

Фармакология и фармакогнозия



УДК 615.322:547.587.2:582.623.2]-001.8

Т.М. Дементьева¹, Н.Ю. Якушева¹, Е.В. Компанцева²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЛИЦИНА В НЕКОТОРЫХ ВИДАХ ИВЫ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mai.fesmu.ru;

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ВолгГМУ,
357532, пр. Калинина, 11, тел. 8-(8793)-32-44-74, e-mail: v.l.adzhienko@pmedpharm.ru, г. Пятигорск-32

Резюме

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проведено определение салицина в коре и побегах ивы вавилонской и гибриде ивы вавилонской с ивой белой. Проведена валидация данной методики.

Ключевые слова: кора, побеги, ива вавилонская, гибрид ивы вавилонской с ивой белой, ВЭЖХ, салицин.

T.M. Dementieva¹, N.Yu. Yakusheva¹, E.V. Kompantseva²

DETERMINATION OF SALICIN IN SOME SPECIES OF WILLOW TREE

¹Far Eastern State Medical University, Khabarovsk;

²Pyatigorsk medical-pharmaceutical Institute, Pyatigorsk-32

Summary

Method of highly effective liquid chromatography was used to detect the level of salicin in the bark, shoots of Babylon willow and hybrid of Babylon willow and white willow. Validation of this method has been carried out.

Key words: bark, shoots, Babylon willow, hybrid, white willow, salicin.

Одними из основных представителей БАВ семейства Salicaceae являются фенологликозиды, агликоном которых является салициловый спирт. Первый фенологликозид, выделенный из растений – салицин (саликозид) – представляет собой β-глюкозид салицилового спирта. Его получил из коры ивы французский ученый И. Леру в 1829 году [1]. Именно с салицилатами связаны основные виды действия ивы – противовоспалительное, жаропонижающее и мягкое анальгезирующее [2].

Количественное содержание салицина в изученных на данный момент видах ивы, варьирует по имеющим-

ся сведениям достаточно широко: в коре – от 0,20 % до 4,11 %, в листьях – от 0,14 % до 2,31 %, в побегах – от 0,05 % до 0,25 % [3, 4]. На примере коры ивы остролистной, произрастающей в Поволжье, найдено, что общее содержание салицина после щелочного гидролиза колебалось от 6,5 % до 9,5 % [5]. В Европейской Фармакопее включены виды ивы, в коре которых содержится не менее 1,5 % салицина (после щелочного гидролиза) [6].

Цель исследования – определение содержания салицина в коре и побегах ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой, произрастающих на Северном Кавказе.

Материалы и методы

Объектами исследования служили кора и побеги ивы вавилонской (*Salix babylonica* L.) и гибрида ивы вавилонской и ивы белой (*Salix babylonica* L. × *Salix alba* L.), которые заготавливались в 2012–2015 годах на территории Ставропольского края. Для сбора сырья использовали от 3 до 4 деревьев. После сбора сырье объединяли и сушили на воздухе в тени, в хорошо проветриваемых помещениях. Для анализа отбирали пробы методом квартования.

Для количественного определения салицина использовали метод ВЭЖХ. Работу проводили на хроматографе Shimadzu LC 2010 (20A) с диодноматричным детектором, руководствуясь МУ 08-47/172 «Кора ивы и осины, экстракты из них и БАД на их основе. ВЭЖХ метод определения массовой концентрации салицина» [7]. Данную методику ранее модифицировали при исследовании салицина в коре и побегах ивы белой, так как в сырье содержится большое количество ДВ, ко-

торые быстро выводят из строя хроматографическую колонку [3]. Для определения готовили извлечение: 1,0 г (точная навеска) измельченного в порошок исследуемого сырья заливали 70 мл воды очищенной и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Извлечение охлаждали и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. К фильтрату добавляли 12 мл свинца ацетата основного раствора 10 %. Полученный раствор доводили до pH=9,0-10,0 с помощью натрия гидроксида раствора 10 %, помещали на водяную баню до полной коагуляции осадка и охлаждали. К полученному раствору добавляли 3 мл насыщенного раствора натрия сульфата, тщательно перемешивали и добавляли хлористоводородной кислоты 1 % до ней-

трального значения pH. Полученный раствор доводили водой очищенной до метки, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр [8].

При хроматографировании использовали подвижную фазу, состоящую из смеси ацетонитрила и муравьиной кислоты 2 % (5:95). Смесь должна иметь значение pH=3, такое значение получали, добавляя к готовому раствору натрия гидроксида раствор 1 моль/л. Режим элюирования – изократический. Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин., объем пробы – 10 мкл, детектирование проводили при длине волны 268 нм. Время анализа составляло 15 минут. Для расчета содержания салицина с исследуемом сырье готовили 0,1 % раствор стандартного образца (СО) салицина.

Результаты и обсуждение

Как следует из рисунка 1 на хроматограммах извлечений имеется пик со временем выхода 8,28 минут, что совпадает по времени с пиком выхода СО салицина.

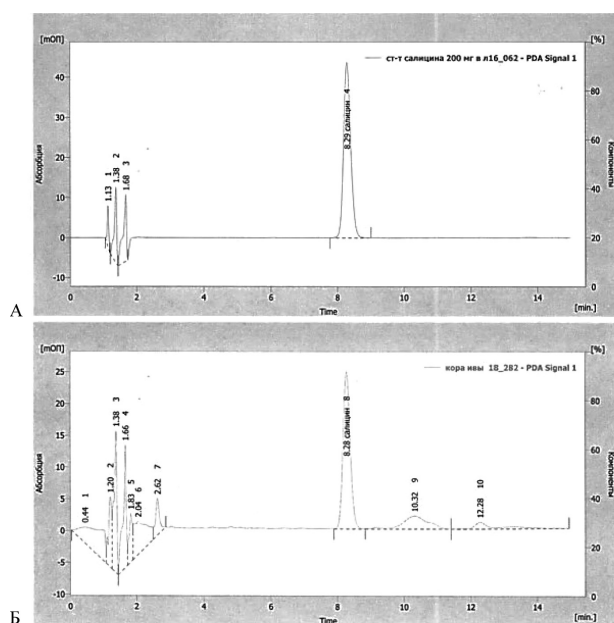


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограммы раствора СО салицина (А) и водного извлечения коры ивы вавилонской (Б)

Результаты, количественного определения салицина в коре и побегах исследуемых видов ивы, собранных в мае 2015 года, представлены в таблице 1.

По результатам, приведенным в таблице 1, можно сделать вывод, что содержание салицина в коре почти в 5 раз превышает содержание салицина в побегах во всех исследуемых образцах ивы и составляет в коре ивы вавилонской и ее гибриде с ивой белой соответственно 1,00 % и 1,19 %, в побегах соответственно 0,20 % и 0,25 %. Относительная погрешность определения не превышает $\pm 3,17$ %.

Данной методикой провели определение содержания салицина в коре и побегах ивы вавилонской и ее гибриде, собранных весной, летом и осенью с 2012 по 2015 года. Данные количественного определения приведены в таблице 2.

Таблица 1

Результаты количественного определения салицина в коре и побегах ивы вавилонской и ивы гибрида методом ВЭЖХ

Исследуемые образцы	Масса навески, г	Содержание салицина, мг/мл	Содержание салицина, %	Метрологические характеристики
Кора ивы вавилонской	1,00045	96,300	1,048	$\bar{X}=1,001$ % $S=0,002467$ $S_x=0,001007$ $\Delta\bar{X}=0,002588$ $\varepsilon=\pm 0,26$ % $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=1,001\pm 0,003$ %
	1,00101	92,938	1,001	
	1,00060	91,617	0,997	
Побеги ивы вавилонской	1,00060	18,497	0,203	$\bar{X}=0,198$ % $S=0,002989$ $S_x=0,00122$ $\Delta\bar{X}=0,003136$ $\varepsilon=\pm 1,59$ % $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=0,198\pm 0,003$ %
	1,00095	17,840	0,196	
	1,00040	17,638	0,194	
Кора ивы гибрида	1,00150	112,510	1,240	$\bar{X}=1,185$ % $S=0,035771$ $S_x=0,014604$ $\Delta\bar{X}=0,037531$ $\varepsilon=\pm 3,17$ % $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=1,185\pm 0,037$ %
	1,00165	107,838	1,188	
	1,00145	102,257	1,127	
Побеги ивы гибрида	1,00560	22,981	0,251	$\bar{X}=0,251$ % $S=0,000632$ $S_x=0,000258$ $\Delta\bar{X}=0,000664$ $\varepsilon=\pm 0,26$ % $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=0,251\pm 0,001$ %
	1,00455	22,856	0,250	
	1,00605	23,105	0,252	

Таблица 2

Результаты количественного определения салицина в исследуемых образцах сырья, собранные в разное время

Год сбора	Сезон сбора сырья	Найдено в побегах, %		Найдено в коре, %	
		ивы вавилонской	ивы гибрида	ивы вавилонской	ивы гибрида
2012	осень	0,210	0,199	0,803	0,788
	весна	*	*	1,436	1,534
2013	лето	0,220	0,201	1,601	1,638
	осень	0,227	0,237	1,540	1,396
2014	весна	*	*	1,139	0,847
	лето	0,120	0,123	1,677	0,879
2015	осень	0,250	0,238	1,214	0,997
	весна	*	*	1,477	1,240
2015	лето	0,112	0,205	1,615	1,393

Примечание. * – сырье собиралось в апреле, листья на ветках отсутствовали.

Как следует из представленных в таблице 2 данных, содержание салицина в коре ивы вавилонской, собранной в разное время, колеблется от 0,80 % до 1,68 %, в коре гибрида оно составляет от 0,79 % до 1,64 %, в побегах ивы вавилонской содержание салицина находится в пределах от 0,11 % до 0,22 %, а в побегах гибрида от 0,12 % до 0,20 %. Наблюдается незначительное колебание в содержании салицина в зависимости от времени сбора и года.

Для включения данной методики в проект нормативной документации на лекарственное растительное сырье (ЛРС) устанавливали ее валидность, используя следующие критерии: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость) [9]. Определение проводили на образцах коры ивы вавилонской, собранных летом 2015 года.

Критерий **специфичность** определяли, используя метод добавок. Для этого к полученному извлечению добавляли разные объемы 0,3 мл, 0,6 мл, 0,9 мл, 1,2 мл и 1,5 мл 0,1 % раствора СО салицина. При этом площадь пика салицина на хроматограмме увеличивалась, а асимметрия пиков была на прежнем уровне. Данные представлены в таблице 3.

Далее определяли критерий **линейности** (рис. 2). Исследование проводили, используя результаты построения градуировочного графика СО салицина. Значение коэффициента корреляции составило 0,9998, следовательно, методика линейна, так как соответствует требованиям ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик» $|r| \geq 0,99$.

$$y = 3,28483 \cdot x + 0,000035$$

$$r = 0,9998$$

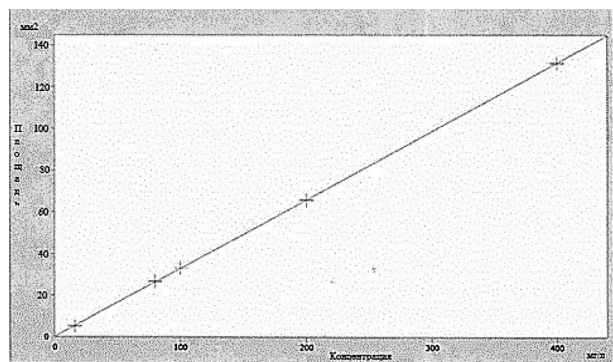


Рис. 2. График линейности СО салицина

Для определения **правильности** методики использовали метод добавок. Рассчитывали критерий Стьюдента, который составил 0,35. Это значит, что выполняется неравенство $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (Р, f), так как $0,35 < 2,78$, следовательно, методика не отягощена систематической ошибкой и является правильной (табл. 3).

Выводы

Впервые в коре и побегах ивы вавилонской и гибрида ивы вавилонской и ивы белой было проведено количественное определение салицина методом ВЭЖХ. Метод точный, простой и удобный в исполнении.

Полученные данные позволяют установить минимальные пределы содержания салицина при составлении проектов нормативной документации

На следующем этапе была определена **прецизионность** (повторяемость) методики. С этой целью проводили по три определения содержания салицина на трех уровнях его концентрации в навесках сырья. Для этого брали навески сырья 0,5 г, 1,0 г и 1,5 г. В каждом случае делали по 3 инъекции и усредняли результаты измерения площадей пиков (табл. 4).

Таблица 3

Определение правильности ВЭЖХ-методики определения салицина в коре ивы вавилонской методом добавок

Навеска сырья*	Исходное количество салицина, в 10 мл раствора, г	Добавлено СО салицина к 10 мл раствора		μ , г истинное значение	X_i , г найдено в 10 мл раствора	R, % Открываемость	Метрологические характеристики
		мл	г				
1,0 г	0,001048	0,3	0,0003	0,001348	0,001352	100,31	R=100,11% S ² =1,591 S=1,261 t _{выч.} =0,35
	0,001048	0,6	0,0006	0,001648	0,001631	98,97	
	0,001048	0,9	0,0009	0,001948	0,001964	100,83	
	0,001048	1,2	0,0012	0,002248	0,002257	100,42	
	0,001048	1,5	0,0015	0,002548	0,002497	98,01	

Примечание. * – содержание салицина в сырье 1,048 %, следовательно, в навеске 1,0 г содержится 0,01048 г салицина в 100 мл, а в 10 мл 0,001048.

В работе при определении прецизионности ориентировались на рекомендации американской ассоциацией аналитической химии (AOAC), где показатель RSD не должен превышать 2 %. Результаты, приведенные в таблице 4, свидетельствуют о том, что показатель RSD составил 1,83 %, т. е. методика прецизионна.

Таблица 4

Результаты определения прецизионности методики определения салицина методом ВЭЖХ

Навеска сырья, г	Площадь пика салицина, мм ²	Содержание салицина, %	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологические характеристики
0,51500	40,3175	1,046	0,015	0,000225	X=1,031 % SD=0,01892 RSD=1,83 %
0,50105	37,3117	1,038	0,007	0,000049	
0,49995	40,0211	1,073	0,042	0,001764	
1,00045	83,2125	1,048	0,017	0,000289	
1,01015	80,685	1,011	-0,02	0,0004	
1,00650	81,936	1,032	0,001	0,000001	
1,50785	119,635	1,040	0,009	0,000081	
1,49865	120,315	1,044	0,013	0,000169	
1,49935	121,450	1,049	0,018	0,000324	

(для побегов ивы не менее 0,1 %, для коры – не менее 0,7 %).

Проведена валидационная оценка ВЭЖХ методики количественного определения салицина в исследуемом сырье. Методика валидна по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость).

Литература

1. Зефирова О.Н. Лекарство века [Электронный ресурс] / О.Н. Зефирова // Химия. – 2000. – № 10. – Режим доступа: <http://him.1september.ru/article.php?ID=200001001>.
2. Насонов Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов и ингибиторов циклооксигеназы-2 в начале XXI века // Рус. мед. журн. – 2003. – Т. 11, № 7. – С. 375-379.
3. Хитева О.О. Изучение некоторых видов ивы, произрастающих на Северном Кавказе: автореф. дисс. ... канд. фармац. наук: 14.04.02 / Хитева Ольга Олеговна. – Пятигорск, 2012. – 24 с.
4. Компанцева Е.В. и др. Возможность использования ивы вавилонской в фармации // Фармация и фармакология. – 2013. – № 1. – С. 4-8.
5. Коптина А.В. и др. Использование коры *Salix acutifolia* (Salicaceae) для получения салицилатов // Раст. ресурсы. – 2010. – Вып. 1. – С. 67-71.
6. Willow bark [monograph]: European Pharmacopoeia. – 5 ed. – Strasbourg, 2005. – P. 2702.
7. Кора ивы и осины, экстракты из них и БАД на их основе. ВЭЖХ метод определения массовой концентрации салицина / МУ 08-47/172. – Введ. 2005. – Томск: Томск. политех. ун-т, 2005. – 17 с.
8. Валягина-Малюткина Е.Т. Ивы европейской части России: иллюстрированное пособие для работников лесного хозяйства. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2004. – 217 с.
9. Гаврилин М.В. Валидация аналитических методов: метод. указания. – Пятигорск, 2009. – 40 с.

Literature

1. Zefirova O.N. The drug of the century // Chemistry. – 2000. – № 10. – [Electronic source] Mode of access: <http://him.1september.ru/article.php?ID=200001001>.
2. Nasonov E.L. The use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in the early 21st century // Russian Medical Journal. – 2003. – Vol. 11, № 7. – P. 375-379.
3. Khiteva O.O. The study of some species of willow found in the North Caucasus: Abstract of a thesis ... of a Candidate of Pharmaceutical Sciences: 14.04.02 / Khiteva Olga Olegovna. – Pyatigorsk, 2012. – 24 p.
4. Kompantseva E.V. Possibility of using *Salix babylonica* in pharmacy // Pharmacy and Pharmacology. – 2013. – № 1. – P. 4-8.
5. Koptina A.V. Using *Salix acutifolia* (Salicaceae) bark to obtain salicylates // Plant resources. – 2010. – Iss.1. – P. 67-71.
6. Willow bark [monograph]: European Pharmacopoeia. – 5 ed. – Strasbourg, 2005. – P. 2702.
7. Bark of the willow and aspen, extracts from them and dietary supplements made on their basis. HPLC method for determination of the salicin mass concentration / MG (Methodical Guidelines) 08-47/172. – Introduct. 2005. – Tomsk: Tomsk Polytechnical University, 2005. – 17 p.
8. Valyagina-Malyutina E.T. Willows of the European Russia: illustrated manual for forest workers. – M.: KMK Scientific Press, 2004. – 217 p.
9. Gavrilin M.V. Validation of analytical methods. – Pyatigorsk, 2009. – 40 p.

Координаты для связи с авторами: Дементьева Татьяна Михайловна – кандидат фарм. наук, доцент кафедры фармации и фармакологии ДВГМУ, тел. +7-914-212-14-94, e-mail: tmdementeva@mail.ru; Якушева Наталья Юрьевна – канд. фарм. наук, доцент фармации и фармакологии ДВГМУ; Компанцева Евгения Владимировна – д-р фарм. наук, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ МЗ РФ, тел. +7-918-774-87-26, e-mail: dskompanceva@mail.ru.



УДК 615.15:613.221

М.Н. Гурьянова, Т.Л. Малеева, С.В. Шильникова

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПО ФОРМИРОВАНИЮ АССОРТИМЕНТА АПТЕЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПО ГРУППЕ «ПРОДУКТЫ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ»

Пермская государственная фармацевтическая академия,
614990, ул. Полевая, 2, тел. 8-(342)-233-55-01, e-mail: perm@pfa.ru, г. Пермь

Резюме

В статье представлены результаты исследований по систематизации номенклатуры продуктов питания для детей. Сформирована структура ассортимента продуктов детского питания на основе данных литературных источников и нормативно-правовых актов. Составлена база данных продуктов питания для детей на основе анализа