

УДК 582.681.81:547.979.7

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ В СЫРЬЕ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ (*SALIX TRIANDRA* L.) МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

© *Е.Г. Санникова, Е.В. Компанцева\*, О.И. Попова, А.Ю. Айрапетова*

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России, пр. Калинина, 11, Пятигорск, Ставропольский край, 357532 (Россия), e-mail: Je-Je4ka2012@yandex.ru*

Известно, что в различных видах ивы содержится богатый полифенольный комплекс биологически активных веществ (БАВ) (фенологликозиды, флавоноиды, дубильные вещества и фенолокислоты). Эти же вещества найдены и в иве трехтычинковой (*Salix triandra* L., сем. *Salicaceae* (Ивовые), секция *Amygdalinae*). Ввиду того, что в настоящее время целесообразным является пероральный прием высушенного и измельченного в порошок лекарственного растительного сырья, представляет интерес и изучение других БАВ, содержащихся в растении, в частности пигментов. С помощью метода тонкослойной хроматографии в листьях и побегах ивы трехтычинковой найдены пигменты:  $\beta$ -каротин, хлорофиллы *a* и *b*, феофитин и ксантофилл. При использовании спектрофотометрического метода обнаружено, что содержание хлорофиллов в побегах ивы трехтычинковой колеблется в пределах от 0.032 до 0.18% и зависит от места произрастания и сезонных факторов (количество солнечного света, температура и экология окружающей среды). Данные значения почти в 2 раза отличаются от содержания хлорофиллов в листьях, однако их количество может вносить определенный вклад в фармакологический эффект при пероральном приеме высушенных и измельченных в порошок побегов ивы. На примере побегов ивы трехтычинковой показано, что при определении содержания хлорофилла в высушенном растительном сырье необходимо учитывать факт образования феофитина. Найдено, что при экстракции сырья гексаном содержание суммы каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин оказалось не более 2.5 мг/% как в листьях, так и в побегах ивы трехтычинковой.

*Ключевые слова:* ива трехтычинковая (*Salix triandra* L.), спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, хлорофиллы, каротиноиды, феофитин.

### **Введение**

Среди растительных источников, используемых как противовоспалительное средство, наиболее широко применяется кора ивы белой. Кора ивы включена в Европейскую (2005), Британскую (2009), Германскую (1991) фармакопеи, а также в Американскую (1999) травяную фармакопею. В России зарегистрировано около 90 наименований биологически активных добавок (БАД) и одно лекарственное средство, в которых присутствует или кора ивы белой, или ее сухой экстракт [1]. В настоящее время рядом авторов на примере измельченных в порошок высушенных однолетних побегов ивы пурпурной, ивы белой, ивы трехтычинковой и гибрида ивы вавилонской с ивой белой установлено, что их фармакологический эффект оказался равным отвару

*Санникова Евгения Геннадиевна* – редактор редакционно-издательского отдела, e-mail: Je-Je4ka2012@yandex.ru

*Компанцева Евгения Владимировна* – профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии, доктор фармацевтических наук, e-mail: dskompanceva@mail.ru

*Попова Ольга Ивановна* – профессор кафедры фармакогнозии, доктор фармацевтических наук, e-mail: beegeeslover@mail.ru

*Айрапетова Ася Юрьевна* – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, кандидат фармацевтических наук, e-mail: asyargfa@mail.ru

и порошку коры ивы белой и кислотой ацетилсалициловой и натрия диклофенаком [2, 3, 4]. Использование таких измельченных однолетних побегов позволит расширить сырьевую базу и уменьшить вред, наносимый растению при заготовке.

Увеличение числа использования препаратов, содержащих лекарственное растительное сырье (ЛРС), измельченного в порошок (кора, корни, корневища, трава, цветки, листья и т.п.), в первую очередь, объясняется отсутствием необходимости

\* Автор, с которым следует вести переписку.

в домашних условиях получения настоя или отвара из сырья. При этом способе перорального применения ЛРС не происходит разрушение биологически активных веществ, вследствие нагревания и гидролиза. При использовании измельченного в порошок ЛРС человек получает всю сумму БАВ растения, что снижает побочное действие, которое проявляется при применении синтетических монопрепаратов [1].

Нами в качестве объекта исследования была выбрана ива трехтычинковая (*Salix triandra* L.), произрастающая на Северном Кавказе, сырье которой мы хотим в дальнейшем предложить в качестве лекарственного средства. В побегах ивы трехтычинковой содержится богатый большой комплекс полифенольных соединений, за счет которого побеги ивы трехтычинковой проявляют противовоспалительную активность [4–6]. В связи с этим актуальным является исследование и липофильной фракции побегов ивы трехтычинковой, а именно пигментов: каротиноидов и хлорофиллов.

Хлорофилл проявляет противовоспалительное, ранозаживляющее и антибактериальное действие, а также является хорошим антиоксидантом, замедляющим процессы старения [7–10]. Каротиноиды также обладают широким спектром фармакологических свойств, среди которых общепризнанными являются провитаминная, антиоксидантная, радиопротекторная и антиканцерогенная активности, которые в совокупности оказывают положительное влияние на иммунитет [11].

В фармацевтической практике идентификацию хлорофиллов и каротиноидов чаще всего проводят, используя метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) [12–14]. В последние годы применяют более современные методы, а именно метод хромато-масс-спектрометрии, где идентификацию разделенных компонентов проводят по библиотеке масс-спектров NIST [15, 16].

Для количественного определения суммы хлорофиллов в основном применяется спектрофотометрический метод. Описаны спектрофотометрические методики с использованием для расчета хлорофилла удельного показателя поглощения хлорофилла *a* при длине волны  $664 \pm 1$  нм (листья крапивы двудомной или семена рапса) [15, 17]. Для определения индивидуальных пигментов в сухом экстракте какалии копьевидной описан хромато-спектрофотометрический способ, расчет содержания которых осуществляется по известным удельным показателям поглощения [14]. Все описанные методики позволяют определять только или сумму хлорофиллов, или хлорофилл *a*.

Чаще всего для определения хлорофиллов спектрофотометрическим способом применяют различные расчетные формулы, выведенные для определения содержания каждого пигмента на основании использования для этих целей удельных показателей поглощения очищенных пигментов при различных длинах волн и позволяющие получить данные по содержанию хлорофиллов *a* и *b*, а также суммы каротиноидов и ксантофиллов. При выполнении этих методик не предусмотрено использование стандартов, такие исследования были использованы при определении пигментов, например, в гречихе [18], ложечнице лекарственной [12], траве шлемника байкальского [19]. Известна работа, в которой подтверждается, что данный спектрофотометрический метод пригоден для выполнения рутинных анализов пигментов, так как результаты определения совпали с результатами, полученными с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии [20]. Большой вклад в определение оптимальных условий экстракции каротиноидов из растительного сырья и методик их анализа внесен исследованиями В.А. Болотова [21, 22].

Цель настоящего исследования – определение содержания хлорофилла и каротиноидов в сырье ивы трехтычинковой в зависимости от места произрастания и времени сбора, а также возможности применения различных способов их расчета при использовании спектрофотометрического метода.

### **Экспериментальная часть**

Образцы однолетних побегов и листьев ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L., сем. *Salicaceae* (Ивовые), секция *Amygdalinae*) были собраны в Ставропольском крае в пойме реки Подкумок (г. Пятигорск) и в Кочубеевском районе (берега реки Кубань), а также в Кабардино-Балкарской Республике (КБР) (пойма реки Малка). Образцы собирались после цветения и плодоношения не менее чем с трех деревьев, высушивались, измельчались и объединялись в пробы в зависимости от времени и места сбора.

Методика идентификации пигментов методом тонкослойной хроматографии: около 1 г высушенных и измельченных побегов ивы трехтычинковой помещают в колбу круглодонную на 100 мл, для лучшего извлечения пигментов заливают кипящей водой, затем воду сливают, прибавляют 50 мл ацетона и экстрагируют в течение 20 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Качественный состав извлечения из побегов ивы трехтычинковой определяют методом ТСХ с использованием высокоэффективных пластинок

«Kieselguhr F254» (0.20 мм) (Merck, Германия). Система растворителей: гексан – изопропиловый спирт – водный раствор карбоната натрия (50 : 5 : 0.25) [13].

Методика количественного определения хлорофилла: около 1.0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в термостойкую колбу с обратным холодильником на 100 мл и экстрагируют спиртом этиловым 96% (по 30 мл) на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Экстракцию повторяют еще два раза. Полученные извлечения фильтруют в колбу мерную на 100 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96% после охлаждения.

5 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96%. Измеряют оптическую плотность с помощью спектрофотометра СФ-2000 при 470, 649 и 664 нм. Раствором сравнения является спирт этиловый 96% [12, 23].

Содержание хлорофилла в сырье в процентах ( $X$ ) рассчитывают по формуле (1) [23], используя значение оптической плотности и удельного показателя поглощения хлорофилла  $a$  при 664 нм, а также по расчетным формулам (2 и 3):

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 944,5 \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора; 944,5 – удельный показатель поглощения хлорофилла  $a$  при 664 нм;  $a$  – навеска сырья, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании, %.

При использовании расчетных формул [24] определяли количество хлорофиллов  $a$  и  $b$ , а также сумму каротиноидов и ксантофиллов в мг/л в соответствии с формулами (2):

$$Chla = 13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649}$$

$$Chlb = 27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664} \quad (2)$$

$$C_{k+kc} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot Chla - 97,64 \cdot Chlb}{209},$$

где  $Chla$  – содержание хлорофилла  $a$ , (мг/л);  $Chlb$  – содержание хлорофилла  $b$ , (мг/л);  $C_{k+kc}$  – содержание суммы ксантофиллов и каротиноидов (мг/л);  $A$  – оптическая плотность раствора.

Затем полученные значения пересчитывают на содержание пигментов в испытуемом растворе в процентах ( $C$ ) и вычисляют их содержание в сухом сырье по формуле (3):

$$X = \frac{25 \cdot C \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \quad (3)$$

где  $C$  – содержание пигмента в испытуемом растворе, %;  $a$  и  $W$  – см. обозначения в формуле 1.

Объемы 5 мл и 25 мл используются в случае применения разведения.

Определение феофитина проводили следующим образом: измерив оптическую плотность испытуемого раствора, в кювету добавляют 0.1 мл кислоты хлористоводородной (1 моль/л) и через 2 мин определяют оптическую плотность при длинах волн 664 и 750 нм [23].

При отсутствии поглощения при 750 нм рассчитывают содержание феофитина и хлорофилла в испытуемом растворе ( $C_x$  и  $C_\phi$ , мг/л) по формулам (4 и 5), затем по формулам (6 и 7) определяют хлорофилл ( $X_1$ ) и феофитин ( $X_2$ ) в сырье в процентах:

$$C_x = 29,11 \cdot [A_{664_0} - A_{664_1}], \quad (4)$$

$$C_\phi = 29,11 \cdot [1,7 \cdot A_{664_1} - A_{664_0}], \quad (5)$$

где  $A_{664_0}$  – оптическая плотность испытуемого раствора до подкисления при 664 нм;  $A_{664_1}$  – оптическая плотность после подкисления при 664 нм.

$$X_1 = \frac{C_x \cdot 50 \cdot 100 \cdot 25}{a \cdot 5 \cdot (100 - W) \cdot 1000}, \quad (6)$$

$$X_2 = \frac{C_{\phi} \cdot 50 \cdot 100 \cdot 25}{a \cdot 5 \cdot (100 - W) \cdot 1000} \quad (7)$$

где  $C_x$  и  $C_{\phi}$  – содержание хлорофилла и феофитина в испытуемом растворе, мг/%;  $a$  и  $W$  – см. обозначения формулы 1.

**Методика определения каротиноидов.** 2.0 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу с притертой пробкой на 250 мл, добавляют 30 мл гексана и тщательно перемешивают в течение 30 мин. Экстракцию проводят дважды. Объединенный экстракт фильтруют в колбу мерную на 100 мл и доводят гексаном до метки. Оптическую плотность измеряют при 450 нм. Раствором сравнения служит гексан [11].

Содержание суммы каротиноидов в мг/° (X) в побегах ивы трехтычинковой рассчитывают по формуле (8):

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1000}{2592 \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (8)$$

где 2592 – удельный показатель поглощения  $\beta$ -каротина при длине волны 450 нм;  $A$ ,  $a$  и  $W$  – см. обозначения формулы 1.

### Обсуждение результатов

Для исследования качественного содержания пигментов в сырье ивы трехтычинковой использовали метод тонкослойной хроматографии, описанный в работе Т.В. Великой с соавт. [13]. Визуально (рис. 1) определяются 7 пятен, одно из которых желтого цвета с  $R_f = 0.79$  относится к  $\beta$ -каротину. Хлорофиллы  $a$  и  $b$  проявляются как пятна сине-зеленого и желто-зеленого цвета с  $R_f = 0.10$  и  $0.08$  соответственно. Коричнево-серого цвета пятно с  $R_f = 0.27$  можно отнести к феофитину. На хроматограмме также проявляется желтое пятно ксантофилла [13].

Определение хлорофилла в сырье ивы трехтычинковой проводили с применением для экстрагирования спирта этилового 96% [24]. Его содержание определяли, используя для расчета удельный показатель поглощения при 664 нм (формула 1) [23] или с помощью расчетных формул. Измерение оптической плотности проводили в максимумах поглощения каротиноидов и ксантофиллов (470 нм), хлорофилла  $a$  (664 нм), хлорофилла  $b$  (649 нм) [24].

Результаты определения пигментов в высушенных побегах представлены в таблице 1. Для сравнительной характеристики накопления хлорофиллов и каротиноидов в исследуемых образцах в таблице 1 представлены результаты по определению пигментов в листьях ивы трехтычинковой, опубликованные ранее в работе Е.Г. Санниковой [26].

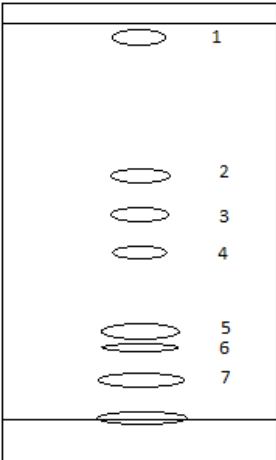
		УФ-свет	Видимый свет	$R_f$
	1 – $\beta$ -каротин	ярко-желтое пятно	желтое пятно	0.79
	2 – неидентифицированное пятно	оранжевое пятно	зеленое пятно	0.35
	3 – феофитин	–	коричнево-серое пятно	0.27
	4 – неидентифицированное пятно	ярко-желтое пятно	желтое пятно	0.23
	5 – хлорофилл $a$	малиновое пятно	сине-зеленое пятно	0.10
	6 – хлорофилл $b$	оранжевое пятно	желто-зеленое пятно	0.08
	7 – ксантофилл	–	желтое пятно	0.05

Рис. 1. ТСХ извлечения побегов ивы трехтычинковой

Таблица 1. Результаты количественного содержания пигментов в сырье (% , n=3)

Время сбора	Вид сырья	Содержание пигментов в сухом сырье, %				Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
		Chl <i>a</i> *	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	<i>C</i> <sub>к+кс</sub>	
Река Подкумок, г. Пятигорск						
сентябрь 2013 г.	листья**	0.13	0.13	0.038	0.020	3.5
май 2014 г.		0.12	0.11	0.084	0.019	1.5
июль 2014 г.		0.24	0.21	0.18	0.029	1.2
сентябрь 2014 г.		0.17	0.18	0.073	0.047	2.4
сентябрь 2013 г.	Побеги	0.081	0.082	0.046	0.018	1.7
сентябрь 2014 г.		0.095	0.088	0.092	0.0052	1.0
Река Малка, КБР						
июнь 2014 г.	листья**	0.11	0.11	0.073	0.023	1.5
июнь 2014 г.	Побеги	0.035	0.035	0.025	0.016	1.4
Река Кубань, Ставропольский край						
август 2014 г.	листья**	0.13	0.14	0.060	0.050	2.3
август 2014 г.	побеги	0.021	0.021	0.012	0.015	1.8

Примечания. \*рассчитано по формуле 1; \*\*результаты представлены из работы Е.Г. Санниковой [27].

Таким образом, количество пигментов (табл. 1) в листьях значительно больше, чем в побегах. Кроме того, содержание пигментов зависит от сезонных факторов (температура, количество солнечного света, экология окружающей среды) и места произрастания. Так, количество хлорофилла в одном месте сбора в сентябре 2013 г. было меньше, чем в сентябре 2014 г. Хлорофилла *a*, найденного с помощью расчетных формул, содержится в листьях в пределах от 0.11 до 0.21%, а в побегах – от 0.021 до 0.088%, и эти данные почти не отличаются от результатов, полученных с использованием значения удельного показателя поглощения. Хлорофилла *b* найдено в листьях от 0.038 до 0.18%, а в побегах – от 0.012 до 0.092%. Найденное содержание суммы каротиноидов и ксантофиллов колеблется от 0.019 до 0.050% в листьях и от 0.0052 до 0.018% в побегах.

В таблице 2 представлены результаты определения каротиноидов в пересчете на β-каротин (формула 8) при применении экстрагента – гексан [11]. Сырье собрано на реке Кубань (Кочубеевский район) в августе 2015 г.

Таким образом, сумма каротиноидов в побегах и листьях не превышает 2.5 мг/%, что не согласуется с данными, полученными по расчетным формулам (табл. 1), так как содержание каротиноидов в сырье при использовании в качестве экстрагента гексана меньше от 2 до 10 раз по сравнению со спиртовыми извлечениями. Можно предположить, что это связано с использованием разных экстрагентов (спирт этиловый 96% и гексан), кроме того, ксантофиллы лучше экстрагируются спиртом этиловым, чем гексаном [24].

Известно, что отношение содержания хлорофилла *a* и хлорофилла *b* (Chl *a*/Chl *b*) является показателем хроматической адаптации и может изменяться от 2.5 до 5.5 [27]. Это соотношение корректно, если определение хлорофиллов проводилось в свежесобранном сырье с соблюдением всех мер предосторожности. Полученные нами данные по соотношению содержания хлорофиллов (табл. 1) лишь на некоторых примерах корректны, а в остальных случаях не превышают значения 2, что связано с определением хлорофиллов в высушенном, а не свежесобранном сырье. Очевидно, это связано с образованием при сушке и длительном хранении феофитина и его производных.

Для определения хлорофиллов в присутствии феофитина используется методика, которая основана на спектрофотометрическом измерении оптической плотности извлечения пигментов до и после его подкисления раствором кислоты хлористоводородной. Этот метод описан в литературе [20, 28] и использован в ГОСТе 17.1.4.02 по определению хлорофилла в водоемах России [29].

Используя данную методику, определили количество феофитина и хлорофилла в листьях ивы трехтычинковой, собранной в окрестностях Пятигорска (река Подкумок) (рис. 2). Содержание феофитина и суммы хлорофиллов рассчитывали по формулам 6, 7 (табл. 3) [25].

Таблица 2. Определение суммы каротиноидов в побегах и листьях ивы трехтычинковой (мг/% , n=3)

Объект исследования	<i>a</i> , г	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	W, %	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	$\bar{X}$
Листья	2.1841	0.126	0.123	5.07	2.33	2.27	2.31
Побеги	2.1643	0.131	0.124	6.21	2.55	2.48	2.52

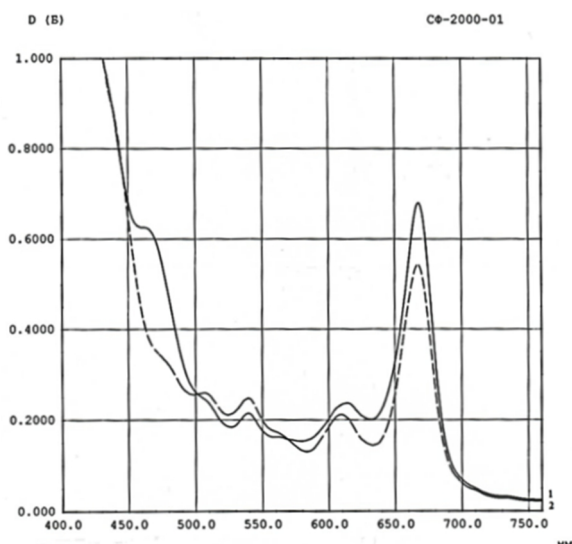


Рис. 2. Спектры поглощения до (1) и после (2) подкисления извлечения ивы трехтычинковой

Таблица 3. Определение при совместном присутствии феофитина и хлорофилла (при 664 нм, разведение 1 : 5, кроме \* – (без разведения))

Время сбора	W, %	$\alpha$ , г на 50 мл 96% этилового спирта	A <sub>1</sub> **	A <sub>2</sub> ***	Найдено феофитина, %	Найдено хлорофилла, %	
						по расчетной формуле	по удельному показателю
2014 г., июль	5.11	0.2001	0.679*	0.543	0.18	0.10	0.19
2015 г., май	7.73	0.2010	0.225	0.163	0.20	0.24	0.32
2015 г., июнь	6.39	0.2692	0.285	0.206	0.19	0.23	0.30
2015 г., июль	7.94	0.2069	0.243	0.171	0.17	0.25	0.33
2015 г., август	6.09	0.2248	0.254	0.176	0.16	0.27	0.32
2015 г., сентябрь	9.52	0.2081	0.235	0.157	0.13	0.30	0.33

Примечания. \*\*A<sub>1</sub> – оптическая плотность извлечения до прибавления кислоты; \*\*\*A<sub>2</sub> – оптическая плотность извлечения после прибавления кислоты.

Таким образом (табл. 3), количество хлорофилла, найденного по формуле 6, отличается от данных, полученных при помощи удельного показателя поглощения, так как при этом учтено образование феофитина. В зависимости от сроков сбора сырья содержание хлорофилла, рассчитанное с помощью удельного показателя поглощения, превышает содержание хлорофилла, рассчитанного по формуле 6, почти в два раза. Из данных таблицы 3 следует также, что при анализе сырья в октябре 2015 г. в сырье, собранном год назад (июль 2014 г.), феофитина найдено почти в два раза больше, чем хлорофилла. В то же время и в 2015 г. можно проследить динамику накопления феофитина в зависимости от срока хранения от 0.20% (сбор в мае 2015 г.) до 0.13% (сбор сентябрь 2015 г.), т.е. чем дольше хранилось сырье, тем больше в нем накапливалось и феофитина. Полученные нами данные подтвердили еще раз этот факт – в сухом сырье содержится и феофитин, и расчет содержания хлорофиллов обязательно надо вести, учитывая наличие феофитинов.

### Выводы

1. С помощью метода ТСХ в листьях (побегах) ивы трехтычинковой найдены пигменты:  $\beta$ -каротин, хлорофиллы *a* и *b*, феофитин и ксантофилл.

2. Спектрофотометрическим методом найдено, что количество хлорофиллов в побегах ивы трехтычинковой находится в пределах от 0.032 до 0.18% и имеет зависимость от сезонных факторов (температура, количество солнечного света и экология окружающей среды) и места произрастания. Данные значения почти в 2 раза отличаются от содержания хлорофиллов в листьях, однако их количество может вносить определенный вклад в фармакологический эффект при пероральном приеме высушенных и измельченных в порошок побегов ивы.

3. Определено, что при хранении и сушке сырья образуется значительное количество феофитина, которое зависит от длительности хранения, в связи с чем при определении хлорофилла в высушенном растительном сырье необходимо использовать методики, при которых учитывается и содержание феофитина.

4. Установлено, что количество каротиноидов при экстракции гексаном содержится в пределах 2.5 мг/% как в побегах, так и в листьях ивы трехтычинковой.

## Список литературы

1. Санникова Е.Г., Фролова О.О., Компанцева Е.В., Попова О.И. Лекарственные средства и БАД, содержащие иву: тенденции и перспективы // Фармация. 2015. №5. С. 51–53.
2. Санникова Е.Г., Сергеева Е.О., Саджая Л.А., Кузнецова Л.С., Компанцева Е.В., Фролова О.О. Фармакотехнологические исследования порошка ивы трехтычинковой побегов // Современные проблемы науки и образования. 2015. №5. URL: <http://www.science-education.ru/128-22354> (дата обращения: 26.10.2015).
3. Дементьева Т.М., Сергеева Е.О., Саджая Л.А., Фролова О.О. Фармакологическое действие коры и побегов ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой // Современные проблемы науки и образования. 2015. №5. URL: <http://www.science-education.ru/128-21893> (дата обращения: 26.10.2015).
4. Фролова О.О., Компанцева Е.В., Дементьева Т.М. Биологически активные вещества растений рода ива (*Salix L.*) // Фармация и фармакология. 2016. №2. С. 41–49.
5. Санникова Е.Г., Попова О.И., Фролова О.О., Айрапетова А.Ю. Изучение флавоноидов ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*), произрастающей на Северном Кавказе // Фармация и фармакология. 2016. №3(16). С. 56–67.
6. Сенченко С.П., Попова О.И., Санникова Е.Г., Крылов Н.Н. Определение фенологликозидов в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*), произрастающей на Северном Кавказе // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2017. №5, вып. 37. С. 176–182.
7. Bonneville M., Saint-Mezard P., Benetiere J., Hennino A., Pernet I., Denus A., Nicolas J-F. Laminaria ochroleuca extract reduces skin inflammation // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2007. Vol. 21, no. 8. Pp. 1124–1125. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2006.02111.x
8. Марченко А.И. Фармакотерапия в стоматологии. Киев, 2006. 251 с.
9. Струсовская О.Г., Лисишников Л.П. Исследование антимикробной активности концентрата хлорофиллов из *Laminaria saccharina* (Laminariaceae L.) // Найновите постижения на Европейската наука – 2011: материали за VII междунар. науч. практ. конф. София, 2011. С. 85–88.
10. Жумабекова С.А., Айсанова А.К., Анашева Т.Г., Иманбекова К.О., Батырбек М.Ж. Антимикробная активность препаратов, содержащих хлорофиллы (Обзор) // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей. 2013. №1. С. 32–33.
11. Курегян А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов // Фундаментальные исследования. 2015. №2 (часть 23). С. 5166–5172 URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=38175> (дата обращения: 05.04.2016).
12. Струсовская О.Г. Определение пигментного состава *Cochlearia officinalis*, произрастающей на островах Соловецкого архипелага // Фармация и общественное здоровье: материалы V Междунар. науч.-практ. конф. Екатеринбург, 2012. С. 184–187.
13. Великая Т.В., Кожанова К.К., Жетерова С.К., Дрегерг О. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica dioica L.*) методом ТСХ // Международный научно-исследовательский журнал. 2016. №1–3 (43). С. 78–80. DOI: 10.18454/IRJ.2016.43.015
14. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Николаева Г.Г., Рохин А.В., Кушнарев Д.Ф. Биологически активные вещества сухого экстракта какалии копьевидной // Химия растительного сырья. 2004. №3. С. 59–62.
15. Лапинская Е.С., Копытько Я.Ф. Изучение состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной (*Urtica dioica L.*) и крапивы жгучей (*Urtica urens L.*) // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42, №12. С. 26–29.
16. Milenković S.M., Zvezdanović J.B., Anđelković T.D., Dejan Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: hplc-chromatography, visible and mass spectroscopy studies // Advanced technologies Introduction. 2012. Vol. 1, no. 1. Pp. 16–24.
17. ГОСТ Р 51485-99. Семена рапса. Определение содержания хлорофилла спектрофотометрическим методом. М., 2010. 7 с.
18. Патент 2244916 (РФ). Способ определения хлорофилла в растениях гречихи / Г.В. Наполова, В.Т. Лобков. 20.01.2005.
19. Оленников Д.Н., Чирикова Н.К., Танхаева Л.М. Химический состав шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) // Химия растительного сырья. 2010. №2. С. 77–84.
20. Eijkelhoff C., Dekker J.P. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes // Photosynthesis Research. 1997. Vol. 52, issue 1. Pp. 69–73.
21. Болотов В.М., Комарова Е.В., Саввин П.Н., Перикова Л.И. Изучение ассоционных взаимодействий каротиноидных пигментов с полигидроксиоксосоединениями // Вестник ВГУИТ. 2012. №3. С. 129–132.
22. Комарова Е.В., Перикова Л.И., Болотов В.М., Флюрик Е.А. Влияние сопутствующих соединений корнеплодов красной моркови на растворимость каротиноидов // Труды БГТУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология. 2014. №4. С. 183–186.
23. Патент 2531940 (РФ). Способ спектрофотометрического количественного определения в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии хлорофилла, каротиноидов и гидроксикоричных кислот / О.В. Тринева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, С.В. Воропаева. 27.10.2014.
24. Minocha R., Martinez G., Lyons B., Long S. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species // Canadian Journal of Forest Research. 2009. N39. Pp. 849–861.

25. Arvola L. Spectrophotometric determination of chlorophyll-a and pheopigments in ethanol extractions // *Ann. Bot. Fennici*. 1981. N18. Pp. 221–227.
26. Санникова Е.Г. Определение хлорофилла в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) флоры Северного Кавказа // *Современная фармация: проблемы и перспективы развития: материалы V Межрегиональной научно-практической конференции*. Владикавказ, 2015. С. 127–130.
27. Мазец Ж.Э., Судейная С.В. Практикум по физиологии растений. Часть I. Минск, 2009. 64 с.
28. Vernon L.P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts // *Analytical Chemistry*. 1960. Vol. 32, no. 9. Pp. 1144–1150.
29. ГОСТ 17.1.4.02-90. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла-а. М., 2010. 14 с.

Поступила в редакцию 21 мая 2018 г.

После переработки 17 января 2019 г.

Принята к публикации 17 января 2019 г.

**Для цитирования:** Санникова Е.Г., Компанцева Е.В., Попова О.И., Айрапетова А.Ю. Определение пигментов в сырье ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии // *Химия растительного сырья*. 2019. №2. С. 119–127. DOI: 10.14258/jcprm.2019024077.

*Sannikova E.G., Kompantseva E.V.\* , Popova O.I., Ayrapetova A.Y.* DETERMINATION OF PIGMENTS IN RAW MATERIALS OF A WILLOW TRIANDRA (*SALIX TRIANDRA* L.)

*The Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of the Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Avenue, Pyatigorsk, Stavropol Territory, Russia, 532532 e-mail: Je-Je4ka2012@yandex.ru*

It is known that various types of willow contain a rich polyphenolic complex of biologically active substances (BAS) (phenolic glycosides, flavonoids, tannins and phenolic acids). The same substances are found in the *Salix triandra*. In view of the fact that oral administration of dried medicinal plant material is now expedient, it is also of interest to study other BASs contained in the plant, in particular, the pigments. Using as an example a willow bine, it is shown that when determining the chlorophyll content in dried plant raw materials, it is necessary to take into account the fact of the pheophytin formation. Using the TLC method, pigments of the willow are found in leaves (bines):  $\beta$ -carotene, chlorophyll a and b, pheophytin and xanthophyll. When using the spectrophotometric method, it is found that the content of chlorophylls in a the willow bines varies from 0.032 to 0.18% and depends on the place of growth and seasonal factors (amount of sunlight, temperature and ecology of the environment). These values are almost 2 times different from the content of chlorophylls in leaves, but their amount can contribute to the pharmacological effect by oral intake of dried and powdered willow bines. It is found that when extracting the raw material with hexane, the content of the sum of carotenoids in terms of  $\beta$ -carotene is found to be not more than 2.5 mg /% in both leaves and bines of *Salix triandra*.

*Keywords:* *Salix triandra*, spectrophotometry, thin-layer chromatography, chlorophylls, carotenoids, pheophytin.

---

\* Corresponding author.



## References

1. Sannikova Ye.G., Frolova O.O., Kompantseva Ye.V., Popova O.I. *Farmatsiya*, 2015, no. №5, pp. 51–53. (in Russ.).
2. Sannikova Ye.G., Sergeeva Ye.O., Sadzhaya L.A., Kuznetsova L.S., Kompantseva Ye.V., Frolova O.O. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2015, no. 5, URL: <http://www.science-education.ru/128-22354>. (in Russ.).
3. Dement'yeva T.M., Sergeeva Ye.O., Sadzhaya L.A., Frolova O.O. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2015, no. 5. URL: <http://www.science-education.ru/128-21893>. (in Russ.).
4. Frolova O.O., Kompantseva Ye.V., Dement'yeva T.M. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2016, no. 2, pp. 41–49. (in Russ.).
5. Sannikova Ye.G., Popova O.I., Frolova O.O., Ayrapetova A.YU. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2016, no. 3(16), pp. 56–67. (in Russ.).
6. Senchenko S.P., Popova O.I., Sannikova Ye.G., Krylov N.N. *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*, 2017, no. 5, issue 37, pp. 176–182. (in Russ.).
7. Bonneville M., Saint-Mezard P., Benetiere J., Hennino A., Pernet I., Denus A., Nicolas J-F. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2007, vol. 21, no. 8, pp. 1124–1125. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2006.02111.x
8. Marchenko A.I. *Farmakoterapiya v stomatologii*. [Pharmacotherapy in dentistry]. Kiev, 2006, 251 p. (in Russ.).
9. Strusovskaya O.G., Lisishnikova L.P. *Naïnovite postizheniya na Evropeiskata nauka – 2011: materialy za VII mezhdunar. nauch. prakt. konf.* [The latest achievements of European science – 2011: Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference]. Sofia, 2011, pp. 85–88. (in Bulgarian).
10. Zhumabekova S.A., Aysanova A.K., Anasheva T.G., Imanbekova K.O., Batyrbek M.ZH. *Vestnik almatinskogo gosudarstvennogo instituta usovershenstvovaniya vrachey*, 2013, no. 1, pp. 32–33. (in Russ.).
11. Kuregyan A.G. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2015, no. 2 (part 23), pp. 5166–5172. URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=38175>. (in Russ.).
12. Strusovskaya O.G. *Farmatsiya i obshchestvennoye zdorov'ye: materialy V Mezhdunar. nauch.-prakt. konf.* [Pharmacy and Public Health: Proceedings of the V International Scientific Practical Conference]. Yekaterinburg, 2012, pp. 184–187. (in Russ.).
13. Velikaya T.V., Kozhanova K.K., Zheterova S.K., Dregert O. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*, 2016, no. 1–3(43), pp. 78–80. DOI: 10.18454/IRJ.2016.43.015. (in Russ.).
14. Olenikov D.N., Tankhayeva L.M., Nikolayeva G.G., Rokhin A.V., Kushnarev D.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2004, no. 3, pp. 59–62. (in Russ.).
15. Lapinskaya Ye.S., Kopyt'ko YA.F. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2008, vol. 42, no. 12, pp. 26–29. (in Russ.).
16. Milenković S.M., Zvezdanović J.B., Anđelković T.D., Dejan Z. *Advanced technologies Introduction*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 16–24.
17. *GOST R 51485-99. Semena rapsa. Opredeleniye soderzhaniya khlorofilla spektrofotometricheskim metodom*. [State standard P 51485-99. Rapeseed seeds. Determination of chlorophyll content spectrophotometric method]. Moscow, 2010, 7 p. (in Russ.).
18. Patent 2244916 (RU). 20.01.2005. (in Russ.).
19. Olenikov D.N., Chirikova N.K., Tankhayeva L.M. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2010, no. 2, pp. 77–84. (in Russ.).
20. Eijkelhoff C., Dekker J.P. *Photosynthesis Research*, 1997, vol. 52, issue 1, pp. 69–73.
21. Bolotov V.M., Komarova Ye.V., Savvin P.N., Perikova L.I. *Vestnik VGUIT*, 2012, no. 3, pp. 129–132. (in Russ.).
22. Komarova Ye.V., Perikova L.I., Bolotov V.M., Flyurik Ye.A. *Trudy BGTU. Khimiya, tekhnologiya organicheskikh veshchestv i biotekhnologiya*, 2014, no. 4, pp. 183–186. (in Russ.).
23. Patent 2531940 (RU). 27.10.2014. (in Russ.).
24. Minocha R., Martinez G., Lyons B., Long S. *Canadian Journal of Forest Research*, 2009, no. 39, pp. 849–861.
25. Arvola L. *Ann. Bot. Fennici.*, 1981, no. 18, pp. 221–227.
26. Sannikova Ye.G. *Sovremennaya farmatsiya: problemy i perspektivy razvitiya: materialy V Mezhdunar. noy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. [Modern Pharmacy: Problems and Development Prospects: Proceedings of the V Interregional Scientific and Practical Conference]. Vladikavkaz, 2015, pp. 127–130. (in Russ.).
27. Mazets ZH.E., Sudeynaya S.V. *Praktikum po fiziologii rasteniy*. [Workshop on plant physiology]. Part I. Minsk, 2009. 64 p. (in Russ.).
28. Vernon L.P. *Analytical Chemistry*, 1960, vol. 32, no. 9, pp. 1144–1150.
29. *GOST 17.1.4.02-90. Voda. Metodika spektrofotometricheskogo opredeleniya khlorofilla a*. []. Moscow, 2010, 14 p.

Received May 21, 2018

Revised January 17, 2019

Accepted January 17, 2019

**For citing:** Sannikova Ye.G., Kompantseva Ye.V., Popova O.I., Ayrapetova A.YU. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 2, pp. 119–127. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019024077.

