

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В СЫРЬЕ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА СЕВЕРНОМ КAVKAZE

**Санникова Е.Г.**

*Аспирант кафедры фармакогнозии  
ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ*

**Компанцева Е.В.**

*Доктор фарм. наук, профессор,  
профессор кафедры фармацевтической  
и токсикологической химии  
ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ*

**Попова О.И.**

*Доктор фарм. наук, профессор,  
профессор кафедры фармакогнозии  
ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ*

**Хартюнова Е.И.**

*Кандидат фарм. наук, старший преподаватель  
кафедры фармацевтической и токсикологической химии  
ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ*

### Аннотация.

Проведен сравнительный анализ использования методов ВЭЖХ и капиллярного электрофореза (КЭ) для идентификации флавоноидов в побегах ивы трехтычинковой. Показано, что методом КЭ получены наиболее достоверные сведения о наличии рутина, лютеолина и наренгинина.

**Ключевые слова:** метод ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, флавоноиды, ива трехтычинковая, побеги

### DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN THE RAW MATERIAL OF A WILLOW TRIANDRA, GROWING IN THE NORTH CAUCASUS

**Sannikova E.G.**

*postgraduate student of the Chair of Pharmacognosy  
at PMPI – branch of Volgograd State Medical University of the Ministry*

**Kompantseva E.V.**

*Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor,  
Professor of the Chair of Pharmaceutical and toxicological chemistry  
at PMPI – branch of Volgograd State Medical University*

**Pопова O.I.**

*Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor,  
Professor of the Chair of Pharmacognosy  
at PMPI – branch of Volgograd State Medical University*

**Hartunova E.I.**

*Candidate of Sciences (Pharmacy),  
senior lecturer of the Chair of Pharmaceutical and toxicological chemistry  
at PMPI – branch of Volgograd State Medical University*

### Abstract.

The comparative analysis of use of the HPLC methods and the capillary electrophoresis (CE) for identification of flavonoids in branches of a willow triandra. It is shown that the CE method received the most authentic data about existence of rutin, luteolin and naringenin.

**Keywords:** HPLC method, capillary electrophoresis, flavonoids, willow triandra

**Введение.** Различные виды ивы с давних времен использовались в народной медицине как противовоспалительные средства, и в настоящее время находят широкое применение в составе различных лекарственных средств и биологически активных добавок к пище, как за рубежом, так и в России [1]. Известно, что в зарубежных странах растения рода

Ива относятся к числу фармакопейных [2, с. 51]. В России же ива пока не входит в Государственную Фармакопею [3, с. 6].

В соответствии с литературными данными различные виды семейства Ивовые имеют богатый со-

став полифенольных соединений (флавоноиды, фенологликозиды, в том числе салицин, фенолкарбоновые кислоты и дубильные вещества) [4, с. 41].

В последние годы учеными проведен ряд фармакологических исследований, позволяющих обосновать эффективность экстракта ивы не только превращением салицина в ацетилсалициловую кислоту. Существенное влияние на фармакологический эффект оказывают и другие биологически активные вещества (БАВ) коры ивы – полифенольные соединения. Показано, что извлечения из коры ивы, имеющие высокое содержание флавоноидов и других полифенольных соединений, способны ингибировать ферменты воспаления (ЦОГ-1, ЦОГ-2 и липоксигеназу) [5, 6, с. 31]. Приведенные выше данные относятся преимущественно к коре различных видов, реже к листьям ивы. В то же время за последние годы получены результаты, подтверждающие перспективность использования в качестве лекарственного растительного сырья побегов ивы. Так, О.О. Хитевой и Т.М. Дементьевой с соавт. установлено наличие противовоспалительной активности порошка побегов ивы белой, ивы пурпурной, ивы трехтычинковой, ивы вавилонской и гибрида ивы вавилонской с ивой белой [7, с. 288; 8, с.206; 9, 10].

Объектом нашего исследования явились побеги ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, с целью изучения флавоноидного состава данного сырья. В соответствии с данными, представленными в академическом труде «Растительные ресурсы СССР, 1986», до 1985 года в иве трехтычинковой, произрастающей на территории республик бывшего Советского Союза, обнаружены почти все классы соединений, которые находятся в растительных объектах. Класс флавоноидов представлен рутином и кверцетином (листья и соцветия) и лютеолином (листья). В коре обнаружены: салипурпозид и изосалипурпозид [11, с. 131].

Компанцев В.А. в 60-80-х годах прошлого столетия занимался изучением химического состава ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе. Им найдены в соцветиях флавоноиды: рутин и кверцетин (3,7%), в листьях - рутин (5%), в коре - салипурпозид и нарингенин (1,5%) [12]. Р.Ю. Фарраховым установлено, что в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей в Башкортостане, преобладают флавонолы (производные агликонов кверцетина, изорамнетина и кемпферола) [13]. Лютеолин и рутин обнаружены в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей в Белоруссии [14, с. 590]. Анализ литературных данных свидетельствует об изучении флавоноидов в отдельных частях растения (листья, соцветия, кора) и отсутствии сведения об изучении состава БАВ побегов (однолетние облиственные побеги растения).

В связи с этим, представляет интерес провести исследования по изучению и подтверждению состава флавоноидов в листьях и побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, более современными методами анализа.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлись высушенные однолетние

длиной до 30 см, облиственные, неодревесневшие побеги ивы трехтычинковой. Сырье собрано в августе 2015 года с нескольких деревьев по берегам рек Подкумок (окрестности г. Пятигорска). Высушенное сырье измельчали и объединяли. Для анализа использовали порошок сырья, проходящего сквозь сито размером отверстий 2 мм.

**Получение извлечения:** около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (побеги, листья и побеги без листьев), помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания спиртоводной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 50 мл и доводят спиртом этиловым 70 % до метки (раствор А).

**Метод капиллярного электрофореза (КЭ).** Исследование проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель – 103Р» (ОАО «НПФ Люмэкс», Россия) с кварцевым капилляром  $L_{эфф}/L_{общ}=75/65$  см, ID=50 мкм. Ввод пробы осуществлялся гидродинамически 150 мбар·с, напряжение +20 кВ. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм. Ведущий электролит: боратный буферный раствор с pH 9,8 и концентрацией 10 мМ. Для обработки электрофореграмм использовалась программа «Мультихром» (версия 1.52v). При помощи микропипетки отбирают по 400 мкл раствора А спиртового извлечения и растворов СО переносят в пробирку типа Эппендорф, прибавляют 600 мкл того же растворителя, перемешивают и центрифугируют при 12000 мин<sup>-1</sup> 5 мин. Надосадочный раствор декантируют и подвергают анализу.

**Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).** Исследования проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Gilston», модель 305 (Франция), оснащенный ручным инжектором RHEODYNE 7125 (США) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы Мультихром для “Windows”. Условия анализа: неподвижная фаза – металлическая колонка размером 4,6x250 мм KROMASILC18, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза в соотношении метанол:вода:кислота фосфорная концентрированная (400:600:5). Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента – 0,8 мл/мин. Продолжительность анализа – 60 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора “GILSTON” UV/VIS модель 151, при длине волны 254 нм. По 50 мкл растворов А полученных спиртовых извлечений и растворов стандартных образцов (СО) вводят в хроматограф и хроматографируют в выше приведенных условиях.

**Приготовление растворов СО.** По 0,01 г (точная навеска) рутина, кверцетина дигидрата, дигидрокверцетина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида (цинарозид), кемпферола, гиперозида, геспе-

редина, апигенина, гесперидина, нарингина, апигенина, изосалипурпозид, нарингенина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте этиловом 95% при нагревании на водяной бане. Раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят спиртом раствор до метки. Концентрация СО в растворе 0,1 мкг/мкл.

**Результаты и их обсуждение.** Ранее, с помощью проведенных качественных реакций и ТСХ нами подтверждено наличие в сырье ивы трехтычинковой флавоноидов, в том числе рутина (на хроматограмме просматривалось яркое пятно на уровне пятна СО рутина) [15, с. 85; 16, с. 56].

С помощью метода ВЭЖХ (табл. 1) на основании сравнения полученных хроматограмм спиртовых извлечений сырья с хроматограммами растворов СО (рутина, кверцетина дигидрата, дигидрокверцетина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, кемпферола, гиперозид, гесперидина, апигенина)

можно сделать заключение, что во всех исследуемых образцах в наибольших количествах содержится рутин и не обнаружены кемпферол, гесперидин и апигенин. Дигидрокверцетин и гиперозид обнаружен только в побегах с листьями и без листьев, т.е. эти флавоноиды находятся, очевидно, в коре растения. В побегах без листьев не обнаружен лютеолин, который содержится, очевидно, только в листьях и поэтому его наличие подтверждается и в побегах с листьями. Кверцетин присутствует в следовых количествах, как в побегах без листьев, так и в листьях. Т.о. с помощью метода ВЭЖХ подтверждено наличие в листьях рутина и лютеолина, обнаруженные ранее В.А. Компанцевым в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе [12]. Кроме того, дополнительно с помощью метода ВЭЖХ обнаружены в незначительных количествах в листьях лютеолин-7-гликозид (цинарозид), а в однолетних побегах без листьев рутина и дигидрокверцетин.

Таблица 1 – Идентификации флавоноидов в сырье ивы трехтычинковой методом ВЭЖХ

Наименование стандартного образца	Побеги без листьев			Листья			Побеги с листьями		
	Время, сек	Площадь, мин mV*сек	Конц., %	Время, сек	Площадь, мин mV*сек	Конц., %	Время, сек	Площадь, мин mV*сек	Конц., %
Дигидро-кверцетин	10,27	183,56	1,40				10,24	938,15	3,29
Лютеолин – 7 – гликозид	14,32	112,22	0,86	13,94	753,62	1,65	14,76	690,05	2,42
Гиперозид	16,86	105,65	0,81				16,2	526,04	1,85
Рутин	17,91	82,68	0,63	16,66	1031,73	2,25	17,35	2141,13	7,52
Кверцетин	44,97	43,16	0,33	45,91	215,46	0,47			
Лютеолин				49,61	803,92	1,75	51,7	425,05	1,49
Итого, %			4,06			6,12			16,57
Навеска, г		1,480			1,170			1,030	

При применении метода КЭ были использованы данные С.П. Сенченко и Е.В. Компанцевой по выбору оптимальных условий разделения флавоноидов [17]. В работе использовали стандартные образцы шести основных флавоноидов, которые по литературным данным, приведенным выше, были обнаружены в листьях и коре ивы трехтычинковой (цинарозид, рутин, изосалипурпозид, нарингенин, лютеолин и кверцетин). Результаты их разделения представлены на рисунке 1. Параллельно в этих же условиях были получены электрофореграммы извлечения побегов ивы трехтычинковой. На электрофореграмме четко виден один пик, по времени

миграции совпадающий с СО рутина, а также незначительные пики нарингенина и лютеолина (рис. 2).

Таким образом, с помощью метода КЭ нами подтверждены данные о значительном содержании рутина в побегах ивы трехтычинковой и следовых количествах лютеолина и нарингенина. При этом нами не подтверждено наличие флавоноидов, которые были обнаружены в побегах ивы трехтычинковой с помощью метода ВЭЖХ (кверцетин и лютеолин 7-гликозид).

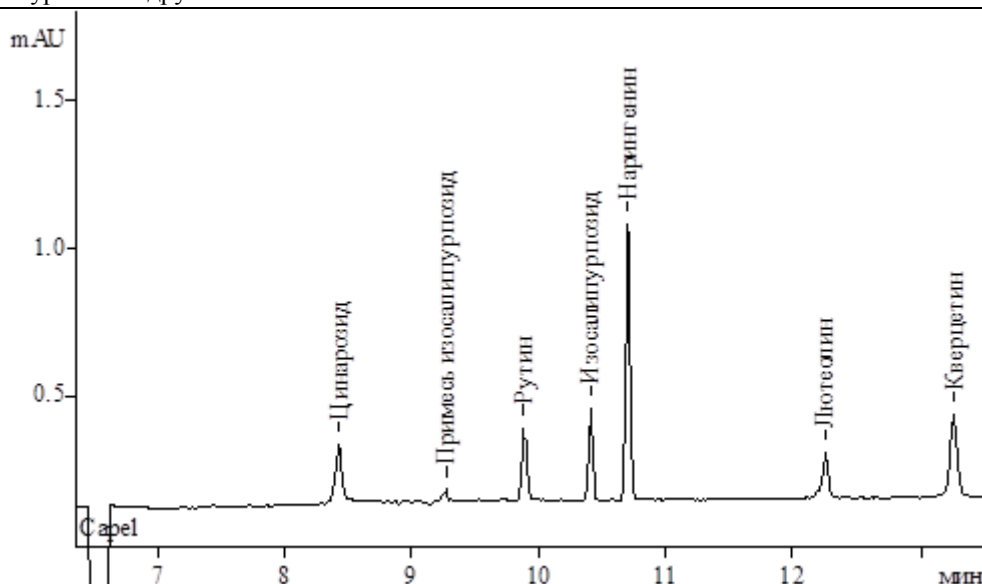


Рисунок 1 – Электрофореграмма раствора стандартных образцов

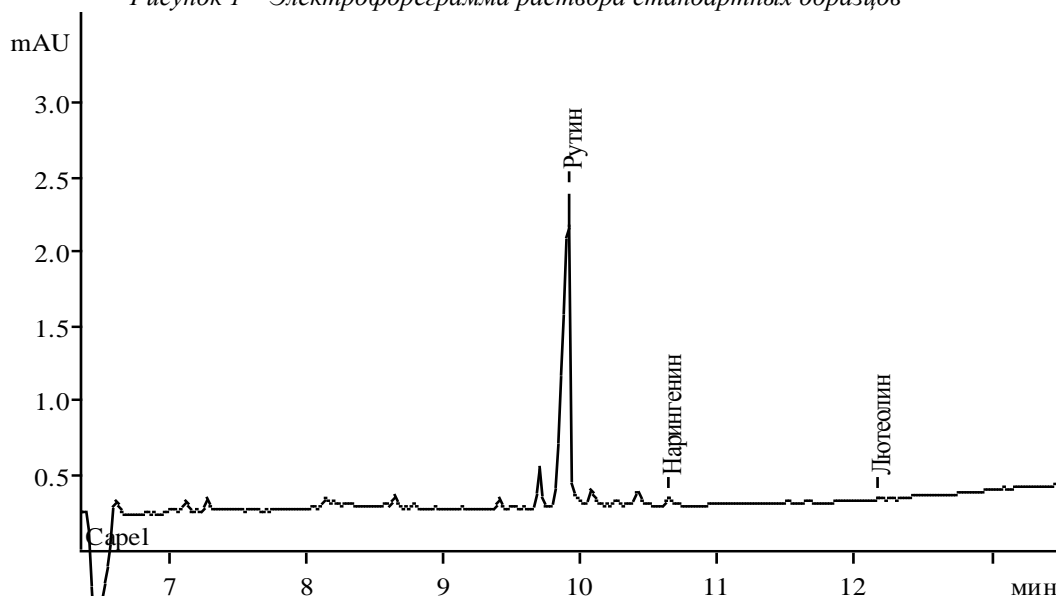


Рисунок 2 – Электрофореграмма спиртового извлечения побегов ивы трехтычинковой

**Заключение.** На основании полученных результатов с помощью методов ВЭЖХ и КЭ нами подтверждены данные о наличии в побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, в больших количествах рутин и следовых количествах нарингенина и лютеолина.

Обнаруженные в образцах ивы трехтычинковой методом ВЭЖХ другие флавоноиды можно отнести наличием артефакта, т.к. на хроматограммах были обнаружены более 27 пиков, очевидно, всех соединений, извлекаемых спиртом этиловым 70% и имеющими поглощение в области 254 нм, а пики данных флавоноидов (кверцетин, дигидрокверцетин, лютеолин 7-гликозид (цинарозид) и гиперозид) были или не до конца разделены или их площади имели величину не превышающую 2,5% от всей суммы пиков хроматограммы.

**Литература**

1. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию [Электронный ресурс].-

Электрон. дан.-М., 2014. URL: <http://fp.crc.ru/gosregfr/>.

2. Лекарственные средства и БАД, содержащие иву: тенденции и перспективы / Е.Г. Санникова [и др.] // Фармация.- 2015.- №5.- С. 51-53.

3. Смирнова, Ю.А. Новые виды лекарственных растений для отечественной фармакопеи / Ю.А. Смирнова, Т.Л. Киселева // Фармация.-2009.-№7.- С.6-7.

4, Фролова, О.О. Биологически активные вещества растений рода ива (Salix L.). О.О. Фролова, Е.В. Компанцева, Т.М. Дементьева // Фармация и фармакология. – 2016. - №2. – С. 41-49.

5. Weidenrindenextrakt. Vielstoffgemisch gegen Entzündungen und Schmerzen [Электронный ресурс]: Pharmazeutischezeitung / M. Keusgen, С. Allgäuer-Lechner. – Электрон. дан. - Eschborn (Germany), 2012. URL: <http://www.pharmazeutischezeitung.de/index.php?id=2666&type=4>.

6. Inhibitorische Effekte von Weidenrindenextrakten auf proinflammatorische Prozesse in LPS aktivierten Humanmonozyten / O. Kelber [et al.] // *Z. Rheumatol.*-2006. -Vol.1- P.31.
7. Изучение противовоспалительной активности водных извлечений из коры и однолетних побегов ивы белой / Т.А. Лысенко, О.О. Хитева, И.А. Савенко, Е.В. Компанцева // *Вестн. новых мед. технологий.* - 2011. - Т.18, №3. - С. 288-290.
8. Компанцева, Е.В. Изучение противовоспалительной активности побегов ивы белой / Е.В. Компанцева, О.О. Фролова, И.А. Савенко // *Проблемы фармацевтической науки и практики: материалы IV Межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Владикавказ, 30–31 мая 2014 г.).* - Владикавказ, 2014. - С.206-209.
9. Химическое изучение побегов ивы пурпурной (*Salix purpurea* L.) и определение противовоспалительной активности их водного извлечения [Электронный ресурс] / О.О. Фролова, О.А. Шевченко, Е.В. Компанцева, Т.А. Лысенко // *Современные проблемы науки и образования.* - 2012. - №6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8066>.
10. Фармакологическое действие коры и побегов ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой [Электронный ресурс] /Т.М. Дементьева, Е.О. Сергеева, Л.А. Саджая, О.О. Фролова // *Современные проблемы науки и образования.* – 2015. – №5. URL: <http://www.science-education.ru/128-21893>.
11. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейства *Peoniaceae* – *Thymelaeaceae*. / отв. ред. П.Д. Соколов – Л.: Наука. 1986. — 336 с.
12. Компанцев, В.А. Химическое изучение фенольных гликозидов некоторых видов ив Северного Кавказа: автореф. дис. ...канд. фармацевт. наук: / Компанцев Владислав Алексеевич.- Пятигорск, 1970. -23 с.
13. Фаррахов, Р.Ю. Комплексное использование водоохранно-защитных лесных насаждений (на примере видов рода *Salix* L.):автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.16. / Фаррахов Рафаил Юсупович.- Тольятти, 2004. - 19 с.
14. Флавоноиды эфирных фракций листьев видов *Salix* L. /В.Л. Шелюто [и др.] // *Раст. ресурсы.*-1987.-Вып.4.-С.590-597.
15. Санникова, Е.Г. Определение рутина в листьях ивы трехтычинковой методом планарной хроматографии / Е.Г.Санникова, Т.Д. Мезенова // *Фармация и фармакология.* – 2016. – №1(14). – С. 85-90.
16. Изучение флавоноидов ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе / Е.Г.Санникова, О.И.Попова, О.О.Фролова, А.Ю.Айрапетова// *Фармация и фармакология.* – 2016. – №3(16). – С. 56-67.
17. Сенченко, С.П. Изучение электрофоретического поведения флавоноидов с целью разработки методологических подходов к их анализу в условиях капиллярного зонного электрофореза [Электронный ресурс] / С.П. Сенченко, Е.В. Компанцева / *Современные проблемы науки и образования.* – 2015. – №4.URL: [www.science-education.ru/127-20806](http://www.science-education.ru/127-20806).