

Н. Н. Шевелева, Л. Ю. Грунин, А. И. Шургин,
Т. Р. Дебердеев, Л. Р. Валиуллин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ САЛИЦИЛАТОВ В КОРЕ ИВЫ ОСТРОЛИСТНОЙ МЕТОДОМ ЯМР-РЕЛАКСАЦИИ

Ключевые слова: биологически активные вещества, ядерный магнитный резонанс, ива остролистная.

Современное производство требует внедрения быстрых и высокоточных методов оценки контроля качества производимой продукции в течение всего технологического процесса. В данной работе рассмотрена возможность применения метода, в основе которого лежит явление ядерного магнитного резонанса, для определения содержания фенольных гликозидов, содержащихся в древесной коре. Обнаружена воспроизводимая корреляция между содержанием салицилатов и временем продольной релаксации в коре ивы. Результаты исследования могут быть основой для создания методик измерения в отрасли.

Keywords: biological active compounds, nuclear magnetic resonance, *Salix acutifolia*

Modern processing industries require implementation of fast and high precision techniques of quality analysis/quality control nearly in all stages of production processes. At this particular work it is given the try to use the NMR-based method for measurements of phenol glycosides content in shrub and trees bark. We have found the reproducible correlation between the salicin derivatives content and the longitude NMR relaxation times in willow bark. These results can be considered as the base for development of the industry standard measurement technique.

Введение

В последние годы лекарственные препараты, содержащие биологически активные вещества растительного происхождения, имеют все больший спрос на мировом рынке. В отличие от синтетических медикаментов натуральные лекарственные препараты реже вызывают осложнения, особенно аллергические реакции. Натуральные лекарственные препараты, нормализуя функцию отдельных органов, положительно влияют на обмен веществ в организме [1]. К вторичным метаболитам, представляющим большой интерес для фармакологии, относятся салицилаты, фенольные соединения, содержащиеся в коре различных видов *Salix* [2]. Они обладают рядом лекарственных свойств, а в составе фармацевтических препаратов дают меньше побочных эффектов по сравнению с их синтетическими аналогами [3, 4, 5]. Установлено, что максимальное содержание салицилатов находится в коре деревьев *S. acutifolia* и варьирует от 4,0 до 11,3 % [6, 7]. Для анализа химической структуры и выявления путей синтеза вторичных растительных продуктов успешно применяются как химические, так и физико-химические аналитические методы. Определение содержания общего салицина в коре ивы осуществляется методом ВЭЖХ, преимуществом которого является высокая точность получаемых результатов, а недостатком – длительная пробоподготовка [1].

Физиологические, морфологические и селекционные исследования растительных объектов требуют разработки новых технических решений и методов неразрушающего анализа исходного биологического материала, а дальнейшее развитие производства – повышения эффективности технологических процессов, которое может быть достигнуто с помощью внедрения экспресс-методов высокой точности определения и контроля качества изготавливаемой продукции в течение всего производства от стадии получения сырья. Методы, основанные на явлении ядерного магнитного резонанса (ЯМР), на-

ходят практическое применение во многих отраслях, о чем свидетельствует растущее число аккредитованных методик [8, 9, 10]. Однако возможности ^1H ЯМР-релаксации до сих пор не были эффективно использованы для изучения природных фенольных гликозидов. В данной работе предпринята попытка выявить зависимость ЯМР-релаксационных характеристик коры ивы остролистной, а именно времени спин-решеточной релаксации T_1 , от содержания салицилатов в ней с целью разработки экспресс-метода определения содержания салицина методом ЯМР.

Обсуждение результатов

Объектами исследования были 22 образца воздушно-сухой коры ивы остролистной, измельченной до частиц размером менее 2 мм.

Для определения содержания салицина навеску воздушно-сухой коры (1 г), экстрагировали 10 % раствором этилового спирта, а затем нагревали в колбе с обратным холодильником в течение 30 мин. Далее экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр. Затем к готовому экстракту добавляли 0,5 мл 0,1н NaOH и выдерживали в течение 60 мин. при 60 °С. После этого добавляли 0,5 мл 1н HCl для остановки гидролиза. Для хроматографирования использовали образец смеси, предварительно очищенной с помощью мембранного фильтра PTFE-13-2 (Supelco) с диаметром пор 0,2 мкм, согласно методики [1]. Хроматографический анализ проводили на хроматографе PerkinElmer Series 200 с бинарным насосом и спектрофотометрическим детектором.

Измерение времени спин-решеточной релаксации T_1 образцов коры проводилось с помощью ЯМР-анализатора низкого разрешения «Спин Трек» [11] с использованием импульсной последовательности $90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$.

Салицин является фенольным гликозидом и ключевым промежуточным продуктом в метаболитном обмене салицилатов. В состав молекулы сали-

цина входит углеводная и ароматическая части, которые непосредственно влияют на время спин-решеточной релаксации (T_1) увеличивая его. Было выдвинуто предположение, что значения времени T_1 ивовый коры и концентрация салицина в ней могут коррелировать.

Тестовые эксперименты проводились на модельных образцах, в качестве которых были приготовлены водные растворы салицина с концентрацией от 3-12 %. Было обнаружено, что значение времени продольной релаксации зависит от содержания салицина в водном растворе и увеличивается с ростом концентрации (рис. 1).

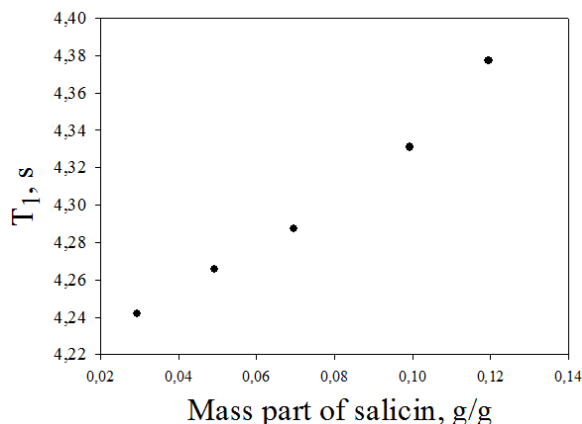


Рис. 1 – Зависимость времени релаксации T_1 от концентрации водного раствора салицина

Влияние салицина на удлинение времени спин-решеточной релаксации было использовано, в качестве отправной точки для следующей части эксперимента. Были проведены измерения значений времени T_1 у 22 образцов коры с естественным разбросом содержания салицина в пределах 6,5 – 12,2 %, которое предварительно измерялось при помощи метода ВЭЖХ. Данные, представленные на графике (рис. 2) отражают зависимость времени продольной

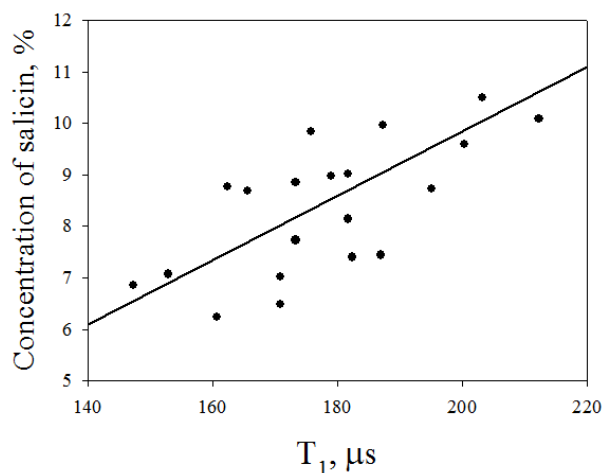


Рис. 2 – Зависимость времени релаксации T_1 от содержания общего салицина в коре ивы

релаксации от содержания салицина в коре. Значения T_1 варьируют от 148 до 212 мс – это значительно меньше, чем в модельных образцах, где они составляют порядка 4 с, что можно объяснить вкладом

различных компонентов коры в увеличение скорости продольной релаксации. Тем не менее, как и в модельном эксперименте, тенденция роста T_1 воздушно-сухой коры при увеличении концентрации салицилатов сохранилась.

На рисунке 3 показан график, отражающий корреляцию значений содержания салицина, полученных методом ЯМР и ВЭЖХ. Значение среднеквадратичного отклонения данных ЯМР от ВЭЖХ составило примерно 1%, что сопоставимо с точностью стандартного метода. Учитывая, что время измерения T_1 не превышает двух-трех минут, можно с уверенностью утверждать, что этот показатель может быть использован для создания методики экспресс определения содержания салицилатов в коре.

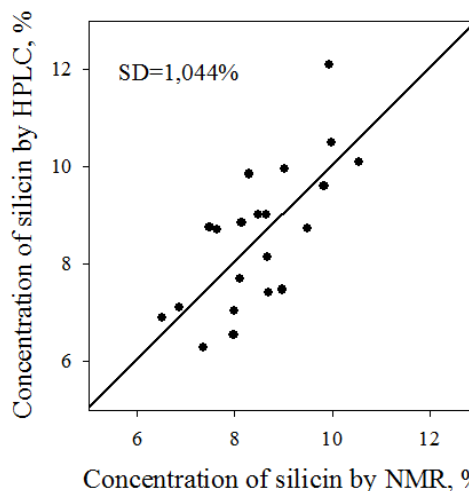


Рис. 3 – Сравнение данных по содержанию общего салицина методом ВЭЖХ и ЯМР-релаксации

Выводы

В работе рассмотрена возможность использования времен ЯМР релаксации воздушно-сухой коры для определения общего содержания салицилатов. Полученные результаты дают теоретическую основу для создания методики экспресс-оценки *in vitro* количества салицина в коре, при этом точность методики оказывается сопоставимой с точностью общепринятого метода ВЭЖХ, а время измерения сокращается с 1,5 часа до 2 минут, значительно снижается трудоемкость пробоподготовки. При этом появляются предпосылки создания методик *in vivo*, в случае использования переносных ЯМР устройств.

Литература

1. А.В. Коптина. Дисс. канд. тех. наук, Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти, Щёлково, 2010. 149 с.;
2. G. G. Zapesochnaya, V. A. Kurkin, V. B. Braslavskii, N. V. Filatova, CONC, 38, 4, 314-318 (2002);
3. J. Vlachoianis, F. Magora, S. Chrusasik, Phytother. Res., 25, 7, 1102-1104 (2011);
4. A. Jedinak, T. Maliar, D. Grancai, M. Nagy, Phytother. Res., 20, 3, 214-217 (2006);
5. H.A. El-Shemy, A.M. Aboul-Enein, M.I. Aboul-Enein, S.I. Issa, K. Fujita, J. Biochem. Mol. Biol., 36, 4, 387-389 (2003);

5. А.В. Коптина, А.И. Шургин, А.В. Канарский, Известия ВУЗов. Лесной журнал, 5, 52-55 (2008);
6. Е.Е. Большакова, А.И. Шургин, Р.В. Сергеев, П.С. Новиков, Н.Н. Шевелева, Л.Ю. Грунин, Научный журнал КубГАУ, 93, 321-333 (2013);
7. ГОСТ Р 53158-2008. Масла растительные, жиры животные и продукты их переработки. Определение содержания твердого жира методом импульсного ядерно-магнитного резонанса. – М.: Изд-во Стандартов. – 2008, 15 с.;
8. ISO 10565:1998. Oilseeds – Simultaneous determination of oil and water contents – Method using pulsed nuclear magnetic resonance spectroscopy. – British standard. – , 1998, 12 p.;
9. ASTM D7171 – 05(2011) Standard Test Method for Hydrogen Content of Middle Distillate Petroleum Products by Low-Resolution Pulsed Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy;
10. ЯМР анализатор «Спин Трек», www.nmr-design.com.

© **Н. Н. Шевелева** – старший преподаватель, кафедра СПС, ботаники и дендрологии, ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный технологический университет» г. Йошкар-Ола, **Л. Ю. Грунин** – к.х.н., доцент кафедры физики, ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный технологический университет» г. Йошкар-Ола, **А. И. Шургин** – к. с-х. н., доцент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный технологический университет» г. Йошкар-Ола, **Т. Р. Дебердеев** – д.т.н., доцент, заведующий кафедрой технологии переработки пластмасс и композитных материалов ФГБОУ ВПО «КНИТУ», **Л. Р. Валиуллин** – к.б.н., с.н.с., заведующий сектором экотоксикологии ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань

N. N. Sheveleva - senior lecturer, Department of Landscape Architecture, Botany and Dendrology, Volga State University of Technology (Yoshkar Ola); **L. Y. Grunin** - PhD of Chemistry, Associate Professor, Department of Physics, Volga State University of Technology (Yoshkar Ola); **A. I. Shurgin** - PhD of Agriculture, assistant professor Department of Forest Selection, Non-Wood Products and Biotechnology, Volga State University of Technology (Yoshkar-Ola), **T. R. Deberdeev** - Dr. of Science, Head of the Department of Technology of plastic and composite materials, KNRTU (Kazan); **L. R. Valiullin** - PhD of Biology, Senior Scientist, Head of Ecotoxicology department, Federal Centre for Toxicological, Radiation and Biological Safety (Kazan).