

Д.В. Моисеев

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРБУТИНА В ЛИСТЬЯХ БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Витебский государственный медицинский университет

*Представлена простая и экспрессная методика определения арбутина в листьях брусники обыкновенной (*Vaccinii vitis-idaeae L.*) методом ВЭЖХ. Для экстракции используется вода очищенная. Определение арбутина проводится на обращено-фазовой колонке (Zorbax SB C-18 250x4,6 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования; подвижная фаза 0,01 М КН₂РO₄ (рН=3,0) и ацетонитрил; температура колонки 30°С. Представленную методику можно использовать для идентификации и количественного определения арбутина в растительном сырье.*

Ключевые слова: ВЭЖХ, арбутин, брусника.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность использования лекарственных растений неизмеримо возросла в последние годы. Это обусловлено тем, что в связи с возросшей продолжительностью жизни людей увеличивается число лиц с сочетанной патологией, требующей одновременного приема ряда лекарственных средств. Преимуществом лекарственных растений является их малая токсичность и возможность длительного применения без существенных побочных явлений для лечения и профилактики различных заболеваний. По различным данным, в мире разрешены к применению в медицинской практике более чем 600 лекарственных средств растительного происхождения.

Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea L.*, сем. *Vacciniaceae*) давно и успешно применяется в медицине как мочегонное

средство при мочекаменной болезни, ревматизме, подагре [1-3]. Представляет собой небольшой вечнозеленый кустарник с горизонтальным корневищем и ветвистыми стеблями, высотой до 25 см. Листья кожистые, обратнойцевидные или овальные, длиной до 3 см, со слегка завернутыми краями. Основным действующим веществом брусники считается арбутин (до 9%), обладающий бактерицидным и мочегонным действием. В ягодах брусники также содержится арбутин, но в меньшей концентрации. Кроме арбутина, в листьях брусники содержатся метиларбутин; флавоноиды – кемпферол, кверцитрин, изокверцитрин, рутин, авикулярин, кемпферол-3'-рамнозид; фенолкарбоновые кислоты – хлорогеновая, кофейная, изохлорогеновая, ферруловая и эллаговая, а также микроэлементы [1-3].

Стандартизация листьев брусники согласно Государственной Фармакопее Респу-

блики Беларусь проводится по содержанию арбутина йодометрическим титрованием или по концентрации производных гидрохинона спектрофотометрическим методом после проведения экстракции из ЛРС водой очищенной. Экстракция и в том и в другом случае проводится на водяной бане в течение 30 минут.

Фармакопейная статья на лист брусники отсутствует в Европейской Фармакопее. Количественное определение арбутина в другом виде ЛРС – листьях толокнянки – согласно Европейской Фармакопее проводится методом ВЭЖХ, для извлечения используется двукратная экстракция водой очищенной. В качестве неподвижной фазы используется октадецилсиликагель, подвижной фазы – смесь воды и метанола [4].

Согласно данным, приведенным авторами, максимальная экстракция арбутина из листьев брусники достигается при использовании 50% этилового спирта [5].

Целью данного исследования является экспериментальное обоснование оптимальных условий экстракции арбутина из листьев брусники, а также разработка, валидация и апробация методики хроматографического определения арбутина в данном лекарственном растительном сырье.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Определение проводили на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-18 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: ацетонитрил («Мегск») и 0,01 М КН₂РO₄ (х.ч.) (градиентный режим), скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем инжектируемой пробы 10 мкл. Рабочая длина волны 280 нм выбрана на основании анализа спектра поглощения арбутина в области максимума его пика на хроматограмме с помощью фотодиодноматричного детектора и программы Agilent ChemStation for LC 3D. Разделение проводили при температуре колонки 30°C, давление в системе около 100 bar. В исследованиях использовали стандартный образец арбутина (Sigma-Aldrich, Lot 087K1179).

Таблица 1 – Режим подачи подвижной фазы

Время, мин	Содержание ацетонитрила, об. %
0-40	5-35%
40-40,1	35-5%
40,1-43	5%

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние концентрации спирта на экстракцию арбутина. В ходе эксперимента использовали воду высокоочищенную Р и этиловый спирт 96% и их смеси по объему, 50% - 5 частей спирта и 5 частей воды. Экстрагирование проводили в течение 40±10 мин на кипящей водяной бане в герметично закупоренном флаконе, при этом за 100%-ое высвобождение арбутина принимали максимальное числовое значение, полученное в ходе эксперимента. Как видно из приведенных ниже рисунков 1 и 2, экстрагирование 50% этанолом позволяет извлечь примерно в два раза меньше арбутина по сравнению с экстракцией водой.

Таким образом оказалось, что из исследованных экстрагентов, использованных для определения арбутина в листьях брусники, наилучшим является вода.

На следующем этапе исследований подбиралось оптимальное соотношение массы сырья и объема экстрагента. В Государственной Фармакопее Республики Беларусь [6] и Европейской Фармакопее [4] приведены методики, в которых рекомендуется проводить экстракцию арбутина из ЛРС при соотношениях сырья и экстрагента от 1 : 10 до 1 : 50.

Как показано в таблице 2, наибольшая экстракция арбутина из листьев брусники достигается при соотношении сырья и экстрагента 1 : 50.

Продолжительность экстракции оказывает значительное влияние на полноту извлечения веществ из растительного сырья. В фармакопейных статьях продолжительность экстракции составляет около 30 минут. В наших исследованиях максимальное извлечение арбутина также происходило после 40±10 минутного нагревания на водяной бане. Дальнейшее экстрагирование не приводило к увеличению выхода вещества. Проведение двукратной экстракции также не позволяет увеличить выход арбутина из растительного сырья.

Валидация методики хроматографического определения проводилась в соответствии с рекомендациями [4,6,7].

Специфичность – подтверждалась совпадением времен удерживания пиков арбутина на хроматограммах раствора стандарт-



Рисунок 1 - Хроматограммы: 1 – стандартного образца арбутина (концентрация 1 мг/мл); 2 – водного экстракта из листьев брусники; 3 – 50% этанольного экстракта из листьев брусники

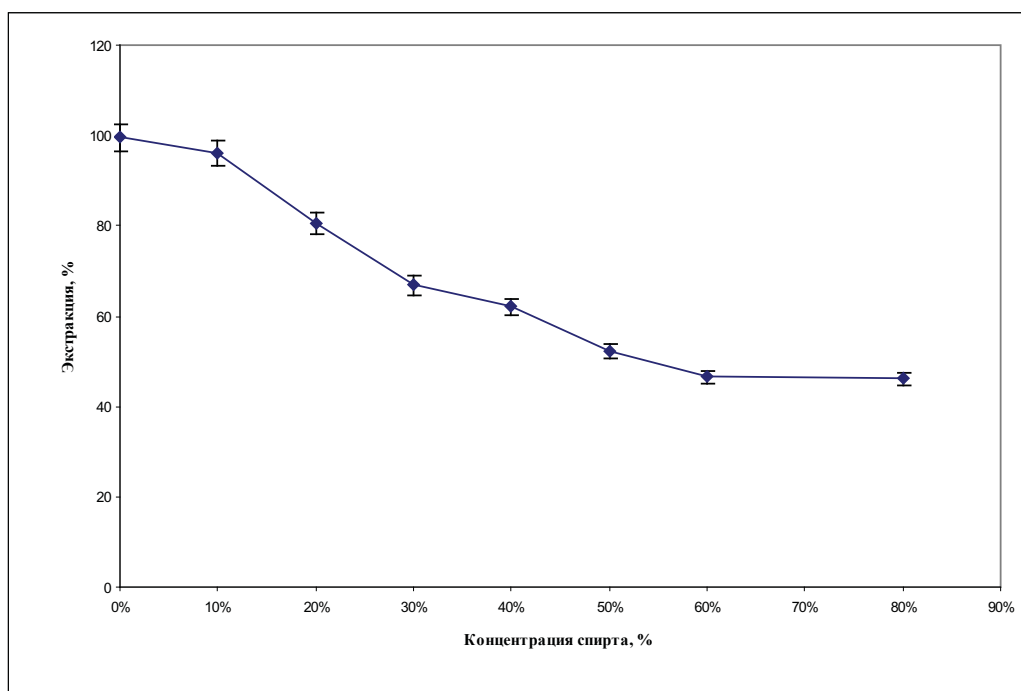


Рисунок 2 - Зависимость полноты экстракции арбутина из листьев брусники от концентрации этилового спирта

Таблица 2 – Влияние соотношения сырья и экстрагента на полноту экстракции арбутина (n=5, P=0,95)

Соотношение сырья и экстрагента	Масса навески ЛРС, г	Площадь пика арбутина на хроматограмме	Относительное содержание арбутина, %
1 : 10	0,4973±0,0024	14454±73	93,6±0,5
1 : 25	0,2509±0,0016	7290±29	93,5±0,4
1 : 50	0,0956±0,0011	2960±14	99,7±0,5
1 : 100	0,0514±0,0009	1566±12	98,1±0,8

ного образца арбутина и испытуемых образцов ЛРС и отсутствию пика на хроматограмме используемого растворителя (вода). Для оценки специфичности использовали такой параметр, как спектральная чистота пика арбутина в растительном сырье (более 99,7%), а также селективность ($\alpha > 1,6$) и коэффициент разрешения пиков ($R_s > 5,0$) арбутина и других пиков на хроматограмме. Эффективность разделения по пику арбутина составляла более 12 тысяч теоретических тарелок,

коэффициент асимметрии около 0,9.

Линейность методики определяли путем пятикратного построения градуировочного графика в диапазоне концентраций растворов арбутина 12,5-2000 мкг/мл. (рис. 3)

Воспроизводимость (сходимость результатов анализа) проверяли путем многократного повторения методики определения на одном сырье ($n=7$, $P=0,95$). Содержание арбутина составило $5,3 \pm 0,1\%$. Робастность проверяли путем изменения температуры

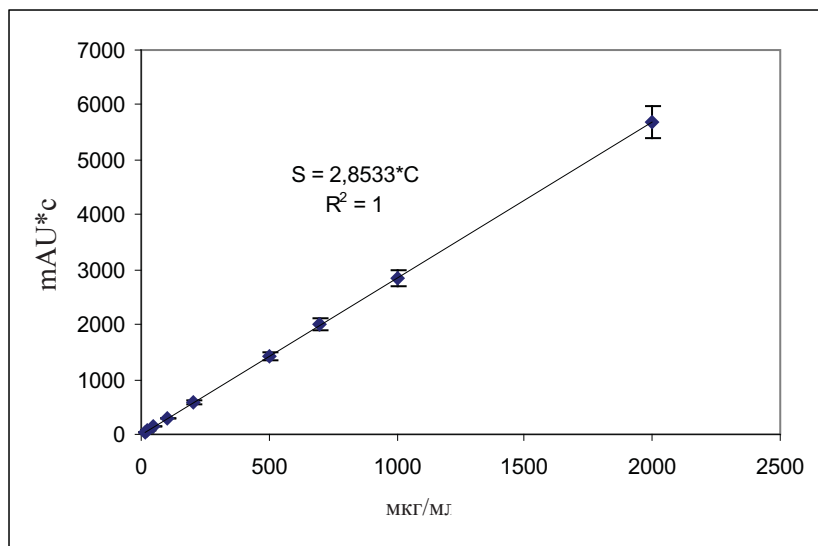


Рисунок 3 - Градуировочный график зависимости аналитического сигнала (площадь пика) от количества введенного вещества

колонки ($30 \pm 5^\circ\text{C}$), значения pH буферного раствора ($3,0 \pm 0,5$). Значения площадей пиков арбутина статистически различались незначительно ($100 \pm 0,4\%$ отн.).

Стабильность растворов арбутина (РСО) и водных экстрактов проверяли при хранении в течение 24 часов при температуре $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Статистически значимых различий зафиксировано не было.

Точность методики проверяли методом стандартных добавок. Данные приведены в таблице 3.

Таким образом, после проведения валидационных процедур мы предлагаем методику количественного определения арбутина

на в листьях брусники.

Точную навеску (около 1,000 г) измельченных листьев брусники (710) помещают в герметично закрывающийся стеклянный флакон, добавляют 50,00 мл воды очищенной, укупоривают и взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,01 г. Далее помещают на кипящую водяную баню и экстрагируют в течение 40 ± 10 минут, периодически встряхивая. Затем охлаждают и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы водой очищенной, перемешивают. Затем отбирают около 1 мл в пластиковый контейнер и центрифугируют при 5000g в течение 5 минут. Отбирают 0,5

Таблица 3 – Точность методики определения арбутина ($n=3$, $P=0,95$)

Содержание арбутина в экстракте растительного сырья (мкг/мл)	Добавлено (мкг/мл)	Обнаружено (мкг/мл)	Воспроизводимость, %	Относительное стандартное отклонение, %
53,0	30,0	81,2	97,8	2,0
53,0	50,0	102,6	99,6	1,3
53,0	120,0	174,0	100,6	2,0

мл надосадочной жидкости и 10 мкл инжес-
тируют в хроматограф.

Приготовление раствора рабочего стан-
дартного образца (PCO). 50,00 мг стандарт-
ного образца арбутина растворяют в 100,00
мл воды.

Расчет количественного содержания ар-
бутина в % проводят по формуле 1:

$$X = \frac{S_1 \times g_2 \times 100}{S_2 \times g_1} \quad (1)$$

где S_1 – площадь пика арбутина на хро-
матограмме испытуемого образца;

S_2 – площадь пика арбутина на хромо-
грамме PCO;

g_1 – навеска сырья, г;

g_2 – масса арбутина в растворе PCO, г.

Апробация методики. Методика апро-
бирована на пяти различных сериях листьев

брусники. В качестве метода сравнения ис-
пользовался фармакопейный метод анализа
(титриметрия). Результаты приведены в та-
блице 4.

Следует отметить, что при проведении
экстракции арбутина согласно ГФ РБ после
осаждения сопутствующих веществ рас-
твором свинца (II) ацетатом основным Р
теряется около 5% арбутина по сравнению
с исходным содержанием. Так, на рисун-
ке 4 площадь пика арбутина до осаждения
равна 668,4 единицы, а после осаждения
раствором свинца (II) ацетатом основным
Р равна 632,0 единицы. При этом пиков по-
сторонних веществ на хроматограмме ста-
новится действительно меньше.

Различие между результатами титрима-
трического (фармакопейного) и хроматогра-
фического определения объясняется более

Таблица 4 – Результаты количественного определения арбутина в листьях брусники
(n=3, P=0,95)

Производитель	Содержание арбутина, %	
	Фармакопейный метод	ВЭЖХ
Листья брусники 50 г, ООО «ПАДИС'С», Республика Беларусь, серия 70680910	5,9±0,4	5,4±0,2
Листья брусники 50 г, НПК «БИОТЕСТ», Республика Беларусь, серия 580410	6,3±0,3	5,6±0,2
Листья брусники 50 г, НПК «БИОТЕСТ», Республика Беларусь, серия 730610	6,4±0,3	5,7±0,2
Листья брусники, заготовлены в Псковской области, Российская Федерация, сентябрь 2009 года	5,8±0,4	5,3±0,1
Листья брусники, заготовлены в Витебской области, Республика Беларусь, сентябрь 2009 года	6,7±0,3	6,3±0,1

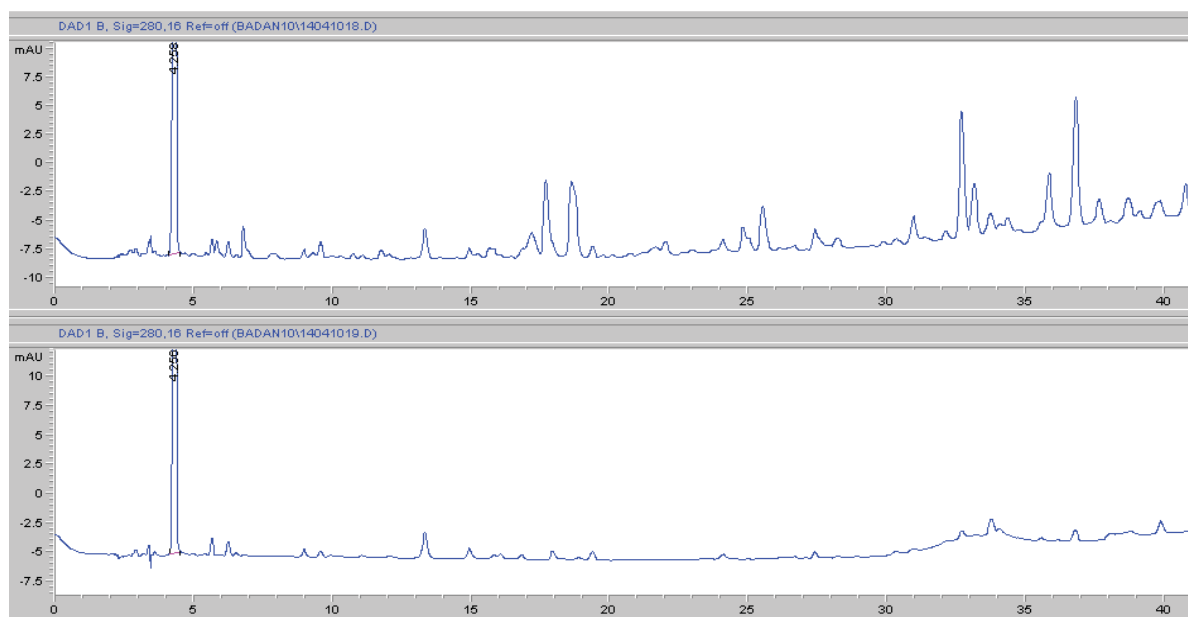


Рисунок 4 - Хроматограмма водного извлечения из листьев брусники по ГФ РБ: вверху – до осаждения раствором свинца (II) ацетатом основным Р, внизу – после осаждения

высокой специфичностью метода ВЭЖХ по сравнению с йодометрическим титрованием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований экспериментально обоснованы оптимальные условия экстракции арбутина из листьев брусники: экстрагент – вода; время экстракции - 40±10 минут на водяной бане; соотношение сырья и экстрагента - 1 : 50.

Разработанная методика валидирована по рекомендуемым показателям, апробирована на пяти сериях лекарственного растительного сырья и может быть рекомендована для включения в фармакопейную статью на листья брусники.

SUMMARY

D.V. Moiseev

DETERMINATION OF ARBUTINE IN COWBERRY LEAVES BY HPLC

Simple and fast procedure for assay of arbutine in cowberry leaves (*Vaccinii vitis-idaeae* L.) by HPLC is described. For extraction pure water is used. Determination of arbutine is provided in reverse-phase column (Zorbax SB C-18 250×4,6 mm, 5 mkm) - gradient elution; a mobile phase 0,01M potassium dihydrophosphate (pH=3,0) and acetonitrile; column temperature 30°C is used. Presented methods are offered to be used for identification and assay of arbutine in plants.

Keywords: HPLC, arbutine, cowberry.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов, С.Я. Фитотерапия и фитотерапевтика: Руководство для врачей // М.: Медицинское информационное агентство - 2000. – 976 с.

2. Телятьев, В.В. Полезные растения

Центральной Сибири / В.В. Телятьев. – Сибирское книжное издательство, Иркутск. – 1987. – С. 197-200.

3. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / под ред. В.Г. Кукеса. – М.: Медицина, 1999. – 192 с.

4. European Pharmacopoeia 2007 [электронный ресурс]. – Электрон. текст. данные и программа. Index+. System simulation Ltd. – 2006. – 1 электрон. оптич. диск (CD – ROM).

5. Иванкова, М.Н. Денситометрическое определение оптимальных условий экстракции арбутина из листьев брусники / М.Н. Иванкова, Г.Н. Бузук // Материалы 62-ой итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации», 22 – 23 апреля 2010 года. – Витебск, ВГМУ. – 2010.

6. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. Т.2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении // Под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: «Победа». – 2008. – С. 346–348.

7. Эпштейн, Н.А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н.А. Эпштейн // Хим.-фарм. ж. – 2004. – т. 38, № 4. – С. 40-56.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе. 27,
Витебский государственный
медицинский университет,
кафедра фармацевтической
химии с курсом ФПК и ПК,
тел. раб: 8(0212) 37-00-06.

Моисеев Д.В.

Поступила 10.03.2011 г.