

УДК 582.681.81:581.45:543.544.943.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА В ЛИСТЬЯХ ИВЫ ТРЁХТЫЧИНКОВОЙ МЕТОДОМ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е.Г. Санникова, Т.Д. Мезенова

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

DETERMINATION OF RUTIN IN LEAVES OF SALIX TRIANDRA USING THE METHOD OF PLANAR CHROMATOGRAPHY

E.G. Sannikova, T.D. Mezenova

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical
University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk
E-mail: mezenova@yandex.ru*

Целью исследования является разработка методики идентификации и количественного определения рутина в листьях ивы трёхтычинковой (*Salix triandra* L.) методом тонкослойной хроматографии. Цифровую обработку хроматограмм осуществляли с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар). Для хроматографирования использовали пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ, подвижная фаза: н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:1). Детектирующий реагент – пары аммиака. Рутин проявляется в виде пятен жёлтого цвета с R_f 0,64±0,02. Предел обнаружения 0,5 мкг/мкл. Уравнение регрессии имеет вид: $S=4,75 \cdot 10^3 \cdot m$. Содержание рутина в листьях ивы трёхтычинковой, определённое данной методикой, составило 1,81±0,06% в пересчёте на воздушно сухое сырьё (относительное стандартное отклонение $RSD\%=2,5\%$; погрешность определения $E=3,12\%$). Методика чувствительна, линейна, имеет небольшую погрешность, не требует использования дорогостоящей аппаратуры.

Ключевые слова: рутин, листья ивы трёхтычинковой (*Salix triandra* L.), тонкослойная хроматография, идентификация, количественное определение, «Видеоденситометр Sorbfil».

The aim of the study is to develop new methods of identification and quantitative determination of rutin in the leaves of *Salix triandra* L. with thin-layer chromatography. The digital processing of the chromatograms was performed using «Sorbfil Videodensitometer» computer program (Krasnodar). For the chromatography analysis we used plates «Sorbfil» PTSH-P-A-UV, mobile phase: n-butanol-glacial acetic acid-water (4:1:1), detecting reagent – ammonia vapors. The rutin is detected as yellow spots with R_f 0.64±0.02. The detection limit is 0.5 µg/µl. The regression equation has the form: $S=4.75 \times 10^3 \cdot m$. With the use of this method we found that the composition of rutin in leaves of *Salix triandra* was in the range 1.81±0.06% on the air-dry raw material (relative standard deviation $RSD\%=2.5\%$; the measurement error $E=3.12\%$). The method is sensitive, linear, has a small error, and does not require expensive equipment.

Keywords: rutin, leaves of willow triandra (*Salix triandra* L.), thin-layer chromatography, identification, quantitative determination, «Videodensitometry Sorbfil».

Ива трехтычинковая (*Salix triandra* L.) широко распространена на Северном Кавказе. Является высоким быстрорастущим кустарником или небольшим деревцем до 5 – 6 м высотой. Отличается раскидистой густой кроной, длинными прутьевидными желтовато-зелеными побегами и миндалевидными листьями [3]. Ива трехтычинковая относится к секции *Amygdalinae*, которая характеризуется наличием рутина, содержание которого в листьях достигает 5%. Рутин является специфичным для таксона данной секции ивы [2]. Количественное определение рутина в листьях ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) проводилось в 60-е годы XX века хромато-спектрофотометрическим методом, который требовал длительной пробоподготовки. В настоящее время описаны доступные и простые методы определения рутина в растительном сырье. Однако в листьях ивы трехтычинковой до настоящего времени такие определения не проводились. Учитывая, что листья ивы трехтычинковой содержат значительное количество рутина и могут служить потенциальным сырьем для создания лекарственных средств на их основе, актуальным является разработка методики анализа рутина в листьях ивы трехтычинковой более совершенным и надёжным методом анализа.

Цель работы – разработка методики идентификации и количественного определения рутина в листьях ивы трехтычинковой методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Для получения извлечения использовали разные способы.

Способ 1. Навеску сырья массой около 3,0 г (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 100,0 мл со шлифом, прибавляют 50 мл спирта этилового 70%. Настаивают 30 мин при комнатной температуре, затем нагревают на кипящей водяной бане в колбе с обратным холодильником в течение 2 часов. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом до метки, хорошо перемешивают.

Способ 2. Навеску сырья массой около 3,0 г (точная навеска) обрабатывают хлороформом при комнатной температуре (3 раза по 50 мл) для удаления липофильных веществ. Хлороформ отфильтровывают, сырье подсушивают в течение 15 мин в вытяжном шкафу и количественно переносят в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70% и нагревают на

Salix triandra L. is widely spread in the North Caucasus. It is a tall growing shrub or a small tree from 5 to 6 meters. *Salix triandra* has a spreading dense crown, long yellow-green shoots and long leaves [3]. *Salix triandra* refers to section *Amygdalinae*. The plants in this section contain rutin in leaves up to 5%. Rutin is a specific for a taxon of this section of willow [2]. Quantitative determination of rutin in leaves of *Salix triandra* was carried out 60's of the twentieth century by the chromatographic method. This method required a long preparation of the analyte. Nowadays literature describes available and simple methods for the determination of rutin in plant materials are. The rutin analysis in the leaves of *Salix triandra* was not described. The leaves of *Salix triandra* can be a potential raw material for the creation of drugs. The development of improved and reliable analytical methods of rutin analysis in leaves of *Salix triandra* remains actual.

The aim of this work is to develop methods for identification and quantitative determination of rutin in the leaves of *Salix triandra* by using high performance thin-layered chromatography.

To obtain the extract from leaves we used different methods.

Method 1. The raw material (equals 3.0 g) (accurately weighed) was placed in a 100 ml conical flask, then added 50 ml of ethanol (70%) and left for 30 minutes at r.t. Then the flask was connected with reflux condenser, placed in a boiling water bath and since that moment was heated for 2 hours. The obtained extract was filtered through a paper filter into volumetric 50 ml flask, adjusted with alcohol to the mark and mixed well.

Method 2. The raw material (equals 3.0 g) (accurately weighed) is treated with chloroform at room temperature (3 times×50 ml) to remove lipophilic substances. The chloroform is filtered, raw materials is dried in a laboratory fume hood for 15 minutes and transferred quantitatively into a 250 ml flask. Added 50 ml of ethanol (70%) and connected with reflux condenser, placed in a boiling water bath and since that moment heated for 2 hours. The obtained extract was filtered through a paper filter into volumetric 50 ml flask, adjusted with alcohol to the mark and mixed well.

кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом до метки, хорошо перемешивают.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) рутина: 0,1 г рутина (ФС 42-2508-96) (точная навеска), предварительно высушенного при температуре 130-135 °С в течение 3 часов, помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в спирте этиловом 95% при нагревании на водяной бане. Раствор охлаждали до комнатной температуры и довели спиртом раствор до метки. Концентрация рутина в растворе 1,0 мкг/мл.

Для идентификации и количественного определения использовали метод тонкослойной хроматографии с денситометрической регистрацией аналитического сигнала. Хроматографирование проводили на пластинках марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ (г. Краснодар) размером 10x15 см. В качестве подвижной фазы использовали систему н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:1). Высота подъема растворителя 9 см. Детектирование проводили парами аммиака.

На линию старта хроматографической пластинки длиной 15 см наносили 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкл раствора СО (содержание рутина – 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг соответственно). На этой же пластинке обозначали четыре линии контрольных треков, на которые наносили спиртовые извлечения из листьев ивы объемом 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкл. Пробы наносили при помощи микрошприца МШ-10 (агат). Пластинки помещали в камеру для хроматографирования объемом 2000 см³, насыщенную парами растворителя в течение часа. После подъема растворителя на необходимый уровень пластинки вынимали, высушивали в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления паров растворителя. На пластинке появляются пятна желтого цвета. Для усиления окраски пластинку держали над парами аммиака концентрированного.

Далее пластинки сканировали при помощи планшетного сканера «HP Scanjet 3670» (разрешение 100 dpi) и осуществляли их цифровую обработку с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар). Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки (внешнего стандарта) по градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика» (линейная аппроксимация). Статистическая обработка результатов проводи-

Preparation of the reference solution (RS) rutin: 0.1 g rutin (Pharmacopoeia article 42-2508-96) (accurately weighed) was placed into a volumetric 100 ml flask, dissolved in ethanol (95%) at heating on water bath. The solution was cooled to r.t. and adjusted to the mark with ethanol. The concentration of rutin in a solution 1.0 µg/µcl.

To identify and quantify we used thin-layer chromatography with registration of analytical signal by densitometry. We used «Sorbfil» PTLC-P-A-UV plates 10x15 cm. For the mobile phase we used n-butanol glacial acetic acid-water system (4:1:1). The total distance from start to finish line is 9 cm. The stains detection was performed with ammonia vapors.

We put on the start line (on the side 15 cm width) several samples of rutin RS 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 µl with corresponding rutin concentration equals 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 µg/µl. Between the samples on the start line we put samples of alcoholic willow extract from leaves equals 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 µl. The samples were applied using a microsyringe MSH-10 (Agate). The plates were placed in chromatography chamber capacity 2000 cm³. After finishing of the chromatography process from chromatography chamber the plate was removed, dried in a laboratory fume hood at r.t. until all solvent vapors removed. We observed yellow stains on the dried plate. To enhance the color of the stains we put plate into concentrated ammonia vapors. The plates were scanned using a flatbed scanner «HP Scanjet 3670» (resolution 100 dpi), and their digital processing carried out by the computer program «video-densitometry Sorbfil» (Krasnodar). Quantitative determination was performed by absolute calibration (external standard) for the calibration curve «mass of matter – the area of the peak» (the linear approximation). Statistical analysis was performed in accordance with the General Pharmacopoeia article «Statistical analysis of the results of the experiment of chemical and biological testing». [1]

лась в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [1].

На треках контрольного образца визуально обнаруживались пятна жёлтого цвета с $R_f(0,64 \pm 0,02)$, что соответствует окраске и R_f стандартных образцов. На оцифрованной хроматограмме спиртового извлечения появляется пик, соответствующий пикам стандартных образцов рутина (рис. 1).

Эффективность пластинки около 2000 теоретических тарелок (N).

Предел обнаружения (ПО) составляет 0,5 мкг.

Градуировочный график рутина приведён на рисунке 2.

Уравнение регрессии и коэффициент корреляции были рассчитаны в электронных таблицах Microsoft Excel. Уравнение регрессии имеет вид:

$S = 4,75 \times 10^3 m$ (свободный член «а» незначим).

On the control sample tracks we visually detected yellow stains $R_f(0.64 \pm 0.02)$ for all concentration. This correlates with color and R_f for standard samples. On the chromatogram of the alcohol willow extract we detected a peak corresponding to the peaks rutin of standard samples (Fig. 1).

Plate efficiency is about 2000 theoretical plates.

The limit of detection is 0.5 μg .

Rutin calibration curve is shown in Fig.

The regression equation and the correlation coefficient were calculated in the Microsoft Excel. The regression equation is:

$S = 4.75 \times 10^3 m$ (free term «a» is insignificant).

By using a thin-layer chromatography we carried out quantitative determination of rutin

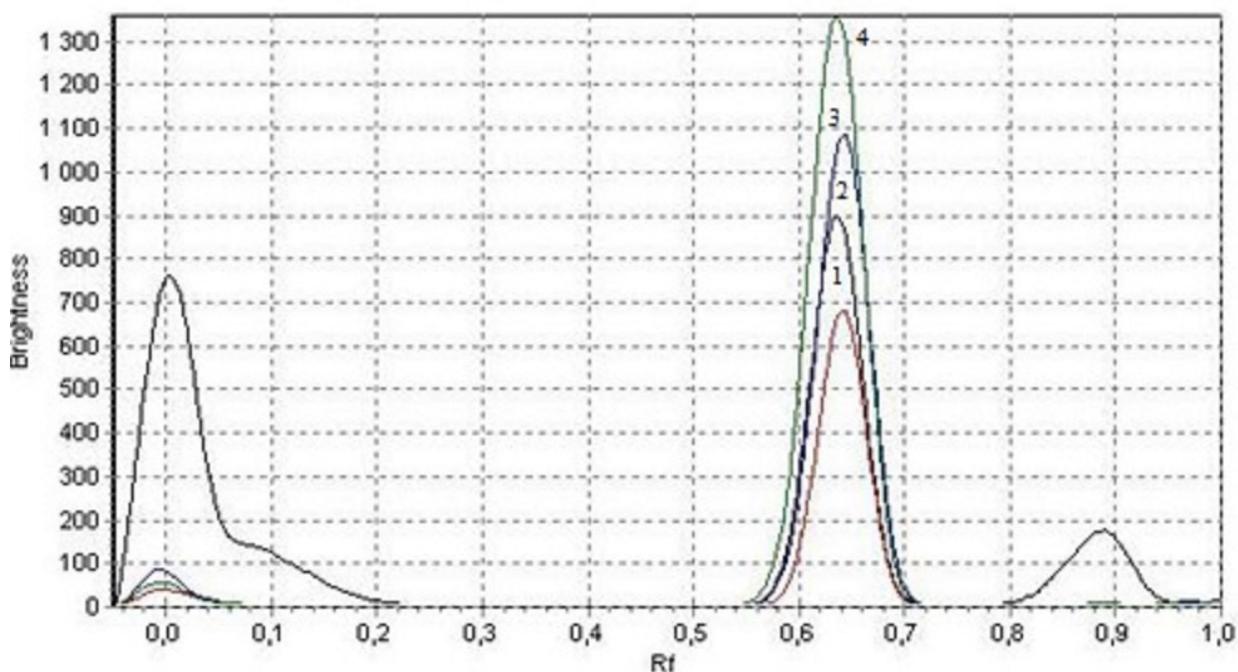


Рисунок 1 – Оцифрованная хроматограмма спиртового извлечения (2) и СО рутина (1-3 мкг/мкл; 3-4 мкг/мкл; 4-5 мкг/мкл)

Figure 1 – Chromatogram of the alcohol extract (2) and rutin RS (1-3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3-4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 4-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Данной методикой было проведено количественное определение рутина в листьях ивы трёхтычинковой. Результаты исследований в пересчёте на воздушно сухое сырьё приведены в таблице 1.

Извлечение рутина из обезжиренного сырья наиболее эффективно.

in leaves of *Salix triandra*. The research results for air-dry raw materials are shown in Table 1.

The extraction of rutin from skimmed raw materials most effectively.

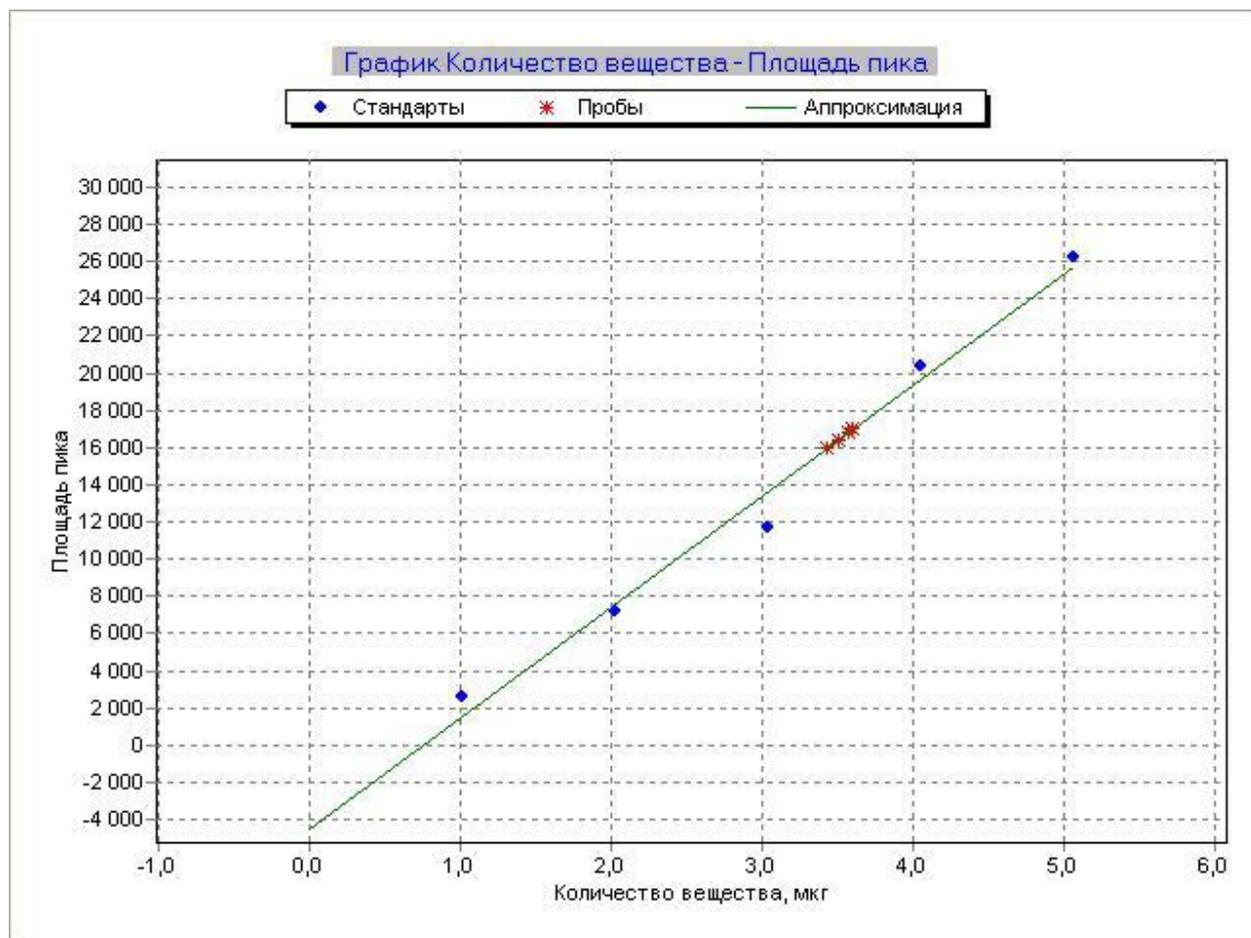


Рисунок 2 – Градуировочный график СО рутина

Figure 2 – The calibration of rutin

◆ Standards
* Samples
— Approximation

Таблица 1 – Результаты количественного определения рутина в листьях ивы трёхтычинковой

Table 1 – Results of quantitative determination of rutin in leaves of *Salix triandra*

Содержание, % (способ 1) / Content, % (method 1)	Метрологические характеристики / Metrological characteristics	Содержание, % (способ 2) / Content, % (method 2)	Метрологические характеристики / Metrological characteristics
1.22	$X_{cp} = 1.2$ $SD = 0.01$ $RSD\% = 2.2\%$ $\Delta X = 0,033$ $E = 2,8\%$	1.85	$X_{cp} = 1.81$ $SD = 0.02$ $RSD\% = 2.5\%$ $\Delta X = 0,06$ $E = 3,12\%$
1.17		1.82	
1.20		1.86	
1.19		1.77	
1.24		1.76	

Выводы

- Предложен эффективный, высокочувствительный метод качественного и количественного определения рутина в растительном сырье. Метод не требует использования сложного дорогостоящего оборудования.

Conclusions

- We propose reliable method of qualitative and quantitative determination of rutin in the plant material. The method does not require the use of complex high-cost equipment.

2. Наиболее полное извлечение рутина из листьев происходит с использованием способа 2 из обезжиренного сырья. Результаты значимо отличаются (t -критерий – 25,7; $t_{\text{табл.}}$ – 2,3).
3. Содержание рутина в листьях ивы трёхтычинковой, определённое данной методикой, составило $1,81 \pm 0,06\%$ в пересчёте на воздушно сухое сырьё.
2. The most complete rutin recovery occurs from leaves by the method 2. The results are significantly different (t_{test} – 25.7; $t_{\text{tab.}}$ – 2.3).
3. The content of rutin in the leaves of *Salix triandra*, performed by described procedure, was $1.81 \pm 0.06\%$ for air dry raw materials and equals $1.91 \pm 0.06\%$ at taking into account the moisture content of raw materials (5%).

Библиографический список

1. Государственная фармакопея СССР. – XI изд. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1. – С. 199-251.
2. Компанцев В.А. Химическое изучение фенольных гликозидов некоторых видов ив Северного Кавказа: дис. ... канд. фармацевт. наук. – Пятигорск, 1970. – 163 с.
3. Род 356. Ива – *Salix* L. Флора СССР: в 30 т. // Под ред. акад. В. Л. Комарова. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1936. – Т. V. – С. 184-186.

* * *

Санникова Евгения Геннадьевна – аспирант кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фитохимическое исследование лекарственных растений. E-mail: dskompanceva@mail.ru

Мезенова Татьяна Дмитриевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: анализ биологически активных соединений. E-mail: mezenova@yandex.ru

References

1. USSR State Pharmacopoeia XI edition, vol. 1, Medicine, Moscow, 1987, p. 199 – 251.
2. Kompantsev V.A. Chemical studies of phenolic glycosides some species of willows of the North Caucasus: PhD (pharmacy field). Sciences. Pyatigorsk, 1970, p. 163.
3. Genus 356. Willow – *Salix* L. Flora of the USSR. 30 V. Ch. Ed. and ed. Volume Acad. V.L. Komarov. M.-L.: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1936, vol. 5, pp. 184-186.

* * *

Sannikova Eugeniya Gennadyevna – pharmacognosy graduate student of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk. Area of expertise: phytochemical research of medicinal plants. E-mail: dskompanceva@mail.ru

Mezenova Tatyana Dmitrievna – Candidate of Pharmaceutical Sciences, senior Lecturer, Department of Analytical Chemistry at Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk. Area of expertise: analysis of biologically active compounds. E-mail: mezenova@yandex.ru