в спирте этиловом 70 %. Проявляли хроматограмму 5 %-ным спиртовым раствором калия гидроксида и свежеприготовленным диазореактивом [1].

Количественное определение фенолкарбоновых кислот выполняли экстракционно-спектрофотометрическим методом. Он используется в случае высокого содержания в сырье флавоноидов, которые поглощают УФ-свет в той же области и мешают прямой спектрофотометрии. Сущность выбранной нами методики заключается в избирательной экстракции фенолокислот в этилацетат. Затем измеряется оптическая плотность раствора при 325 нм [1]. Определение проводили на спектрофотометре СФ-2000 с УФ-детектором.

В расчетах количественного содержания БАВ было учтено содержание влаги в побегах ивы пурпурной, которое составило $6,17 \pm 0,28$ %.

Определение противовоспалительной активности

В соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р. У. Хабриева рекомендуется оценивать эффективность противовоспалительного действия на модели фетровой гранулемы (хроническое пролиферативное воспаление). Об эффективности испытуемого препарата судят по степени экссудации и пролиферации. Для подтверждения фармакологического действия побегов ивы пурпурной был приготовлен отвар в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XI издания (вып.2, 1990, с.147). Эксперименты проведены на белых крысах по общепринятой методике [4]. Отвар побегов ивы пурпурной вводили в дозе, соответствующей 200 мл отвара на человека в день. Препаратом сравнения являлась субстанция ацетилсалициловой кислоты (АСК) в дозе 125 мг/кг, соответствующей приему человеком 1,5 г АСК в сутки. Вещество вводилось в виде водной суспензии на Твине-80. Также сравнивали противовоспалительную активность отвара побегов ивы пурпурной с отваром коры (традиционно применяемого сырья). Достоверность расчетных результатов оценивали параметрически по Т-критерию Стьюдента.

Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05. Объем выборки $n=6$ в каждой группе животных.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение химического состава

1. Определение флавоноидов. Результаты химических реакций подтвердили наличие в побегах ивы пурпурной флавоноидов. При хроматографировании спиртового извлечения побегов ивы пурпурной, полученного без гидролиза, не удалось добиться разделения веществ (на хроматографической пластинке наблюдалась зона адсорбции в виде сплошной полосы). В связи с этим проводили кислотный гидролиз извлечения. В результате при хроматографировании были обнаружены 3 зоны адсорбции, идентифицированные по совпадению значения R_f и окраске со стандартными образцами нарингина ($R_f=0,36$), лютеолина ($R_f=0,73$) и изосалипурпозида ($R_f=0,81$).

Чтобы определить, на какой флавоноид вести пересчет при количественном определении, измеряли спектры поглощения комплекса каждого из них с алюминия хлоридом и спектр спиртового извлечения. Установлено, что нарингин с алюминия хлоридом комплекс не образует, изосалипурпозид имеет максимум 423 нм, лютеолин – 405 нм. А максимум поглощения комплекса флавоноидов спиртового извлечения побегов составил 400-405 нм (рисунок 1). Это позволяет сделать вывод, что именно лютеолин является преобладающим флавоноидом в извлечении, поэтому мы провели определение флавоноидов в пересчете на него.

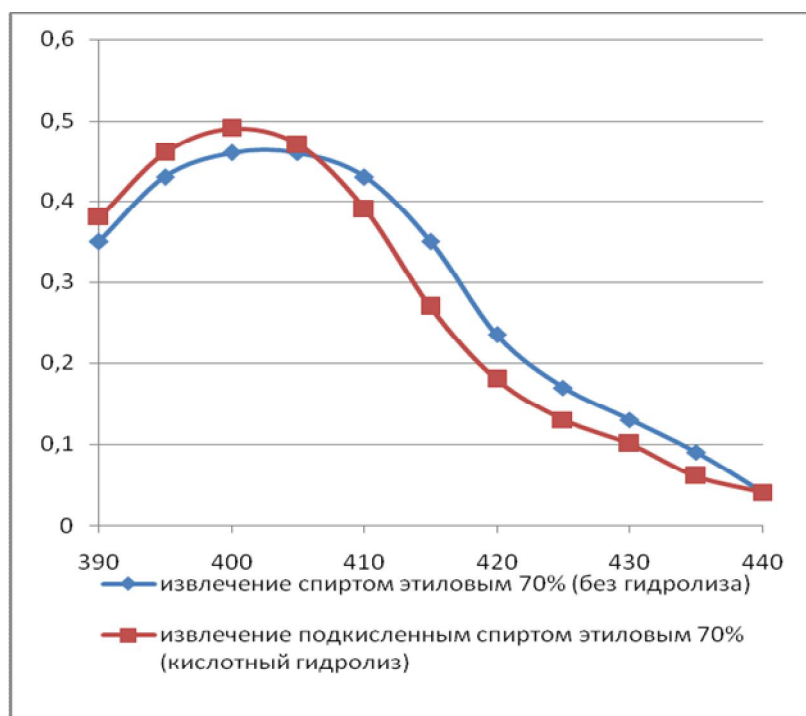


Рисунок 1. Спектр поглощения комплекса флавоноидов извлечения побегов ивы пурпурной с алюминия хлоридом (без гидролиза и после кислотного гидролиза)

Для сравнения проводили экстракцию флавоноидов спиртом этиловым 70 % без гидролиза и с добавлением кислоты хлористоводородной. Кислотный гидролиз позволил получить более выраженный максимум на спектре и повысить оптическую плотность. В связи с этим в дальнейшем методику количественного определения проводили именно с извлечением после кислотного гидролиза. Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в побегах ивы пурпурной составило $1,15 \pm 0,05$ %.

2. Определение ДВ. В результате проведенных химических реакций было выяснено, что анализируемые образцы содержат конденсированные ДВ. В связи с этим мы провели пересчет на них. Для этого были внесены изменения в формулу (вместо титра 0,004157 г/мл, соответствующего танину, в расчетах титр принимали равным 0,00582 г/мл). Содержание конденсированных дубильных веществ составило в среднем $8,44 \pm 0,31$ %, что является достаточно высоким показателем.

3. Определение салицина. Методом ТСХ в извлечении из побегов ивы пурпурной был идентифицирован салицин по совпадению значения R_f со стандартным образцом ($R_f=0,56$). Методом ВЭЖХ определили количественное содержание салицина в побегах ивы пурпурной, которое составило $0,06 \pm 0,02$ %.

4. Определение фенолкарбоновых кислот. По результатам ТСХ в извлечении побегов ивы пурпурной нами были идентифицированы (по совпадению значения R_f и окраске при проявлении со стандартными образцами) кислота феруловая ($R_f=0,79$), коричная ($R_f=0,73$) и п-гидроксибензойная ($R_f=0,56$). При количественном определении фенолокислот пересчет проводили на кислоту феруловую по удельному показателю поглощения (586). Содержание составило $1,20 \pm 0,07$ %.

Результаты определения БАВ в побегах ивы пурпурной представлены в таблице 1

Таблица 1. Химический анализ извлечений побегов ивы пурпурной

Группа БАВ	Результаты анализа	
	качественного	количественного
Флавоноиды	обнаружены нарингин, лютеолин и изосалипурпозид	$1,15 \pm 0,05$ % в пересчете на лютеолин
Дубильные вещества	обнаружены конденсированные ДВ	$8,44 \pm 0,31$ %
Салицин	обнаружен	$0,06 \pm 0,02$ %
Фенолокислоты	обнаружены кислота феруловая, коричная и п-гидроксибензойная	$1,20 \pm 0,07$ % в пересчете на кислоту феруловую

Таким образом, при фитохимическом анализе однолетних побегов ивы пурпурной идентифицирован ряд БАВ и установлено достаточно высокое содержание флавоноидов, дубильных веществ конденсированной группы и фенолокислот. Салицин содержится в незначительном количестве, но он является специфичным веществом для растений рода Ива, и поэтому его обнаружение является диагностическим признаком. Богатый химический

состав побегов ивы пурпурной может обеспечить суммарный фармакологический эффект извлечений ивы.

Определение противовоспалительной активности

Результаты определения экссудации и пролиферации на фоне введения экспериментальным животным отвара побегов ивы пурпурной и препарата сравнения представлены в таблице 2.

Таблица 2. Краткий обзор результатов определения противовоспалительной активности отвара побегов ивы пурпурной и препарата сравнения

Группа животных	Экссудация (мг)	Пролиферация (мг)
*контроль	306,29±7,25	55,86±2,40
#АСК	190,54±21,63	30,06±1,96
Отвар побегов ивы пурпурной	165,62±3,32*	37,83±1,97*#
Отвар коры ивы пурпурной	268,48±12,64*#	54,70±1,74 #
Примечание: * – достоверно относительно контроля; # – достоверно относительно АСК		

Таким образом, отвар побегов ивы пурпурной достоверно уменьшил экссудацию на 46 % по сравнению с контрольной группой, на 13 % по сравнению с препаратом сравнения АСК (достоверно результаты не отличались). При анализе влияния отвара побегов ивы пурпурной на пролиферативную стадию воспаления установили, что он достоверно угнетает образование грануляционной ткани на 33 % по отношению к контрольной группе и несколько уступает аспирину.

Сравнивая результаты, полученные для отвара побегов ивы пурпурной, с эффективностью коры ивы пурпурной, можно сделать вывод о большей эффективности извлечения побегов (на 38 % по угнетению экссудации, на 31 % – по угнетению пролиферации).

Полученные результаты фармакологического эксперимента свидетельствуют о возможности применения побегов ивы наряду с синтетическими ПВС при терапии воспалительных заболеваний суставов, а также для их профилактики.

Выводы

1. Впервые изучены некоторые группы БАВ побегов ивы пурпурной. Установлено высокое содержание флавоноидов (лютеолина, изосалипурпозид, нарингина) в сумме 1,2 % в пересчете на лютеолин; дубильных веществ конденсированной группы – в сумме около 8,5 %; фенолокислот (феруловой, п-гидроксibenзойной, коричной) в количестве 1,2 % в пересчете на кислоту феруловую. Содержание салицина составило 0,06 %. Использование однолетних побегов ивы пурпурной позволит в значительной мере расширить сырьевую базу и уменьшить вред, наносимый растению при заготовке традиционного сырья – коры.

2. Изучена противовоспалительная эффективность отвара побегов ивы пурпурной. В предварительных исследованиях выявлена выраженная антиэкссудативная и

антипролиферативная активность, сравнимая с кислотой ацетилсалициловой. В связи с этим побеги ивы пурпурной следует рассматривать как перспективное лекарственное растительное сырье. На его основе возможно получение эффективных и безопасных отечественных противовоспалительных лекарственных средств, применяемых для лечения и профилактики заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Список литературы

1. Ларькина М. С., Кадырова Т. В., Ермилова Е. В. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого // Химия растит. сырья. – 2008. – № 3. – С.71-74.
2. Логинова Л. А. Продуктивность и энергетический потенциал ивовых ценозов на примере Воронежской области: автореф. дис... канд. биол. наук. – Воронеж, 2010. – 24 с.
3. Максименко А. П. Лесоразведение в Восточном Приазовье: Автореф. дис... д-ра сельскохозяйств. наук. – Воронеж, 2003. – 48 с.
4. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
5. МУ 08-47/172. Кора ивы и осины, экстракты из них и БАД на их основе. ВЭЖХ метод определения массовой концентрации салицина – Введ. 2005. – Томск: Томск. политех. ун-т, 2005. – 17 с.
6. Прохоров И. Е. Место и роль использования фитопрепаратов в терапии суставной формы ювенильного ревматоидного артрита // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2008. – Т. 17, № 1. – С. 81-84.
7. Скворцов А. К. Ивы СССР. Систематический и географический обзор. – М.: Наука, 1968. – С. 33-53, 107-110, 259.
8. ТУ 9199-006-33150849-2004. Экстракт ивы сухой. – Введ. 2004. – СПб.: ОКК ХАРМС, 2004. – 7 с.
9. Химический анализ биологически активных веществ лекарственного растительного сырья и продуктов животного происхождения: учеб. пособие / М. Д. Решетникова [и др.], под ред. Г. И. Олешко. – Пермь, 2004. – С.220-221.
10. Chrubasik S. Evidence of effectiveness of herbal anti-inflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain // *Phytother. Res.* – 2007. – Vol. 21. – P 675-683.

Рецензенты:

Оганесян Эдуард Тоникович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии, Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Волгоград.

Попова Ольга Ивановна, доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармакогнозии, Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Волгоград.