

ФЛАВОНОИДЫ КОРЫ И ПОБЕГОВ ИВЫ ВАВИЛОНСКОЙ И ЕЕ ГИБРИДА С ИВОЙ БЕЛОЙ

Дементьева Т.М.¹, Компанцева Е.В.², Айрапетова А.Ю.², Фролова О.О.²

¹Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, Россия, e-mail:oxifarm@mail.ru

Настоящая статья посвящена исследованию флавоноидов коры и побегов ивы вавилонской (*Salixbabylonica*L.) и ее гибрида с ивой белой (*Salixbabylonica* x *alba* (S.SalamoniiCarriere)). С помощью метода тонкослойной хроматографии в исследуемых образцах идентифицированы несколько индивидуальных веществ. Экспериментально подобраны оптимальные условия методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в объектах исследования. Разработанная методика является валидной по критериям специфичность, линейность, правильность, аналитическая область, прецизионность (повторяемость). В коре ивы вавилонской содержание флавоноидов колеблется в пределах от 0,14 % до 0,46 %; в коре гибрида ивы вавилонской с ивой белой – от 0,08 % до 0,16 %. Содержание флавоноидов в побегах ивы вавилонской колеблется от 0,74 % до 1,15 %, в побегах гибрида – от 0,75 % до 1,14 %. Содержание флавоноидов в образцах сырья, заготовленных в 2012–2015 гг., не имеет четкой тенденции сезонных колебаний, но полученные данные позволяют установить минимальные пределы содержания флавоноидов при составлении проектов нормативной документации (для побегов ивы не менее 0,7 %, для коры – не менее 0,08 %).

Ключевые слова: флавоноиды, ива вавилонская (*Salixbabylonica*L.), гибрид ивы вавилонской с ивой белой (*Salixbabylonica* x *alba* (S.SalamoniiCarriere)), кора, побеги.

FLAVONOIDS OF THE WEEPING WILLOW AND ITS HYBRID WITH WHITE WILLOW BARK AND BRANCHES

Dementyeva T.M.¹, Kompanceva Y.V.², Airapetova A.Y.², Frolova O.O.²

¹ Far-Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russia

² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia, e-mail:oxifarm@mail.ru

The present article is dedicated to the study of flavonoids in the bark and branches of the weeping willow (*Salix babylonica* L.) and its hybrid with the white willow (*Salix babylonica* x *alba* (S. SalamoniiCarriere)). Several individual substances were identified in the samples using thin layer chromatography. The study tested the optimal conditions for quantitative determination of the total flavonoids content in the objects. The developed method is valid according to the criteria of specificity, linearity, accuracy, analytical area, precision (repeatability). In the weeping willow bark flavonoids content varies from 0.14 % to 0.46 %; in the bark of a hybrid – from 0.08 % to 0.16 %. The content of flavonoids in the weeping willow branches ranges from 0.74 % to 1.15 % and in the hybrid branches – from 0.75 % to 1.14 %. The content of flavonoids in the raw material samples harvested in 2012–2015, has no clear trends for seasonal variations, but the data obtained allow to establish minimum limits of the flavonoids content for the projects of normative documents (for willow branches not less than 0.7 %, for willow bark – no less than 0.08 %).

Keywords: flavonoids, weeping willow (*Salix babylonica* L.), hybrid of weeping willow with white willow (*Salix babylonica*x*alba* (S.SalamoniiCarriere)), bark, branches.

Лекарственное растительное сырье, содержащее флавоноиды, широко применяется в медицинской практике в качестве источника желчегонных, гепатопротекторных, антиоксидантных, ангиопротекторных, диуретических, противовоспалительных, противоязвенных, спазмолитических, гемореологических и других лекарственных средств [5,7].

Богато флавоноидами семейство Ивовых, объединенных в три рода – тополь (*Populus*L.), ива (*Salix*L.) и чозения (*Chosenia*Nac). На территории России весьма распространен род Ива (более 80 видов), представители которого играют важную роль в формировании растительного покрова, принадлежат к доминирующим ландшафтным видам в местах повышенного увлажнения, а также успешно культивируются [2]. Принято считать, что основное действие коры ивы – противовоспалительное– обусловлено, прежде всего, содержанием в ней салицина, который в ходе метаболизма превращается в салициловую кислоту. Однако, по современным экспериментальным данным, наряду с салицином выраженную фармакологическую активность проявляют и полифенольные соединения [11]. Также экспериментально доказано, что побеги ивы белой проявляют противовоспалительную активность, сопоставимую с корой, несмотря на сравнительно низкое содержание в них салицина [10]. Это свидетельствует, что эффект обеспечивается всем комплексом биологически активных веществ (БАВ), в том числе и флавоноидами, и указывает на необходимость исследований данной группы соединений в различных представителях рода Ива.

За последние годы проводился ряд научных исследований отечественных видов ивы. А.И. Бонцевичем проведен химический анализ коры ивы остролистной (*S. acutifolia*Willd.) [1]. О.О. Хитевой изучен химический состав коры и однолетних побегов ивы белой (*Salix*alba L.), коры ивы трехтычинковой (*S. triandra* L.) и ивы пурпурной (*S. purpurea* L.) [10]. Во всех указанных объектах были обнаружены флавоноиды, при этом их содержание оказалось достаточно высоким (например, в коре ивы остролистной- 2,8%, а в побегах ивы белой - 1,4%). В связи с этим актуальным является изучение и других отечественных видов ивы с целью расширения сырьевой базы и получения ценного противовоспалительного средства.

Цель работы – обнаружение и количественное определение флавоноидов в коре и побегах ивы вавилонской (*Salix*babylonica L.) и ее гибрида с ивой белой (*Salix*babylonica x alba L.).

Материал и методы исследования

Объектами исследования являются высушенные и измельченные до размера 1 мм кора и однолетние побеги (ветви длиной до 50 см) ивы вавилонской (*Salix*babylonica L.) и ее гибрида с ивой белой (*Salix*babylonica x alba L.), собранные в Ставропольском крае в разное время года с 2012 по 2015 г.

Для обнаружения флавоноидов в исследуемых образцах готовили извлечение: 1,0 г сырья заливали 20 мл спирта этилового 70 % и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, далее проводили качественные реакции общепринятыми реактивами [3,6,8]. Идентификацию флавоноидов методом тонкослойной хроматографии

(ТСХ) проводили в спиртовых извлечениях в системе растворителей н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) [3,5]. На хроматографические пластинки «Сорбфил УФ-254» наносили по 30мкл спиртовых извлечений коры, по 20 мкл спиртовых извлечений побегов ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой и по 5 мкл 0,05 % спиртовых растворов стандартных образцов (СО) рутина, геспередина, лютеолина, кверцетина, нарингенина, изосалипурпозид. После хроматографирования пластинки подсушивали и просматривали в видимом и УФ свете. Идентификацию пятен проводили, обрабатывая хроматограммы 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида.

Для установления оптимальных условий экстракции использовали различные условия экстрагирования, изменяя вид экстрагента, время экстракции, соотношения сырья и экстрагента, однократную и дробную экстракцию.

Для количественного определения флавоноидов в коре и побегах ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой использовали методику дифференциальной спектрофотометрии, основанную на образовании комплекса с алюминия хлоридом [4].

Валидационные испытания проводили в соответствии с проектом ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик» [9]. При построении градуировочного графика для определения линейности методики различные объемы раствора А (1мл; 2,5 мл; 5мл; 7,5 мл; 10 мл) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, и далее проводили определение как описано в методике количественного определения. При определении правильности использовали метод добавок (5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и добавляли 0.05 % спиртовый раствор СО рутина (0,5; 0,75 и 1 мл), и далее проводили определение как описано в методике количественного определения.

Результаты исследования и их обсуждение

С помощью качественных реакций обнаружили в коре ивы вавилонской и ее гибрида, а также в побегах гибрида флавонолы, флаваноны, флавоны и катехины, а в побегах ивы вавилонской – флавонолы, флаваноны и флавоны. С помощью метода ТСХ удалось идентифицировать в коре и побегах ивы вавилонской рутин, лютеолин, нарингин; в коре гибрида рутин и кверцетин, а в побегах гибрида рутин, кверцетин и нарингин.

При изучении условий экстракции флавоноидов оказалось, что наиболее полное извлечение флавоноидов достигается при соотношении сырья и экстрагента 1:100, использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70 % и проведении трехкратной экстракции по 30 мл в течение 30 минут (табл. 1). Наличие в коре и побегах рутина (метод ТСХ) послужило основанием использовать его в качестве стандартного образца при разработке методики. Предварительно было определено, что максимум поглощения комплекса извлечения с 2 % раствором алюминия хлорида находится при 410 ± 3 нм, что

совпадает с максимумом поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом (412 нм). Результаты исследования устойчивости окраски комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом свидетельствуют о том, что интервал времени, в течение которого происходит образование стабильного комплекса с алюминия хлоридом, составляет 40 минут, а время, при котором раствор стабилен и возможно измерение оптимальных показаний оптической плотности, составляет 80 минут от момента стабилизации окраски.

Таблица 1

Влияние условий экстракции на полноту извлечения суммы флавоноидов из сырья, заготовленного в октябре 2013 года

Условия экстракции	Содержание, %			
	Кора ивы вавилонской	Побеги ивы вавилонской	Кора гибрида	Побегигибрида
Экстрагент	Однократная экстракция в течение 1 часа при соотношении сырье/экстрагент 1:50			
Спирт этиловый 40%	0,143	0,689	0,066	0,799
Спирт этиловый 70%	0,109	0,761	0,078	0,820
Спирт этиловый 95%	0,118	0,540	0,072	0,763
Время экстракции	Однократная экстракция 70% спиртом этиловым при соотношении сырье/экстрагент 1:50			
1 час	0,109	0,761	0,078	0,820
1 час 30 мин	0,107	0,780	0,072	0,862
2 часа	0,110	0,775	0,076	0,878
Соотношение сырья и экстрагента	Однократная экстракция в течение 1 часа			
1:50	0,109	0,761	0,078	0,820
1:100	0,121	0,674	0,081	0,760
Кратность экстракции	Экстракция 70% спиртом этиловым при соотношении сырье/экстрагент 1:100			
Однократная экстракция (60 минут)	0,121	0,674	0,081	0,760
Двукратная экстракция (50мл по 30минут)	0,152	0,810	0,107	0,910
Трехкратная экстракция (30мл по 30минут)	0,172	0,904	0,129	1,136

Для включения данной методики в проект нормативной документации на ЛРС устанавливали ее валидность по критериям специфичность, линейность, правильность, аналитическая область, прецизионность (повторяемость).

Валидационные испытания проводили на извлечениях из побегов ивы вавилонской, собранных в октябре 2013 года в Ставропольском крае.

Критерий **специфичность** определяли, используя метод добавок. Для этого к извлечению добавляли разные объемы 0,05 % стандартного раствора рутина. Наблюдалось увеличение поглощения при 410 нм пропорционально объему вносимой добавки (табл. 2).

Далее определения критерия **линейности** определяли уравнение регрессии $y = b \cdot x + \alpha$ (x – концентрация определяемого вещества; y – величина отклика; b – угловой коэффициент; α – свободный член). В результате уравнение линейной регрессии имело вид: $y = 932,48x + 0,0004$, а значение коэффициента корреляции составило 0,995, что соответствует требованиям ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик» $|r| \geq 0,99$, то есть методика линейна.

Аналитическую область методики устанавливали по диапазону экспериментальных данных, находящихся в пределах от 0,0001255 г/мл до 0,0006479 г/мл.

Правильность методики определяли методом добавок. Рассчитанный критерий Стьюдента составил 2,11. Это значит, что выполняется неравенство $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}(P, f)$, так как $2,11 < 4,30$ и можно говорить о том, что результаты не отягощены систематической ошибкой, значит методика правильна (табл.2).

Таблица 2

Определение правильности методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов методом добавок

Добавлено СО рутина		Оптическая плотность A_x	μ , г истинное значение	X_i , г найденное значение	R, % Открыва- емость	Метрологи- ческие характерис- тики
мл	Г					
0	0	0,390	0,00045165	-	-	R = 100,3%
0,5	0,00025	0,649	0,00070165	0,00070377	100,3	$S^2 = 0,016$
0,75	0,000375	0,767	0,00082665	0,00083045	100,5	S = 0,126
1,0	0,00050	0,881	0,00095165	0,00095279	100,1	$t_{\text{выч.}} = 3,35$

Прецизионность (повторяемость) методики определяли в 6 отдельных навесках сырья. При оценке полученных результатов ориентировались на рекомендации американской ассоциацией аналитической химии (АОАС), в соответствии с которыми показатель RSD не должен превышать 2 %. Результаты, приведенные в таблице 3, свидетельствуют о том, что показатель RSD составил 1,97 %, т.е. методика прецизионна.

Таблица 3

Результаты определения прецизионности методики определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии

Навеска сырья, г	Оптическая плотность	Содержание суммы флавоноидов, %	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологические характеристики
1,00100	0,3555	0,8310	-0,0279	0,000778	$X = 0,8589\%$ $SD = 0,01691$ $RSD = 1,97\%$
1,00700	0,3796	0,8821	-0,0021	0,000004	
0,99410	0,3640	0,8568	0,0232	0,000538	
1,00810	0,3744	0,8690	0,0101	0,000102	
1,00220	0,3678	0,8587	-0,0002	0,00000004	
0,99960	0,3657	0,8560	-0,0029	0,000008	

Используя разработанную методику, определяли количественное содержание флавоноидов в коре и однолетних побегах изучаемых видов ив, заготовленных в различные сезоны года (с 2012 года по 2015 год). Полученные данные приведены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в исследуемых образцах сырья, собранных в различные сезоны 2012-2015 г

Наименование Сырья	Содержание флавоноидов, %								
	Осень 2012	Весна 2013	Лето 2013	Осень 2013	Весна 2014	Лето 2014	Осень 2014	Весна 2015	Лето 2015
Кора ивы вавилонской	0,154	0,135	0,172	0,173	0,139	0,215	0,415	0,463	0,314
Побеги ивы вавилонской	0,740	*	0,904	0,864	*	0,995	1,159	1,419	1,057
Кора гибрида	0,135	0,090	0,129	0,152	0,081	0,138	0,157	0,158	0,139
Побеги гибрида	0,880	*	1,136	0,881	*	1,035	0,748	0,940	0,957
* – в период заготовки сырья листья на ветках отсутствовали.									

Как следует из представленных в таблице 4 данных, содержание флавоноидов в коре ивы вавилонской колеблется от 0,14 % до 0,46 % и оно выше, чем в коре гибрида ивы вавилонской и ивы белой (от 0,08 % до 0,16 %). Содержание флавоноидов в побегах ивы вавилонской колеблется от 0,74 % до 1,15 %, в побегах гибрида ивы вавилонской и ивы белой – от 0,75 % до 1,14 %. В побегах ив содержание флавоноидов значительно превышает их содержание в коре. В зависимости от сезона сбора содержание флавоноидов было не постоянным как в коре, так и в побегах. В разные годы сбора также наблюдается изменение в содержании. Тем не менее, полученные данные позволяют установить минимальные

пределы содержания флавоноидов при составлении проектов нормативной документации (для побегов ивы не менее 0,7 %, для коры – не менее 0,08 %).

Выводы

1. С помощью метода ТСХ в коре и побегах ивы вавилонской идентифицированы рутин, лютеолин, нарингин; в коре гибрида – рутин и кверцетин, а в побегах гибрида – рутин, кверцетин и нарингин
2. Экспериментально подобраны оптимальные условия методики количественного определения суммы флавоноидов в объектах исследования (соотношение сырья и экстрагента 1:100, использование в качестве экстрагента спирта этилового 70%-ного и проведение трехкратной экстракции по 30 мл в течение 30 минут).
3. Разработанная методика является валидной по критериям специфичность, линейность, правильность, аналитическая область, прецизионность (повторяемость) и может быть использована для количественного определения суммы флавоноидов в коре и однолетних побегах ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой, а также рекомендована для включения в раздел «Числовые показатели» нормативного документа на данный вид лекарственного растительного сырья.
4. В коре ивы вавилонской содержание флавоноидов колеблется в пределах от 0,14 % до 0,46 %; в коре гибрида ивы вавилонской с ивой белой - от 0,08 % до 0,16 %. Содержание флавоноидов в побегах ивы вавилонской колеблется от 0,74 % до 1,15 %, в побегах гибрида ивы вавилонской с ивой белой – от 0,75 % до 1,14 %.
5. Содержание флавоноидов в образцах сырья, заготовленных в 2012-2015 гг., не имеет четкой тенденции сезонных колебаний, но полученные данные позволяют установить минимальные пределы содержания флавоноидов при составлении проектов нормативной документации (для побегов ивы не менее 0,7 %, для коры – не менее 0,08 %).

Список литературы

1. Бонцевич А.И. Фитохимическое исследование коры ивы остролистной: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. – Самара, 2007. – 25 с.
2. Валягина-Малюткина Е.Т. Ивы европейской части России: иллюстр. пособие для работников лесного хозяйства. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2004.- 217с.
3. Гринкевич Н.И. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие/ Н.И. Гринкевич, Л. Н Сафронич. – М.: Высшая школа, 1983. – С.82-93.
4. Зверобоя трава: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – 11-е изд.- М., 1990.- С.323.

5. Клышев Л.К. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования) /Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина.-Алма-ата: Наука, 1978. — 220 с.
6. Коренская И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины: учебное пособие для вузов/И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова.- Воронеж: Изд. Центр Воронежский ГУ., 2007. -81с.
7. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина и др. - Новосибирск: Академическое изд-во «Тео», 2007. — 232 с.
8. Лобанова А.А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья/А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.
9. Проект ОФС 42-0113-09.Валидация аналитических методик - М., 2009.
10. Хитева О.О. Изучение некоторых видов ивы, произрастающих на Северном Кавказе: автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Пятигорск, 2012. – 24 с.
11. Milde J. Kooperative Wirkungpflanzlicher Antioxidantien in pathologischrelevanten Arteriosklerose- und Arthritismodellen J. Milde // Dipl.-Ing. agr. (Univ.). – München, 2004. – 115p.

Рецензенты:

Попова О.И., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры фармакогнозии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск;

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент, профессор кафедры органической химии Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск.