

УДК 582.681.81:581.44:547.587[543.544.5.068.7]

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПОБЕГОВ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА СЕВЕРНОМ КАВКАЗЕ

Е.Г. Санникова, О.И. Попова, Е.В. Компанцева, О.О. Фролова

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ
Минздрава России, г. Пятигорск*

STUDY OF PHENOLCARBONIC ACIDS OF SALIX TRIANDRA L. TENDRILS GROWING IN THE NORTH CAUCASUS

E.G. Sannikova, O.I. Popova, E.V. Kompantseva, O.O. Frolova

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical
University, Pyatigorsk
E-mail: Je-Je4ka2012@yandex.ru*

Определены качественный и количественный состав фенолкарбонических кислот в однолетних побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*). Идентификация и количественное определение отдельных фенолкарбонических кислот проводились методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обнаружено 6 индивидуальных веществ. Общее содержание суммы фенолкарбонических кислот определено экстракционно-фотометрическим методом, основанным на их избирательной экстракции из подкисленного раствора в этилацетат. Наибольшее содержание фенолкарбонических кислот (около 0,47%) обнаружено в листьях ивы трехтычинковой, наименьшее – в побегах без листьев (около 0,40%). Обнаруженные в побегах ивы трехтычинковой фенолкарбонические кислоты могут вносить существенный вклад в суммарный фармакологический эффект.

Ключевые слова: фенолкарбонические кислоты, анализ, ива трехтычинковая (*Salix triandra L.*), побеги

Известно, что фенолкарбонические кислоты содержатся как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов практически в каждом растении. В группе фенолкарбонических кислот ряд ученых выделяют гидроксикоричные кислоты. Среди гидроксико-

Qualitative and quantitative composition of phenolcarboxylic acids in one year tendrils of *Salix triandra L.* was determined. Identification in quantitative determination of certain phenolcarboxylic acids was carried out using high-performance liquid chromatography. Six individual substances were discovered. The total content of the sum of phenolcarboxylic acids was determined with extraction-photometric method, based on a selective extraction from acidulous solution into ethyl acetate. The highest content of phenolcarboxylic acids (about 0.47%) was detected in the leaves of *Salix triandra L.*, the lowest content was detected in the tendrils without leaves (about 0.40%). Phenolcarboxylic acids discovered in the tendrils of *Salix triandra L.* may significantly contribute to the total pharmacological effect.

Keywords: phenolcarboxylic acids, analysis, *Salix triandra L.*, tendrils.

ричных кислот наиболее распространены кофейная кислота и ее производные: коричная, п-кумаровая, розмариновая, хлорогеновая, неохлорогеновая, синаповая, феруловая и др. Фенолкарбонические кислоты обладают выраженным фармакологиче-

ским действием и могут иметь значение как самостоятельные биологически активные вещества. Салициловая, хлорогеновая, кофейная и галловая кислоты обладают антимикробным и фунгистатическим действием, производные кофейной кислоты проявляют желчегонную активность. Экспериментально установлено, что галловая, ванилиновая, кофейная, п-оксибензойная кислоты являются эффективными перехватчиками свободных радикалов, оказывая антиоксидантное действие [1]. Кислота феруловая проявляет церебро- и кардиопротекторное действие. Также установлено, что кислота галловая обладает выраженной иммуномодулирующей активностью, так как индуцирует выработку оксида азота для макрофагов, потенцирует выработку интерферона и способствует активации иммунокомпетентных клеток [3].

В связи с этим несомненный интерес представляет поиск растений отечественной флоры с высоким содержанием фенолкарбоновых кислот (ФК). Одним из перспективных растений является ива (*Salix L.*), различные виды которой отличаются высоким содержанием фенольных соединений.

Цель настоящей работы – определение качественного состава и количественного содержания фенолкарбоновых кислот в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*). Данный вид имеет широкий ареал произрастания, успешно подвергается вегетативному размножению и обеспечивает быстрый и высокий прирост фитомассы [4].

Образцы побегов ивы трехтычинковой были заготовлены в Ставропольском крае в окрестностях г. Пятигорска на берегу реки Подкумок в конце мая – июне 2013 года. В качестве сырья заготавливали только молодые (текущего года) облиственные, неодревесневшие побеги. В дальнейшем проводили сравнение содержания ФК в облиственных побегах, а также в листьях и побегах по отдельности.

Качественный состав ФК изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Gilston», модель 305 (Франция), оснащенном ручным инжектором

«Rheodyne» 7125 (США). Компьютерную обработку результатов исследования проводили с помощью программы Мультихром для Windows. Условия анализа: неподвижная фаза – металлическая колонка размером 4,6 × 250 мм KromasilC18, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: метанол-вода-кислота о-фосфорная концентрированная, в соотношении 400:600:5; температура 20°C; скорость подачи элюента 0,8 мл/мин; продолжительность анализа 60 мин; детектирование с помощью УФ-детектора «Gilston» UV/VIS (модель 151) при длине волны 254 нм.

Пробоподготовка: аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм (по ГОСТ 214-83). Около 1,0 г сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл спирта этилового 70%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания спиртоводной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 50 мл и доводили спиртом этиловым 70% до метки. Параллельно готовили серию 0,05% растворов сравнения в спирте этиловом 70%: кислоты галловой, кислоты кофейной, кислоты хлорогеновой, кислоты неохлорогеновой, кислоты коричной, кислоты цикориевой, кислоты феруловой. В колонку хроматографа попеременно вводили по 50 мкл испытуемых извлечений и растворов сравнения и хроматографировали в вышеприведенных условиях. Идентификацию веществ проводили по времени удерживания.

Количественное определение суммы ФК проводили экстракционно-спектрофотометрическим методом. Он используется в случае высокого содержания в сырье флавоноидов. Сущность методики заключается в избирательной экстракции ФК в этилацетат. Сначала получают суммарное водно-спиртовое извлечение, которое затем упаривается до водного остатка. Затем создается кислое значение pH, при котором ФК переходят в протонированную форму и экстрагируются органическим растворителем, а флавоноиды остаются в водном слое. Указанные условия

признаны оптимальными для разделения этих групп соединений. Методика была успешно апробирована при разделении рутина и кислоты кофейной [5].

Около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливали 20 мл спирта этилового 70%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут с момента закипания спирта этилового в колбе. Экстракцию повторяли трижды в описанных выше условиях. После охлаждения полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр и упаривали до 20 мл водного остатка. Остаток переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили раствором кислот с рН 2,0 до метки (раствор А).

Экстрагировали 5 мл раствора А (V_x) в делительной воронке четырьмя порциями этилацетата по 10 мл (каждая экстракция длилась 5 минут). Этилацетатное извлечение фильтровали через безводный натрия сульфат в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили этилацетатом до метки (раствор Б). Измеряли оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре СФ-2000

при длине волны 325 нм. Содержание суммы ФК пересчитывали на доминирующий компонент – кислоту хлорогеновую.

Количественное содержание суммы ФК в % рассчитывали по формуле (1):

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{E_{уд} \cdot a_x \cdot V_x \cdot (100 - Вл)}, \quad (1)$$

где: А – оптическая плотность испытуемого раствора,

$E_{уд}$ – удельный показатель поглощения кислоты хлорогеновой (504,4);

V_x – объем аликвоты раствора А, мл;

a_x – масса сырья, г;

Вл – массовая доля влаги, %.

Примечание: раствор кислот с рН 2,0 готовили следующим образом. 0,62 г кислоты борной растворяли в мерной колбе (вместимостью 1 л) в 125 мл воды очищенной при нагревании, охлаждали и прибавляли 0,65 мл кислоты ортофосфорной концентрированной и 0,58 мл кислоты уксусной ледяной, доводили водой очищенной до метки, перемешивали.

В таблице 1 приведены результаты качественного определения фенолкарбоновых кислот методом ВЭЖХ.

Таблица 1 – Идентификация фенолкарбоновых кислот в образцах сырья ивы трехтычинковой (метод ВЭЖХ)

Наименование стандартного образца	Анализируемые образцы сырья								
	Побеги с листьями			Листья			Побеги без листьев		
	время, мин	площадь пика, mV·сек	конц, %	время, мин	площадь пика, mV·сек	конц, %	время, мин	площадь пика, mV·сек	конц, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
галловая	3,86	1572,05	5,52	3,56	2178,30	4,76	3,99	1855,1	14,17
хлорогеновая	5,12	676,23	2,37	4,86	2126,44	4,64	5,28	588,10	4,49
неохлорогеновая	8,05	1106,49	3,89	7,65	1467,05	3,20	8,28	1056,3	8,07
цикориевая	9,24	784,06	2,75	8,92	1125,99	2,46	9,46	298,32	2,28
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
феруловая	11,20	1013,56	3,56	11,30	849,21	1,85	11,49	94,56	0,72
коричная	24,33	1896,12	6,66	23,32	1835,93	4,01	24,85	3,59	0,03
Итого, %	24,75			20,92			29,76		
Итого, % (без кислоты галловой)	19,23			16,16			15,59		

Примечание: в таблице приведены % от суммы всех БАВ, извлекаемых спиртом 70% и имеющих полосу поглощения в области 254 нм

Во всех изученных образцах были обнаружены галловая кислота и пять гидроксикоричных кислот. Наибольшее их содержание (29,8%) от суммы всех БАВ, извлекаемых спиртом 70% и имеющих полосу поглощения в области 254 нм, находится в побегах без листьев. При этом в побегах без листьев содержится наибольшее количество галловой кислоты. Без учета кислоты галловой почти сопоставимые количе-

ства суммы гидроксикоричных кислот оказались в образцах побегов без листьев и в листьях (15,6 и 16,2% соответственно), а наибольшее их содержание оказалось в образцах побегов с листьями (около 19%).

Результаты количественного определения суммы фенолокислот в изучаемых объектах с помощью экстракционно-фотометрического метода представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Определение суммы фенолкарбоновых кислот экстракционно-спектрофотометрическим методом

Взято сырья, г	Оптическая плотность	Найдено ФК, %	Метрологические характеристики
Побеги с листьями, Вл=8,99%			
0,995	0,382	0,418	$X_{cp} = 0,434\%$ $S = 0,01272$ $S_x = 0,005192$ $\Delta x = 0,01334$ $\varepsilon = \pm 3,08\%$ $X \pm \Delta x = 0,43 \pm 0,01\%$
0,957	0,391	0,445	
1,028	0,423	0,448	
1,115	0,450	0,440	
0,988	0,381	0,420	
1,013	0,402	0,432	
Побеги без листьев, Вл=7,99%			
1,240	0,456	0,396	$X_{cp} = 0,401\%$ $S = 0,01704$ $S_x = 0,006975$ $\Delta x = 0,017875$ $\varepsilon = \pm 4,43\%$ $X \pm \Delta x = 0,40 \pm 0,02\%$
0,958	0,340	0,388	
1,120	0,422	0,382	
1,021	0,395	0,417	
1,011	0,387	0,413	
0,915	0,360	0,424	
Листья, Вл=5,97%			
1,015	0,423	0,439	$X_{cp} = 0,471\%$ $S = 0,02426$ $S_x = 0,009902$ $\Delta x = 0,025448$ $\varepsilon = \pm 5,41\%$ $X \pm \Delta x = 0,47 \pm 0,03\%$
1,112	0,506	0,480	
1,211	0,561	0,489	
1,036	0,436	0,444	
1,078	0,483	0,472	
1,248	0,591	0,499	

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот (в пересчете на кислоту хлорогеновую) оказалось наибольшим в образцах листьев ивы трехтычинковой и составило

0,47%. Наименьшее содержание суммы ФК найдено в побегах без листьев – около 0,40%.

Выводы

Таким образом, определен качественный состав и количественное содержание фенолкарбоновых кислот в побегах ивы трехтычинковой. Обнаружено 6 индивидуальных соединений (галловая, хлорогеновая, неохлорогеновая, цикориевая, коричная и феруловая кислоты). Методом экстракционной спектрофотометрии определено суммарное содержание фенолкарбоновых кислот, которое оказалось наибольшим в листьях ивы трехтычинковой (около 0,47%), а наименьшим – в побегах без листьев (около 0,40%). Обнаруженные фенолкарбоновые кислоты обладают многогранной фармакологической активностью и могут вносить существенный вклад в суммарный фармакологический эффект побегов ивы

трехтычинковой. Также полученные данные расширяют сведения о химическом составе изучаемого растительного сырья. Ранее подтверждено наличие фенолкарбоновых кислот в побегах 4 видов ивы, произрастающих на Северном Кавказе [6], которое оказалось в пределах 0,76 – 1,21%. В связи с этим необходимо дальнейшее изучение различных представителей рода *Salix L.* для расширения сырьевой базы растений отечественной флоры, содержащих фенолкарбоновые кислоты.

Библиографический список

1. О влиянии биологически активных веществ на антиоксидантную активность фитопрепаратов / Е.И. Шкарина [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2001. – Т.35, №6. – С. 40-47.
2. Дьякова, И.Н. Экспериментальное исследование церебропротекторных свойств феруловой кислоты в условиях ишемии мозга: Автореф. дис. канд. фармац. наук. – Пятигорск, 2007. – 24 с.
3. Kayser, O. Pelargonium sidoides DC / O. Kayser, H. Kolodziej // Phytotherapie. 1998. Vol. 3. P.141- 151.
4. Логинова Л.А. Продуктивность и энергетический потенциал ивовых ценозов на примере Воронежской области: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Воронеж, 2010. – 24 с.
5. Косман, В.М. Количественное экстракционно-спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. – 2001. – Вып. 4. – С.123-129.
6. Компанцева, Е.В. Изучение содержания фенолокислот в некоторых видах ивы / Инновационные технологии в фармации: сб. науч.-метод. тр. // Е.В. Компанцева, О.О. Фролова, Т.М. Дементьева; под общей ред. Е.Г. Горячкиной. – Иркутск: ИГМУ, 2014. – С. 114-115.

* * *

Санникова Евгения Геннадиевна – аспирант кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармацевтический анализ биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье. E-mail: Je-Je4ka2012@yandex.ru.

Попова Ольга Ивановна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья, ресурсы ЛРС, фитотерапия.

Компанцева Евгения Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармацевтический анализ синтетических лекарственных веществ и биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье, стандартизация лекарственных средств. E-mail: dskompanceva@mail.ru.

Фролова Ольга Олеговна – кандидат фармацевтических наук, ведущий специалист отдела аспирантуры и докторантуры Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармацевтический анализ биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье. E-mail: oxifarm@mail.ru.