

ХРОМАТОДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИСТЬЕВ БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.)

ВЕРНИГорова М.Н., Бузук Г.Н.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №5. – С. 107-113.

CHROMATODENSITOMETRIC STUDY OF THE COMMON LINGONBERRY LEAVES (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.)

VERNIGOROVA M.N., BUZUK G.N.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2019;18(5):107-113.

Резюме.

Проанализированы листья брусники обыкновенной, заготовленные в местах естественного произрастания в окрестностях г. Витебска Республики Беларусь. С помощью хроматоденситометрического способа изучались условия проведения хроматоденситометрического определения арбутина в листьях брусники. Подобраны система растворителей, концентрация реагента-проявителя (реактив Гиббса) для хроматоденситометрического способа определения арбутина в листьях брусники обыкновенной. Изучен характер зависимости цветометрических характеристик пятен арбутина от его количества в хроматографической зоне. Выявлена линейная зависимость цветометрических характеристик зон арбутина от его количества в хроматографической зоне. Было проведено сравнение хроматоденситометрического способа определения арбутина в листьях брусники с методом ВЭЖХ. Установлено, что результаты ВЭЖХ сопоставимы с результатами хроматоденситометрического способа определения арбутина в листьях брусники обыкновенной, что дает основание сделать вывод о достаточно высокой точности хроматоденситометрического способа и делает возможным его применение для качественного и количественного определения арбутина в листьях брусники. Изучались различные условия экстракции арбутина из листьев брусники обыкновенной. Построены графики зависимости полноты экстракции арбутина из листьев брусники обыкновенной при различных условиях экстракции. Подобраны оптимальные условия экстракции арбутина (степень измельченности листьев брусники – 2 мм, время экстракции – 40 минут, экстрагент – вода).

Ключевые слова: *Vaccinium vitis-idaea* L., брусника обыкновенная, арбутин, листья, ВЭЖХ, хроматоденситометрический способ, хроматографическая зона, хроматограмма, цветометрические характеристики, условия экстракции, измельченность, время экстракции, экстрагент, реактив Гиббса, площадь пятна, пиксели, линейная зависимость, количественное определение, качественное определение.

Abstract.

The leaves of common lingonberry harvested in the places of its natural growth in the vicinity of the city of Vitebsk of the Republic of Belarus have been analyzed using the chromatodensitometric method. The conditions of the chromatodensitometric method use for determining arbutin in the common lingonberry leaves have been studied. The solvent system, the concentration of the reagent-developer (Gibbs reagent) for the chromatodensitometric method used to determine arbutin in the common lingonberry leaves have been selected. The character of the dependence of the colorimetric characteristics of arbutin spots on its quantity in the chromatographic zone has been studied. A linear dependence of the colorimetric characteristics of arbutin zones on its quantity in the chromatographic zone has been revealed. The chromatodensitometric method of the determination of arbutin in the common lingonberry leaves has been compared to that of HPLC. It has been established that the HPLC results are comparable with those obtained by means of the chromatodensitometric method of determining arbutin in the common lingonberry leaves, which gives grounds to conclude that the chromatodensitometric method is rather accurate and may be used for the quantitative and qualitative

determination of arbutin in the common lingonberry leaves. Various conditions for the extraction of arbutin from the leaves of common lingonberry have been studied. The graphs of the dependence of the completeness of the common lingonberry leaves arbutin extraction under various extraction conditions have been constructed. Optimal conditions for the extraction of arbutin have been selected (the degree of crushing the lingonberry leaves – 2 mm, extraction time – 40 minutes, the extractant – water).

Key words: Vaccinium vitis-idaea L., common lingonberry, arbutin, leaves, HPLC, chromatodensitometric method, chromatographic zone, chromatogram, colorimetric characteristics, extraction conditions, grinding, extraction time, extractant, Gibbs reagent, spot area, pixels, linear dependence, quantitative determination, qualitative determination.

За последние годы существенно возрос интерес к лекарственным средствам растительного происхождения. Технология производства препаратов на основе лекарственного растительного сырья является финансово более выгодной. Фитопрепараты в большей степени безопасны в сравнении с химически модифицированными аналогами.

Брусника – невысокий (до 20 см) кустарник семейства брусничных, с ползучим, тонким корневищем. Листья очередные, эллиптические. На нижней стороне листа имеются черные точечные железки. Цветки белого или розового цвета, собраны в густые, поникшие кисти. Плоды красные, имеют круглую форму, по типу плода – многосемянные ягоды. Цветет брусника в конце весны – начале лета, плоды созревают в августе-сентябре. Растет в основном в лиственных и хвойных лесах, образуя местами сплошные заросли. В качестве лекарственного сырья используют листья. Листья заготавливают в два срока – ранней весной до начала цветения растения, а также после созревания плодов. Листья брусники содержат фенолы и их производные: арбутин, метиларбутин, β -D-глюкозид гидрохинона, пирозид (6-ацетиларбутин), 2-O-кофеиларбутин, гидрохинон, вакцинин, салидрозид (0.015%); флавоноиды: кемпферол, кверцетин, 3-D-глюкозил-L-рамнозид кверцетина, изокверцитрин, рутин, 3-L-рамнозид кемпферола, 3-D-глюкозид кемпферола, авикулярин, гиперозид, гвайяверин, 3-O- β -D-галактопиранозид лютеолина, 3-O- β -D-глюкопиранозид лютеолина, 4'-O-ацетилкверцетин, (+)-катехин, (-)-эпикатехин, (+)-галлокатехин; дубильные вещества: гидролизуемые (циннамтанин B1), конденсированные (проантоцианидин A1); фенолкарбоновые кислоты: хлорогеновая, кофейная, изохлорогеновая, неохлорогеновая, феруловая, о-пирокатеховая, галловая, хинная, эллаговая.

Брусника – довольно часто используемое растение в медицине. Известны различные

эффекты, оказываемые брусникой на организм человека. Листья брусники являются официальным лекарственным растительным сырьем, оказывают дезинфицирующее и мочегонное действие, применяются при камнях в почках, подагре, пиелонефрите, цистите. Антибактерицидное действие обусловлено арбутином и метиларбутином. Под действием микрофлоры кишечника арбутин и метиларбутин разрушаются на гидрохинон и гидрохинон метила. Именно гидрохинон обуславливает фармакологические эффекты листьев брусники. Производные гидрохинона оказывают антисептический и вяжущий эффекты на слизистые оболочки мочевого пузыря. Разрушение гидрохинона происходит в почках, продукты разложения выводятся с мочой.

Стандартизацию листьев брусники проводят по арбутину. Используют несколько методов количественного определения арбутина. Количественное определение арбутина можно проводить с использованием фотоколориметрического метода (образование азокрасителя после взаимодействия арбутина с диазотированным сульфаниламидом [1], метода ВЭЖХ, а также спектрофотометрическим методом (измерение оптической плотности в видимой области спектра после получения антипиринового красителя [2]) или спектрофотометрического метода определения после очистки извлечения на колонке с алюминия оксидом, методом спектрофотометрии с использованием гидрохинона в качестве стандарта [4] и хроматоспектрофотометрическим методом, основанным на применении оксида алюминия для очистки арбутина от сопутствующих веществ [3]. Также существует метод количественного определения арбутина с помощью йодометрического титрования [5].

В фармакопее ГФ РБ предложено два способа количественного определения арбутина: титрование раствором иода в присутствии крахмала после осаждения балласных и сопутствующих веществ с помощью основного ацетата свинца

и экстракционная спектрофотометрия с использованием аминопиразолона. Однако оба способа достаточно длительные.

Для качественного и количественного анализа действующих веществ из лекарственного растительного сырья все чаще используются экспрессные методики т.к. они требуют меньших временных и финансовых затрат. Одной из экспрессных методик является способ хромато-денситометрии применительно к анализу лекарственного растительного сырья. Денситометрия (от лат. *densitas* – плотность) дословно означает «измерение плотности». Суть способа видеоденситометрии заключается в измерении интенсивности цвета (его плотности) изучаемого объекта (в нашем случае экстракта листьев брусники) относительно количественного и качественного содержания вещества, дающего окраску. Нами впервые предложен более экспрессный и доступный метод определения арбутина в листьях брусники с использованием хромато-денситометрического способа.

Материал и методы

Объектом исследования были выбраны листья брусники, заготовленные в апреле 2011 г. в местах естественного произрастания. Образцы высушивали в тени при комнатной температуре. Образцы листьев брусники хранили в бумажных пакетах при комнатной температуре.

Определение оптимальных условий экстракции арбутина проводили по разработанной методике, включающей экстракцию арбутина из растительного сырья, тонкослойную хроматографию очищенного экстракта, проявление хроматограммы реактивом Гиббса, преобразование хро-

матограммы в цифровое изображение, обработку цифрового изображения с помощью программы ImageJ.

Эффективность экстракции определяли по площадям пиков хроматографических зон арбутина, полученных на хроматограмме.

На втором этапе был изучен характер зависимости цветометрических характеристик пятен арбутина от его количества в хроматографической зоне. Для этого была получена и проявлена хроматограмма с нанесенными экстрактами брусники в количестве от 1 мкл до 8 мкл. После нанесения всех экстрактов хроматограмму высушивали, помещали в стеклянную камеру с системой (этилацетат : метанол : вода, 10:1,35:1), погружали в реактив Гиббса (0,5% метанольный раствор 2,6-дихлорогуинон-4-хлоримида), затем на несколько секунд погружали хроматограмму в пары аммиака после чего оставляли на 30 минут до появления синей окраски пятен арбутина. Хроматографические зоны арбутина проявлялись в виде полосок синего цвета. Затем хроматограмму сканировали. В работе применяли сканер марки EPSON Perfection 1270 в режиме цветного сканирования и разрешении 300 dpi. Полученное изображение обрабатывали с помощью программы ImageJ.

На полученной денситограмме хорошо прослеживается зависимость высоты и площади пиков интенсивности окраски (отражающей способности) пятен арбутина от его количества в хроматографической зоне (рис. 1).

По результатам эксперимента был построен калибровочный график зависимости площади (в пикселах) пиков окраски пятен арбутина от его количества в хроматографической зоне (рис. 2).

На рисунке 2 наблюдается линейная зависимость между площадью пиков окраски пятен

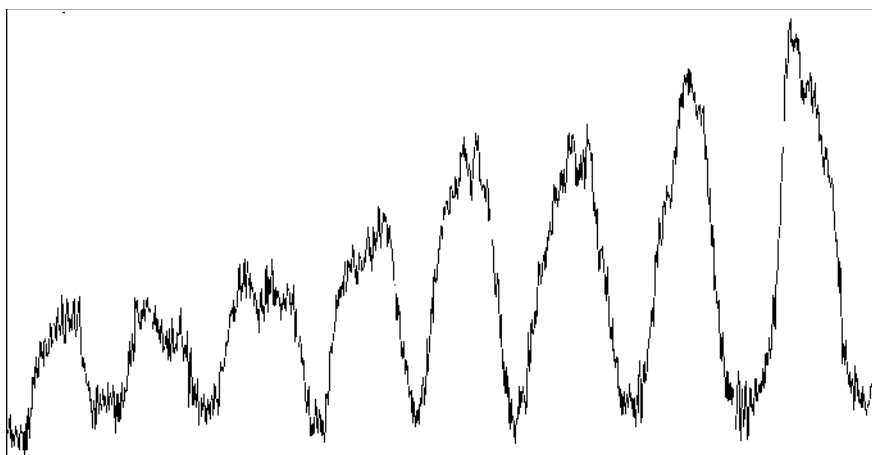


Рисунок 1 – Денситограмма экстрактов брусники.

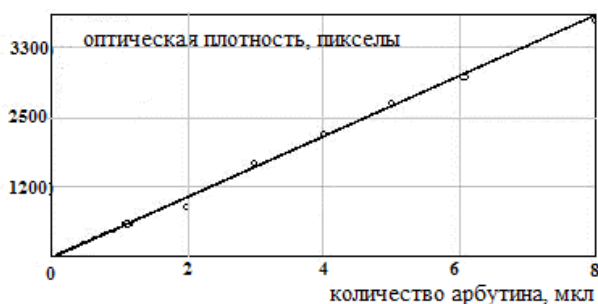


Рисунок 2 – График зависимости площади пятна (в пикселях) от количества арбутина в хроматографической зоне.

арбутина и его количества в хроматографической зоне. Уравнение калибровочного графика:

$$Y = a + bX = 1027,8 + 1153,9X (R^2=0,995)$$

Полученные результаты позволяют использовать этот способ для количественного определения арбутина в экстракте листьев брусники.

Далее изучалась сопоставимость хроматоденситометрии со стандартными методиками. Для этого нами для анализа были взяты листья брусники, заготовленные в 2009 г., 2010 г. и 2011 г. в местах естественного произрастания.

Как метод сравнения для определения арбутина нами был использован метод ВЭЖХ. На первом этапе исследования количественное определение арбутина в трех образцах листьев брусники проводили методом ВЭЖХ. К навеске сырья (0,1 г) прибавляли 5 мл дистиллированной воды. Для экстракции использовали водяную баню. Длительность экстракции составляла 40 минут. К горячему экстракту прибавляли основной ацетата свинца (0,1 г). Центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость помещали в чистую емкость. Затем определяли содержание арбутина в образцах листьев брусники на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100. Определение проводили на хроматографической колонке Zorbax StableBondC-18 250×4,6 мм, с размером частиц 5 мкм, при температуре колонки 30°. 0,01 М калия дигидрофосфат (значение pH=3,0±0,2 создается при помощи фосфорной кислоты P) и ацетонитрил для хроматографии использовали в качестве подвижной фазы, скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем пробы 25 мкл. Измерение проводили при длине волны 280 нм [6]. В качестве стандарта использовали стандартный раствор арбутина производителя Sigma.

Готовый экстракт и стандарт арбутина в количестве 3 мкл капилляром наносили на хро-

матографическую пластинку в виде пятна. Пластинку с нанесенным экстрактом и стандартом помещали в камеру с системой (этилацетат : метанол : вода, 10:1,35:1). Стандартный раствор арбутина готовили растворением 50 мг арбутина в 100 мл дистиллированной воды.

После хроматографирования пластинку высушивали и затем погружали в реактив Гиббса (0,5% метанольный раствор 2,6-дихлорогуинон-4-хлоримида). Затем пластинку помещали в пары аммиака и на 30 минут оставляли высохнуть до появления хроматографических зон синего цвета. Полученную хроматограмму сканировали и обрабатывали, используя компьютерную программу Imagej. Содержание арбутина определяли по площадям пиков хроматографических зон экстракта в пересчете на содержание арбутина в хроматографической зоне стандарта.

Далее определялась оптимальная степень измельченности листьев брусники для эффективной экстракции арбутина. Экстракты готовили в соотношении 0,1:5 – сырье : экстрагент соответственно. Степень измельчения сырья варьировала от 0,5 до 3,0 мм. В качестве экстрагента использовалась вода. Условия экстракции и приготовления экстракта, а также обработки хроматограмм полностью соответствовали условиям эксперимента по сопоставлению результатов ВЭЖХ и хроматоденситометрии.

Оптимальное время экстракции подбирали путем экстрагирования биологически активных веществ из листьев брусники в 5 пробах в течение 20, 40, 60, 80, 100 мин соответственно. Условия экстракции и приготовления экстракта, а также обработки хроматограмм полностью соответствовали условиям эксперимента по подбору оптимальной степени измельченности листьев.

Также нами подбирался экстрагент для оптимального извлечения арбутина из брусники листьев. Для этого использовали воду очищенную и этиловый спирт в 7 концентрациях (10%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80% и 96%).

Результаты и обсуждение

Для расчета содержания арбутина хроматоденситометрическим способом в 3-х образцах листьев брусники на хроматографическую пластинку был нанесен стандартный раствор арбутина и три экстракта в количестве 3 мкл. После обработки хроматограммы реактивом Гиббса арбутин проявился в виде окрашенных в синий

цвет хроматографических зон (рис. 3).

Формула расчета содержания арбутина в процентах в листьях брусники:

$$X = \frac{S_x \times C \times 0,5}{S_a \times m}$$

где:

X – содержание арбутина (мг) в исследуемом экстракте;

Sx – площадь пика пятна исследуемого экстракта;

C – содержание арбутина в растворе сравнения, мг/мл;

Sa – площадь пика пятна стандартного раствора арбутина;

m – масса навески испытуемого сырья, г.

1-й образец листьев брусники: Sa=36035, Sb=15898

$$X=36035*0,5*0,5/15898*0,1=5,7\%$$

2-й образец листьев брусники: Sa=43348, Sb=15898

$$X=43348*0,5*0,5/15898*0,1=6,8\%$$

3-й образец листьев брусники: Sa=36036, Sb=15898

$$X=36036*0,5*0,5/15898*0,1=5,6\% \text{ (табл. 1)}$$

Данные эксперимента показали, что полученные результаты количественного определения арбутина двумя различными методами существенно не различаются, что дает основание

сделать вывод о достаточно высокой точности хроматоденситометрического способа и делает возможным его применение для качественного и количественного определения арбутина в листьях брусники.

Наиболее эффективная экстракция арбутина происходит при степени измельченности сырья, равной 2 мм (рис. 5, 6).

Оптимальным временем экстракции арбутина из листьев брусники оказалось время 40 минут (рис. 7, 8).

Более полная экстракция арбутина происходит при использовании в качестве экстрагента воды очищенной (рис. 9, 10).

Заключение

1. Разработан хроматоденситометрический способ определения арбутина в листьях брусники обыкновенной.

2. Зависимость цветометрических характеристик зон арбутина от его количества в хроматографической зоне имеет линейный характер.

3. С помощью хроматоденситометрии было обнаружено, что оптимальными условиями экстракции арбутина из листьев брусники обыкновенной являются: степень измельченности листьев брусники – 2 мм, время экстракции – 40 минут, экстрагент – вода.

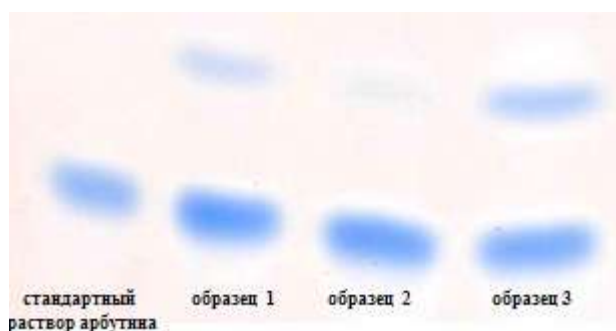


Рисунок 3 – Хроматографические зоны 3-х различных образцов листьев брусники и стандартного образца арбутина.

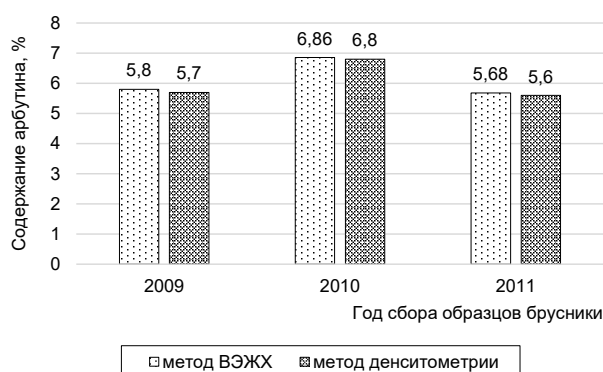


Рисунок 4 – Диаграмма сравнения содержания арбутина в листьях брусники по хроматоденситометрическому способу и методу ВЭЖХ.

Таблица 1 – Содержание арбутина в листьях брусники

Образец листьев брусники (год заготовки)	Содержание арбутина по методу ВЭЖХ	Содержание арбутина по хроматоденситометрическому способу
2009	5,8%	5,7%
2010	6,86%	6,8%
2011	5,68%	5,6%

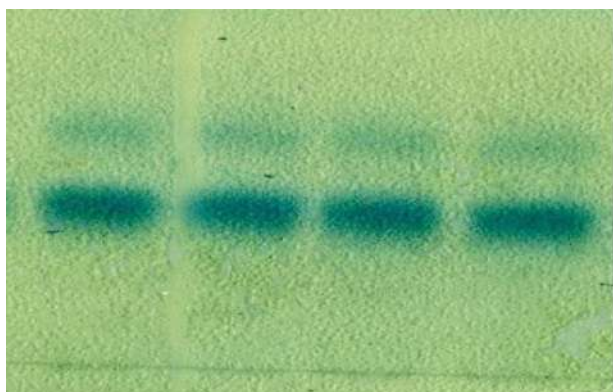


Рисунок 5 – Хроматографические зоны экстрактов листьев брусники с различной степенью измельчения сырья.

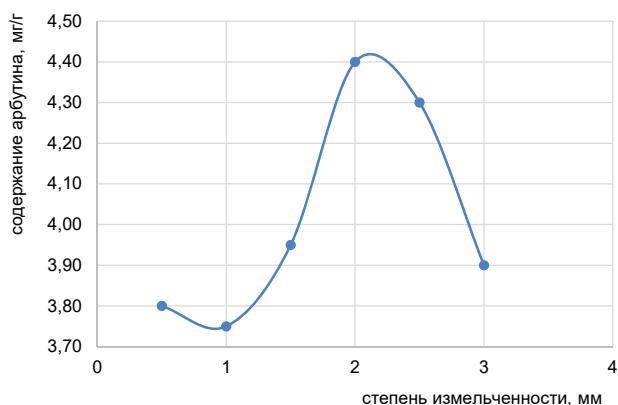


Рисунок 6 – График зависимости экстракции арбутина от степени измельченности сырья.

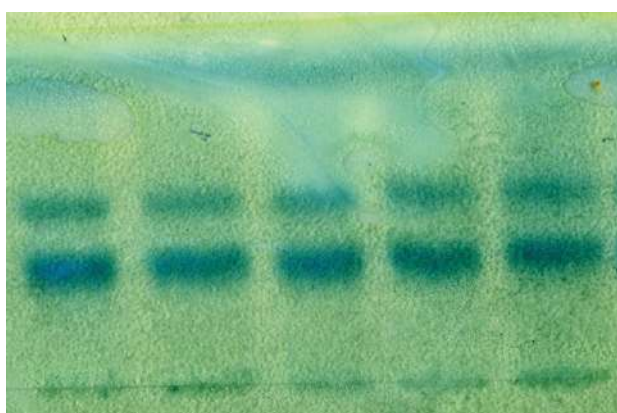


Рисунок 7 – Хроматографические зоны экстрактов из листьев брусники с различным временем экстракции.

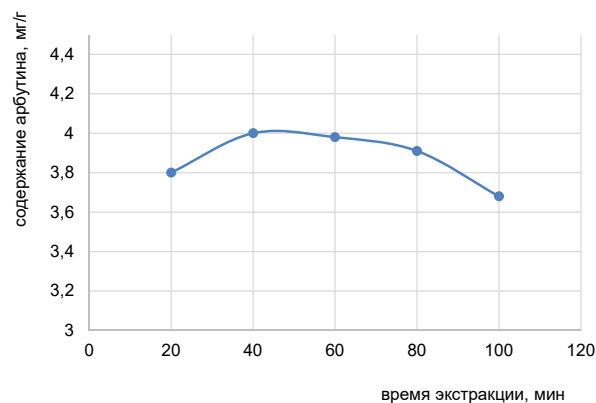


Рисунок 8 – График зависимости экстракции арбутина (%) от времени экстракции.

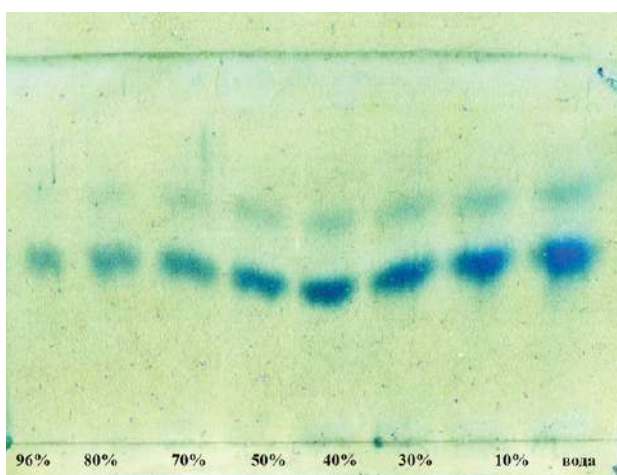


Рисунок 9 – Хроматографические зоны экстрактов из листьев брусники, полученные с использованием различных экстрагентов.

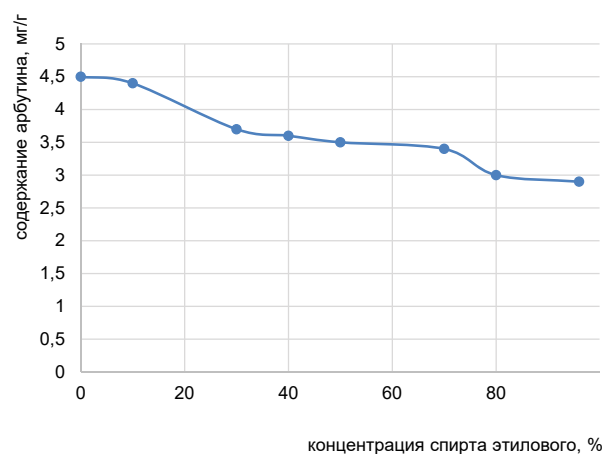


Рисунок 10 – График зависимости экстракции арбутина от экстрагента.

Литература

1. Федосеева, Л. М. Анализ арбутина и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia*

crassifolia(L.) Fitch.), произрастающего на Алтае / Л. М. Федосеева // Химия раст. сырья. – 2003. – № 1. – С. 73–77.

2. High-performance liquid chromatographic method of

- separation and quantitative analysis of arbutin in plant tissue cultures/ N. Kittipongpatana [et al.] // CMU. J. Nat. Sci. – 2007. – Vol. 6, N 1. – P. 65–74.
- Лубсандоржиева, П. Б. Хроматоспектрофотометрическое определение арбутина в листьях *Bergenia crassifolia*(L.) Fitch / П. Б. Лубсандоржиева, Б. С. Жигитов, Т. Д. Даргаева // Хим.-фармацевт. журн. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 14–16.
 - Способ количественного определения арбутина в лекарственном растительном сырье : а. с. 1582090 СССР, МКИ G 01 N 21/33 / Мазулин А. В., Калошина Н. А., Денисенко О. Н. – № 4433849/29 ; заявл. 31.05.88 ; опубл. 30.07.90, Бюл. № 28.
 - Брусники листья // Государственная фармакопея Республики Беларусь : (ГФ РБ II). Т. 2 : Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». – Молодечно : Победа, 2016. – С. 1200–1201.
 - Вернигорова, М. Н. Определение рутина в цветках бузины черной (*Sambucus nigra* L.) хроматодегитометрическим методом / М. Н. Вернигорова, Г. Н. Бузук // Вестник фармации. – 2014. – № 4. – С. 43–49.

Поступила 28.06.2019 г.

Принята в печать 27.09.2019 г.

References

- Fedoseeva LM. Analysis of Arbutin and Aboveground Vegetative Organs of *Badan Heavy Plate* (*Bergenia crassifolia*(L.) Fitch.) growing in Altai. *Khimiia Rast Syr'ia*. 2003;(1):73-7. (In Russ.)
- Kittipongpatana N, Chaiwan A, Pusod U, Kittipongpatana OS. High-performance liquid chromatographic method of separation and quantitative analysis of arbutin in plant tissue cultures. *CMU J Nat Sci*. 2007;6(1):65-74.
- Lubsandorzheeva PB, Zhigitov BS, Dargaeva TD. Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch. *Khimfarmatsevt Zhurn*. 2000;34(5):14-6. (In Russ.)
- Mazulin AV, Kaloshina NA, Denisenko ON. Method of quantitative determination of arbutin in medicinal herbal raw materials: as 1582090 SSSR, MКИ G 01 N 21/33. № 4433849/29; zaiavl 31.05.88; opubl 30.07.90, Biul № 28. (In Russ.)
- Cowberry leaves. M-vo zdravookhrameniia Resp Belarus', RUP «Tsentr ekspertiz i ispytaniia v zdravookhramenii». Gosudarstvennaia farmakopeia Respubliki Belarus': (GF RB II). T 2: Kontrol' kachestva substansii dlia farmatsevticheskogo ispol'zovaniia i lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ia. Molodechno, RB: Pobeda; 2016. P. 1200-1. (In Russ.)
- Vernigorova MN, Buzuk GN. Determination of routine in black elderberry flowers (*Sambucus nigra* L.) by chromatodensitometric method. *Vestnik Farmatsii*. 2014;(4):43-9. (In Russ.)

Submitted 28.06.2019

Accepted 27.09.2019

Сведения об авторах:

Вернигорова М.Н. – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Бузук Г.Н. – д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Vernigorova M.N. – senior lecturer of the Chair of Pharmacognosy with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Buzuk G.N. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor of the Chair of Pharmacognosy with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра фармакогнозии с курсом ФПК и ПК. E-mail: miv261@yandex.ru – Вернигорова Марина Николаевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Pharmacognosy with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining. E-mail: miv261@yandex.ru – Marina N. Vernigorova.