

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРБУТИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Н.В. Нестерова, И.А. Самылина

Первый Московский государственный медицинский университет

им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет);

Российская Федерация, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2–4

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Нестерова Надежда Викторовна – аспирант кафедры фармацевтического естествознания Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России. Тел. +7 (916) 273-31-11. E-mail: nestero-nadezhda@yandex.ru

Самылина Ирина Александровна – доктор фармацевтических наук, член-корр. РАН, профессор кафедры фармацевтического естествознания Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России

Рассмотрены тенденции и современное состояние проблемы совершенствования методов идентификации и количественного определения арбутина в лекарственном растительном сырье. Показана целесообразность комплексного подхода, предусматривающего применение совокупности методов анализа на этапах выделения индивидуального арбутина и подтверждения его структуры, а также при разработке методик идентификации и количественного определения арбутина для включения их в нормативную документацию. Отмечена эффективность использования для этих целей метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Ключевые слова: арбутин, лекарственное растительное сырье, хроматографический анализ, ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрия.

Для цитирования: Нестерова Н.В., Самылина И.А. определение арбутина в лекарственном растительном сырье. Фармация; 67 (2): 21–25. DOI: 10/29296/25419218-2018-03-04

Официальным растительным сырьем, содержащим арбутин, являются листья брусники и листья толокнянки, включенные в Государственную фармакопею РФ XIII издания (ГФ РФ XIII). Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idea* L.) и толокнянка обыкновенная (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) представляют собой многолетние кустарнички, для сохранения популяции которых, согласно требованиям «Инструкции по сбору и сушке» [1], повторная заготовка на том же участке допустима через 5–10 лет. Следует отметить, что постановлением Правительства Российской Федерации №168 от 26.02.1996 «Об утверждении Положения о лицензировании отдельных видов деятельности в области охраны окружающей среды» сбор и реализация сырья дикорастущих лекарственных растений переданы под лицензирование местным органам, т.е. регулирование заготовительного процесса лекарственного растительного сырья (ЛРС) для общефедеральных целей осуществляется под контролем местных

территориальных органов управления. Это часто приводит к хищнической эксплуатации промышленных зарослей, в результате чего истощаются ресурсы и возникают перебои в поставке данных видов сырья. Высокая потребность в сырье, содержащем арбутин, обуславливает актуальность поиска альтернативных видов ЛРС, введение которых в официальную практику невозможно без разработки высокочувствительных методов идентификации и количественного определения действующего вещества, а впоследствии – разработки современной нормативной документации.

Арбутин, представляющий собой β-D – глюкопиранозид гидрохинона (рис. 1), впервые был выделен Кавалье из листьев толокнянки в 1853 г. Позже он был обнаружен в растениях родов *Calluna*, *Ledum*, *Epigaea*, *Gaultheria*.

В комментариях к IV изданию Российской фармакопеи [2] содержится частная статья «Arbutinum», включающая описание методи-

ки извлечения арбутина из ЛРС, свойства, испытания на подлинность и чистоту вещества, условия хранения и применения. Впервые синтез арбутина в виде ацетата (*n*-гидроксифенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозид) был осуществлен А. Михаэлем в 1879 г. с использованием ацилированных гликозил-галогенидов (рис. 2).

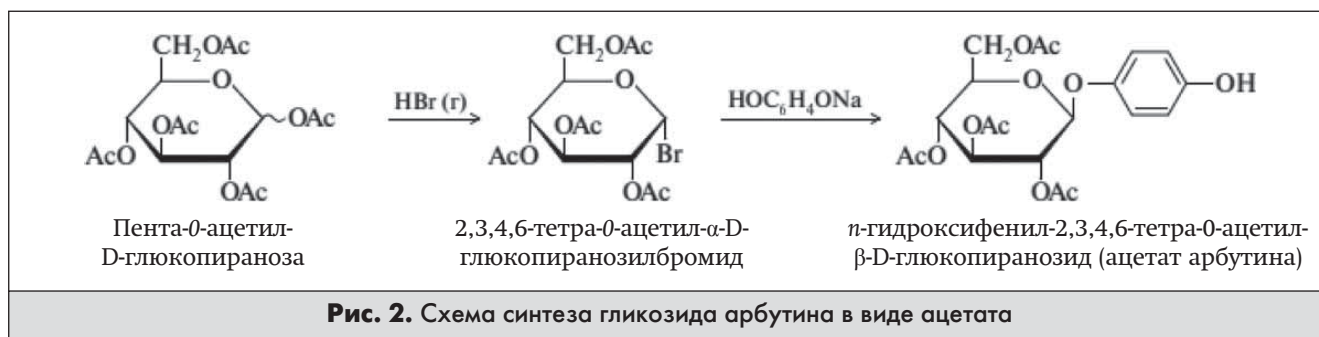
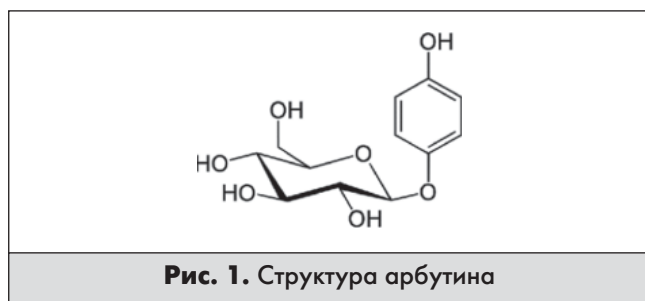
В чистом виде арбутин в медицинской практике применяется ограниченно, в основном используются отвары из ЛРС, содержащего арбутин. Частная статья ГФ СССР IX на листья толокнянки предусматривала, помимо описания внешних признаков и микроскопии, проведение качественных реакций с сульфатом закисного железа и фосфорно-молибденовокислым натрием и йодиметрическое количественное определение. В ГФ СССР X (впоследствии и в ГФ СССР XI) в качестве официального сырья, содержащего арбутин, помимо листьев толокнянки, были включены листья брусники, которые ранее рассматривались наряду с листьями голубики и черники как возможная примесь. Для оценки содержания арбутина в листьях толокнянки и брусники использовалась методика ГФ СССР XI изд. [3].

ГФ РФ XIII для идентификации основных групп биологически активных веществ в ЛРС рекомендует применять различные виды хроматографии [4]. В научную литературу для обнаружения арбутина в ЛРС включены описания методик хроматографического анализа в тонком слое сор-

бента или на бумаге. При проведении тонкослойной хроматографии (ТСХ) используются различные системы растворителей: *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:5), *n*-бутанол–уксусная кислота–вода–ксилол (6:2:3:4), хлороформ – 96% этиловый спирт (6:4), БУВ (4:1:5), уксусная кислота 60%, этилацетат–муравьиная кислота–вода (3:1:1) и др. [5–7]. При хроматографировании на бумаге чаще применяют растворы уксусной кислоты разной концентрации. Детектирование проводилось либо по фиолетовой флюоресценции пятен в УФ-свете, либо по красной окраске пятен арбутина после обработки хроматограмм реактивом Паули. С помощью этих методик арбутин был идентифицирован в зеленых, красных, бурых листьях и корневищах бадана толстолистного, в извлечениях из листьев яблони лесной (*Malus sylvestris* Mill) и яблони домашней (*Malus domestica* Barkh.) сорта «Антоновка» [7, 8].

Выделение индивидуального арбутина осуществляют, как правило, методом адсорбционной хроматографии. Подлинность выделенного соединения подтверждается определением температуры плавления, УФ- и ИК-спектрами. В связи с присутствием в молекуле арбутина ароматических C=C-связей максимум поглощения в УФ-спектре находится при длине волны 282 нм (рис. 3). Эта спектральная характеристика может быть использована как для качественной оценки, так и для количественного определения арбутина в ЛРС [9].

В ИК-спектре арбутина имеются характерные полосы при 3200–3400 см, наличие которых обусловлено присутствием спиртовых и фенольных гидроксильных групп; полосы 1515, 1460, 1440 см типичны для ароматических C=C-связей. Для идентификации арбутина многими авторами использовались химические превращения (гидролиз, ацелирование, метилирование и др.) с последующим сравнением констант продуктов превращения с данными литературы. Так, арбутин состава $C_{12}H_{16}O_7$, выделенный из листьев гру-



ши, имеющий температуру плавления 152–153°C, ацетилювали с образованием пентаацетильного производного состава $C_{22}H_{26}O_{12}$ с температурой плавления 146°C [5].

Количественная оценка содержания арбутина в ЛРС, согласно требованиям ГФ XI, осуществляется йодометрическим титрованием гидрохинона, получаемого после экстракции арбутина из ЛРС и последующего его гидролиза. Однако есть данные [7, 10, 11], что указанная методика мало специфична, поскольку после осаждения полифенольных соединений основным ацетатом свинца в извлечении остается достаточное количество веществ, способных легко окисляться йодом (гидрохинон, катехины, аскорбиновая кислота и др.). При титровании гидрохинона (продукта гидролиза арбутина) раствором йода точка эквивалентности устанавливается визуально по изменению окраски индикатора, что также может приводить к ошибке. Кроме того, следует отметить длительность процесса количественного определения арбутина с использованием фармакопейного метода [12, 13]. В литературе описан фотоэлектроколориметрический метод, в основе которого лежит реакция образования азокрасителя после взаимодействия арбутина с диазотированным сульфаниламидом (сульфацил-натрий). При определении содержания арбутина в листьях и корневищах бадана [7] применялся калибровочный график. Нижним пределом обнаружения арбутина установлена концентрация 6,3 мкг/мл. Однако, как отмечает автор, используемая при пробоподготовке извлечения очистка от сопутствующих веществ по-

лифенольной природы (осаждение их раствором свинца ацетата основного) вызывает потери арбутина, что существенно сказывается на результатах количественного определения фотоколориметрическим методом [7, 14].

Применяются также различные вариации спектрофотометрического определения арбутина, среди которых наиболее популярными оказались: методики, основанные на измерении оптической плотности в видимой области спектра после получения антипиринового красителя [7], и методики, осуществляемые при аналитической длине волны 281 нм после фильтрования исследуемого извлечения через слой алюминия оксида с учетом полученного значения удельного показателя поглощения арбутина, составившего $77,3 \pm 3,1$ [6].

В Американской [15] и Европейской [16] растительных фармакопеях количественную оценку содержания арбутина в сырье осуществляют методом ВЭЖХ. Согласно требованиям Европейской фармакопеи, исследуемое сырье подвергают двукратной экстракции водой очищенной, в качестве неподвижной фазы применяют октадецилсиликагель, элюирование проводят в изократическом режиме, подвижная фаза – вода – метанол (90:10). По американской методике в качестве неподвижной фазы также используется октадецилсиликагель, но применяется градиентный режим элюирования смесями метанола и воды. Детектирование проводят при длине волны 280 нм.

Для определения арбутина методом ВЭЖХ широко используют обращенную фазу C18 в ка-



Рис. 3. УФ-спектры арбутина-стандарта (а) и извлечения из листьев яблони лесной (б)

честве сорбента и элюент, имеющий кислый pH среды. Элюенты с pH менее 2,0 не рекомендуются применять, так как снижается стабильность неподвижной фазы за счет возможного гидролиза силанольных групп сорбента [17]. С целью совершенствования метода количественного определения арбутина в листьях толокнянки была разработана методика обращенно-фазовой ВЭЖХ [3]: детектирование при длине волны 280 нм; подвижная фаза – 0,01 М KH_2PO_4 , подкисленный H_3PO_4 до pH=3 и ацетонитрил (9:1) с расходом подвижной фазы 0,6 мл/мин. Для анализа сырья и спиртовых извлечений из свежих и высушенных побегов рододендрона [18] применяли подвижную фазу метанол–вода–кислота фосфорная концентрированная в соотношении 400:600:5 в условиях изократического элюирования со скоростью подачи элюента 0,8 мл/мин. При изучении различных видов бадана, собранных в разных климатических зонах и в разные фазы вегетации, арбутин определяли также методом ВЭЖХ [19, 20]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на этапах выделения индивидуального вещества и подтверждения его структуры, а также при разработке методик идентификации и количественного определения арбутина в лекарственном растительном сырье для включения их в разрабатываемую нормативную документацию целесообразно использовать совокупность подходов, сочетающих применение химических и физико-химических методов анализа. Необходимо отметить эффективность метода ВЭЖХ при анализе лекарственного сырья, содержащего арбутин.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Правила сбора и сушки лекарственных растений. Сборник инструкций. М.: Медицина, 1984 г.
2. Комментарии к IV изданию Российской фармакопеи. М., типография Т.И. Гаген, Большая Лубянка, дом Кн. Голицына, 1893; 414–6.
3. Государственная фармакопея СССР, XI изд., вып 2. М.: Медицина, 1990; 400.
4. Государственная фармакопея РФ XIII изд. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/feml>
5. Мазулин А.В. Изучение перспективных видов растений юго-востока Украины для создания лекарственных средств. Автореф. дисс. докт. фарм.наук. М., 1994; 50.
6. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Платонов И.А., Павлова Л.В. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной. Химия растительного сырья, 2015;1: 95–100.
7. Федосеева Л.М. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* L.), произрастающего на Алтае. Химия растительного сырья, 2003; 1: 73–7.
8. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Изучение качественного состава и показателей качества листьев яблони лесной и домашней. Здоровье и образование в XXI веке, 2015; 17 (4): 251–8.
9. Нестерова Н.В. Изучение зависимости количественного содержания биологически активных веществ листьев яблони лесной и домашней от способов консервации. Здоровье и образование в XXI веке, 2017; 19 (8):
10. Мазепина Л.С. Сравнительное фармакогностическое изучение грушанки круглолистной, зимолубки зонтичной, толокнянки обыкновенной. Автореф. дисс. канд.фарм.наук. М., 2011; 24.
11. Онегин С.В. Фармакогностическое изучение вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* L.) Дисс. канд. фарм.наук. Ярославль, 2008; 116.
12. Таланов А.А. Фармакогностическое изучение голубики болотной (*Vaccinium uliginosum* L.) Дисс.канд.фарм. наук. Ярославль, 2013; 176.
13. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) Leaves by High-Performance Liquid Chromatography. Phytochem. Anal. 2001; 12: 336–9.
14. Горбунцова Н.М., Федосеева Л.М., Горбикова О.А. Количественное определение арбутина в листьях бадана. Актуальные проблемы фармации. Сборник научных трудов. Барнаул, 1995; 196–9.
15. Uva Ursi Leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L.). Standards of analysis, quality control, and therapeutic. American Herbal Pharmacopoeia, 2008.
16. European Pharmacopoeia, 8 edition. Strasbourg (FR): Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe (EDQM), 2012; 1162-1163.
17. Абдулина С.Г. и др. Фармацевтический анализ. (под ред.: Г.К. Будникова, С.Ю. Гармонова). М., 2013; 316-9.
18. Потрясай К.А., Копнин А.А., Даргаева Т.Д., Маркрян А.А., Сокольская Т.А. Количественное определение арбутина в сырье рододендрона золотистого (*Rhododendron aureum* Georgi.) методом высокоэффективной жидкой хроматографии. Сибирский медицинский журнал, 2009; 8:134-8.
19. Boros B., Jakabova S., Madarasz T. et al. Validated HPLC Method for Simultaneous Quantitation of Bergenin, Arbutin and Gallic Acid in Leaves of Different *Bergenia Species*. Chromatographia, 2014; DOI 10.1007
20. Jiang H., Guo F., Zhang L. et al. Comparison of arbutin contents from *Bergenia purpurascens* in Yunnan. China J.Materia Medica, 2010; 35(14): 1812-1814.

Поступила 15 ноября 2017 г.

DETERMINATION OF ARBUTIN IN MEDICINAL PLANT RAW MATERIALS

N.V. Nesterova, Professor I.A. Samylina, PhD

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); 4-2, Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nesterova Nadezhda Viktorovna – post-graduate student of the of Pharmaceutical Natural Sciences Department at Sechenov University; +7 (916) 273-31-11. E-mail: nesterov-nadezhda@yandex.ru

Samylina Irina Alexandrovna – doctor of pharmaceutical sciences, corresponding member of the RAS, professor of the of Pharmaceutical Natural Sciences Department at Sechenov University; +7 (916) 585-42-17. E-mail: laznata@mail.ru

SUMMARY

The paper considers tendencies to improve methods for arbutin identification and quantitative determination in medicinal plant raw materials and the current state of this problem. It shows the advisability of applying a comprehensive approach that provides the use of a set of analysis methods when individual arbutin is isolated and its structure is confirmed, as well as when arbutin identification and quantitative determination methods are devised for their inclusion in normative documents. High performance liquid chromatography is noted to be effective for this purpose.

Key words: arbutin, medicinal plant raw materials, chromatographic analysis, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, spectrophotometry.

For citation: Nesterova N.V., Samylina I.A. Determination of arbutin in medicinal plant raw materials. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 67 (3): 21–25. DOI: 10/29296/25419218-2018-03-04

REFERENCES

1. Rules for the collection and drying of medicinal plants. Collection of instructions. Moscow: Meditsina, 1984; (in Russian)
2. Comments on the IV edition of the Russian Pharmacopoeia. Moscow, T.I. Hagen, Bolshaya Lubyanka, the house of Knut Golitsyn, 1893; 414–6 (in Russian).
3. The State Pharmacopoeia of The USSR, XI-ed., vol.2. Moscow: Meditsina, 1990; 400 (in Russian).
4. The State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIII-ed. [Electronic resource]. Access mode: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
5. Mazulin A.V. The study of perspective plant species in the South-East of Ukraine for the creation of medicines. *Doctors of Pharm. Sciences*. Moscow, 1994; 50 (in Russian).
6. Kurkin V.A., Ryazanova T.K., Platonov I.A., Pavlova L.V. Quantitative determination of arbutin in the leaves of *Arctostaphylos Uva-ursi* (L) Spreng. *Himiya rastitel'nogo syr'ya*, 2015; 1: 95–100 (in Russian).
7. Fedoseeva L.M. Analysis of underground and overground vegetative organs of thick-leaved banyan (*Bergenia crassifolia* L.), which grows on the Altai. *Himiya rastitel'nogo syr'ya*, 2003; 1: 73–7 (in Russian).
8. Nesterova N.V., Samylina I.A. Study of the quality composition and quality indicators of apple and forest apple trees. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*, 2015; 17 (4): 251–8 (in Russian).
9. Nesterova N.V. Study of the dependence of the quantitative content of biologically active substances of apple and forest apple leaves on conservation methods. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*, 2017; 19 (8): (in Russian).
10. Mazepina L.S. Comparative pharmacognostic study of wintergreen, umbelliferous, bearberry. Author's abstract. Ph.D. Moscow, 2011; 24 (in Russian).
11. Onegin S.V. Pharmacognostic study of heather of common (*Calluna vulgaris* L.) Diss. Cand. Pharm. Science. Yaroslavl, 2008; 116 (in Russian).
12. Talanov A.A. Pharmacognostic study of blueberry marsh (*Vaccinium uliginosum* L.) Diss. Cand. of Pharm. Sciences. Yaroslavl, 2013; 176 (in Russian).
13. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) Leaves by High- Performance Liquid Chromatography. *Phytochem.Anal.* 2001; 12: 336–9.
14. Gorbuntsova N.M., Fedoseeva L.M., Gorbikova O.A. Quantitative determination of arbutin in the leaves of badan. Actual problems of pharmacy. Collection of scientific papers. Barnaul, 1995; 196–9 (in Russian).
15. Uva-Ursi Leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L.). Standards of analysis, quality control, and therapeutic. American Herbal Pharmacopoeia, 2008.
16. European Pharmacopoeia, 8 edition. Strasbourg (FR): Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe (EDQM), 2012; 1162–3.
17. Abdulina S.G. Pharmaceutical analysis (by ed. G.K. Budnikov, S.Yu. Garmonov). Moscow, 2013; 316–9 (in Russian).
18. Potrjasaj K.A., Kopnin A.A., Dargaeva T.D., Markaryan A.A., Sokolskaya T.A. Quantitative determination of arbutin in raw material of *Rhododendron aureum* Georgi by the method of high-performance liquid chromatography. *Sibirskiy medicinskiy zhurnal*, 2009; 8: 134–8 (in Russian).
19. Boros B., Jakabova S., Madarasz T. et al. Validated HPLC Method for Simultaneous Quantitation of Bergenin, Arbutin and Gallic Acid in Leaves of Different *Bergenia Species*. *Chromatographia*, 2014. DOI 10.1007
20. Jiang H., Guo F., Zhang L. et al. Comparison of arbutin contents from *Bergenia purpurascens* in Yunnan. *China J. Materia Medica*, 2010; 35 (14): 1812–4.