

УДК 615.451.322:582.734]:547.466]07

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРБУТИНА В ЛИСТЬЯХ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Н.В. Нестерова*, И.А. Самылина, А.Н. Кузьменко, И.А. Кузьменко,
И.И. Краснюк (мл.), А.А. Евграфов

(ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России;

*e-mail: nestero-nadezhda@yandex.ru)

В результате исследований были предложены хроматографические условия разделения арбутина и условия пробоподготовки сырья «Листья яблони лесной» для анализа методом ВЭЖХ. Согласно проведенным исследованиям, содержание арбутина должно составлять не менее 0,7%.

Ключевые слова: листья яблони лесной, арбутин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Яблоня лесная (*Malus sylvestris* Mill.) – представитель рода *Malus* семейства розоцветные (Rosaceae), широко распространенный в диком виде в Европе. Листья яблони лесной издавна применяются в народной медицине в качестве потогонного и мочегонного средства [1], входят в состав популярных в фитотерапии сборов [2]. Сведения о данном сырье встречаются в прописях древнеримского врача-энциклопедиста Авла Корнелия Цельса [3]. В тибетской медицине настой из листьев яблони ягодной используется для лечения мочекаменной болезни [4]. Сырье *Malus sylvestris* включено в перечень номенклатуры однокомпонентных гомеопатических лекарственных средств [5].

Анализ современной научной литературы показывает растущий интерес исследователей к изучению биологически активных соединений листьев яблони лесной и фармакологического действия извлечений из данного сырья [6, 7]. Так, было экспериментально доказано [8], что благодаря присутствию флоридина [9] извлечения из листьев яблони обладают высокой гипогликемической активностью. Анализ влияния полифенольного комплекса листьев яблони на течение экспериментального гепатита позволил выявить мембраностабилизирующее действие этого вещества [10, 11]. Однако до сих пор листья яблони лесной не считаются официальным лекарственным растительным сырьем.

Цель нашего исследования – изучение фенольных соединений в извлечениях из свежего и высушенного сырья листьев яблони лесной, а также разработка методики количественного

определения арбутина в сырье методом ВЭЖХ для стандартизации гомеопатической матричной настойки.

Материалы и методы

Для идентификации и количественного определения арбутина в сухом и свежем сырье использованы листья дикорастущих растений *Malus sylvestris*, собранные в Истринском и Чеховском районах Московской обл. в 2016 г. В целях выбора условий хроматографического анализа применяли стандартный образец арбутина и извлечение из листьев яблони лесной, полученное методом настаивания с 70%-м этиловым спиртом в течение 1 ч на кипящей водяной бане при соотношении сырья и экстрагента, равном 1:10. УФ-спектры арбутина стандарта и извлечения из листьев яблони лесной представлены на рис. 1, 2.

Анализ литературных данных показывает целесообразность использования С18 в качестве сорбента обращенной фазы и смеси метанола, воды и фосфорной концентрированной кислоты в качестве подвижной фазы. Детектирование осуществляли при 280 нм. Известно, что оптимальная эффективность разделения и форма пиков при использовании обращенных фаз типичны для исследуемых веществ в молекулярной форме, а арбутин, содержащий в своем составе фенольную группу, обладает слабокислотными свойствами, что с учетом подавления ионизации определяет выбор неорганического элюента, обладающего показателем рН в кислой области. В случае подкисления происходит возрастание удерживаемых объемов соединений кислотной природы и снижение объ-

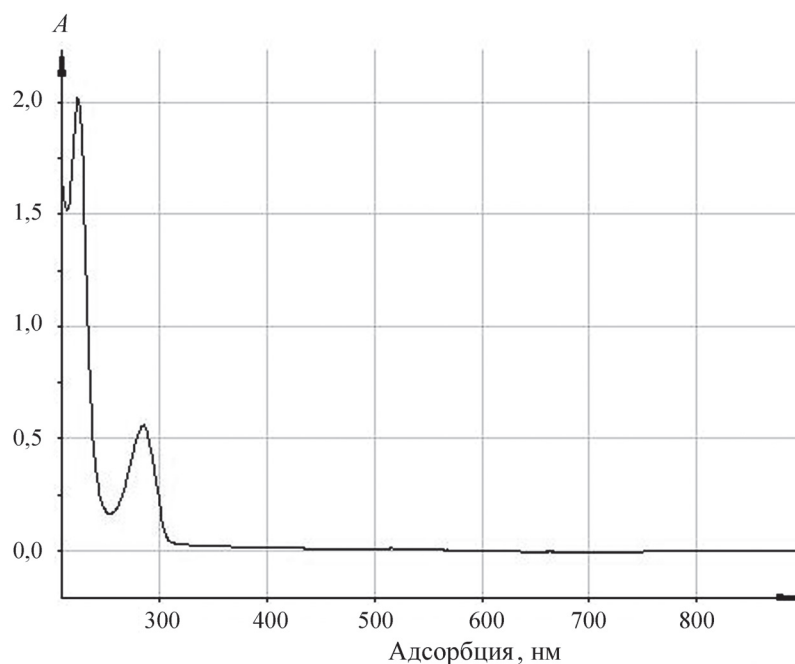


Рис. 1. УФ-спектр арбутина-стандарта

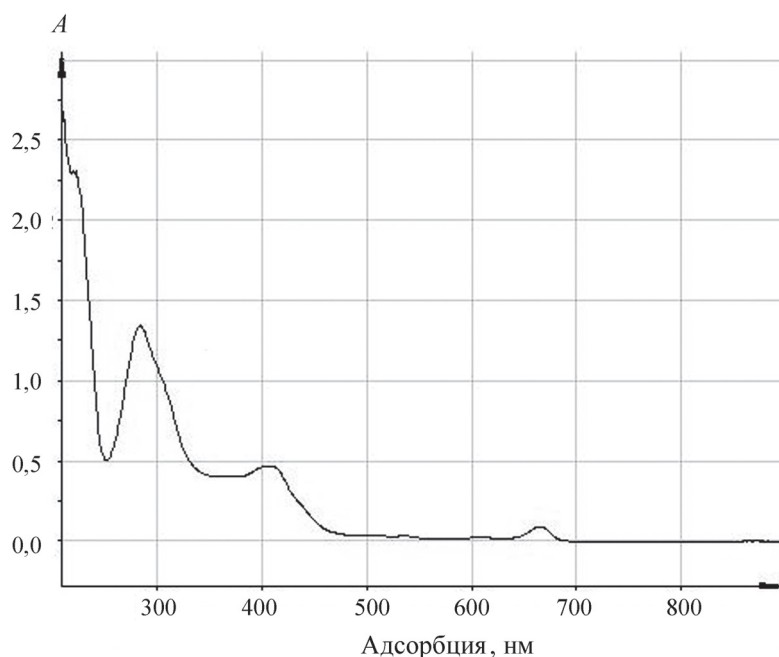


Рис. 2. УФ-спектр спиртового извлечения

емов соединений основного характера. При этом следует помнить, что использование элюентов с $\text{pH} < 2$ крайне нежелательно для сохранения стабильности неподвижной фазы, поскольку при такой кислотности элюента возможен гидролиз силанольных групп сорбента. Чтобы установить значение pH системы в кислой области, мы выбрали концентрированную фосфорную кислоту [12–15]. В целях определения необходимой длины волны были исследованы УФ-спектры спиртового извле-

чения из листьев яблони лесной и арбутина (СО) (табл. 1)

В работе использовали колонку металлическую Kromasil C18 (4,6×250 мм), размер частиц 5 мк. Система — смесь метанола, воды и концентрированной фосфорной кислоты в соотношении 400:600:5 в условиях изократического элюирования. Анализ осуществляли при комнатной температуре при скорости подачи элюента 0,8 мл/мин. Продолжительность анализа 70 мин. Детектирование

Т а б л и ц а 1

Подбор оптимальной длины волны для анализа

Образец	$\lambda_{\text{макс}}$ для СО (нм)	$\lambda_{\text{макс}}$ для опытного образца (нм)	
		свежее сырье	высушенное сырье
Арбутин	221; 285	285,5	286

проводили с помощью УФ-детектора «GILSTON» (UV/VIS, модель 151) при длине волны 280 нм.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований нами предложена методика количественного определения арбутина в листьях яблони лесной. Аналитическую пробу листьев яблони лесной измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Свежее сырье измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм.

Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья листьев яблони лесной помещали в колбу объемом 250 мл, добавляли 70 мл 70%-го этилового спирта, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали в течение 1 ч (с момента закипания) на кипящей водяной бане. По истечении времени экстракции смесь филь-

тровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,25–0,45 мкм в мерную колбу объемом 100 мл (первые 7 мл фильтрата отбрасывали), затем доводили объем 70%-м этиловым спиртом до метки. Параллельно осуществляли приготовление 0,05%-х растворов рабочих стандартных образцов фенольных соединений в 70%-м этиловом спирте по известной методике [16]. По 20 мкл исследуемых растворов и раствора сравнения вводили в хроматограф с использованием микрошприца Hamilton емкостью 25 мкл и осуществляли хроматографирование. Использование метода внутренней нормализации позволило выявить в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной 13 соединений, в составе которых обнаружен арбутин ((2R,3S,4S,5R,6S)-2-гидроксиметил-6-(4-гидроксифенокси)оксан-3,4,5-триол). Следует отметить, что хроматограмма спиртовых извлечений из сухих и све-

Т а б л и ц а 2

Результаты исследования методом ВЭЖХ фенольных соединений в сухом и свежем сырье – листья яблони лесной

Номер образца	Время, мин	Площадь, мВ·с	Площадь, %	Название
1	5,274	399,03	6,42	арбутин
2	6,70	225,92	3,63	неидентифицирован
3	7,24	136,68	2,20	неидентифицирован
4	8,61	29,03	0,47	неидентифицирован
5	11,23	365,61	5,88	неидентифицирован
6	13,66	719,04	11,56	неидентифицирован
7	14,09	990,92	15,94	изорамнетин-3-гал
8	16,96	295,70	4,76	неидентифицирован
9	20,07	994,15	15,99	кверцетин-3-глюк
10	21,45	1546,10	24,87	кверцетин-3-рут
11	24,09	37,73	0,61	флоридзин
12	30,53	61,80	0,99	неидентифицирован
13	35,22	415,72	6,69	кверцетин

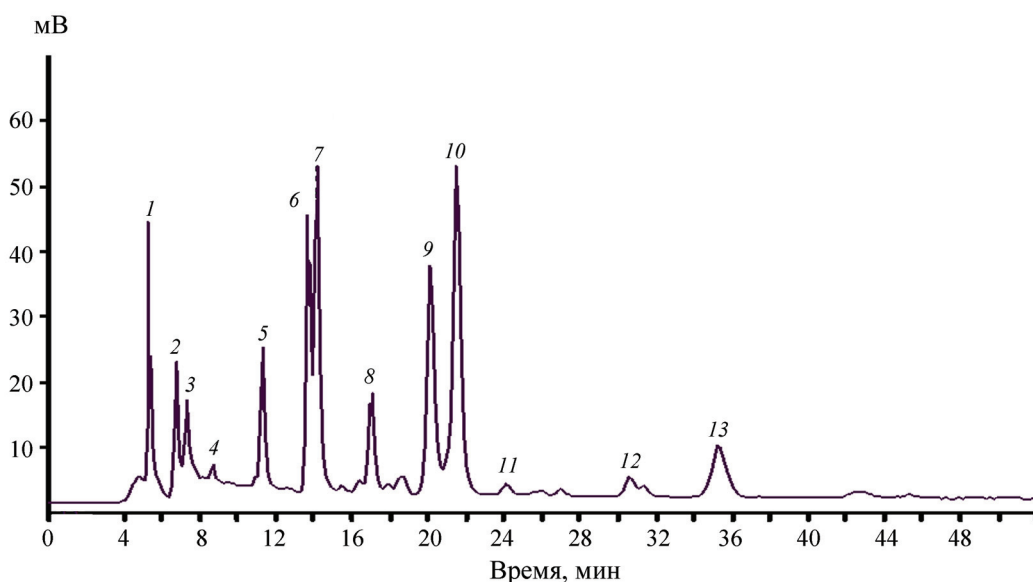


Рис. 3. Хроматограмма спиртового извлечения из листьев яблони лесной методом ВЭЖХ: 1 – абутин; 7 – изорамнетин-3-галактозид; 9 – кверцетин-3-глюкозид; 10 – кверцетин-3-рутинозид; 11 – флоридзин, 13 – кверцетин; 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 – неидентифицированы

Т а б л и ц а 3

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной

n	f	$X_{\text{ср.}}$	S^2	S_x	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X_{\text{ср.}}$	$\varepsilon_{\text{ср.}}, \%$
Свежее сырье – листья яблони лесной								
5	4	0,972	0,00005	0,0071	95	2,78	0,00883	0,908
Высушенное сырье – листья яблони лесной								
5	4	0,7406	0,0000282	0,00531	95	2,78	0,0066	0,890

Об о з н а ч е н и я: f – число степеней свободы, $X_{\text{ср.}}$ – среднее значение выборки, S^2 – дисперсия, S_x – стандартное отклонение, $P, \%$ – вероятность, $\Delta X_{\text{ср.}}$ – полуширина доверительного интервала, $t(P, f)$ – критерий Стьюдента, ε – относительная ошибка.

жих листьев яблони лесной идентичны (рис. 3, табл. 2.)

Расчет количественного содержания арбутина осуществляли методом абсолютной калибровки с использованием компьютерной программы Мультихром Windows по формуле:

$$C_1 (\%) = \frac{S_1 \times C_2 \times 100 \times 100 \times 100}{S_2 \times 25 \times \alpha \times (100 - W)},$$

где $S_{\text{ис.}}$ – площадь пика в исследуемом растворе; $S_{\text{ст.}}$ – площадь пика раствора арбутина СО; $C(\%)$ – содержание арбутина, %; $C_{\text{ст.}}$ – масса навески арбутина СО; α – масса сырья, взятого на анализ (г); W – потеря массы при высушивании, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в спиртовых извлечениях из листьев яблони

лесной представлены в табл. 3. Относительная ошибка методики определения содержания арбутина с 95%-й вероятностью составляет $\pm 0,908\%$ для свежего сырья и $\pm 0,890\%$ для высушенного сырья.

Следует отметить, что при количественном определении арбутина в сухом и свежем сырье листьев яблони лесной методом йодометрического титрования его содержание составляет около 1%. Этот показатель превышает полученный по предлагаемой нами методике ВЭЖХ. Увеличенный выход арбутина в случае применения методики йодометрического титрования может быть объяснен присутствием незначительной примеси соединений фенольной природы, что увеличивает выход при титровании.

Таким образом, нами разработана методика количественного определения арбутина с использованием метода ВЭЖХ, которая в перспективе

может применяться при стандартизации нового растительного сырья – листья яблони лесной, а

также гомеопатических матричных настоек, приготовленных из него.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Груздев В.Ф. Русские рукописные лечебники. Л., 1964.
2. Торэн М.Д. Использование лекарственных растений в русской народной медицине // VII Междунар. конгресс антропологов. М., 1964.
3. Цельс Авл Корнелий. О медицине. Соч. 25–30 гг. н.э. Пер. с лат. М., 1959.
4. Атлас тибетской медицины / пер. Т.А. Асеевой, Н.Д. Болхосоевой, Т.Г. Бухашеевой, Д.Б. Дашиева. М., 1994.
5. Приложение № 2 к приказу № 335 Минздравмедпрома РФ от 28.11.1995 «Номенклатура однокомпонентных гомеопатических лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению на территории РФ»
6. Нестерова Н.В., Самылина И.А. // Здоровье и образование в XXI в. 2017. Т. 19. № 8. С. 25.
7. Нестерова Н.В., Самылина И.А. // Фармация. 2017. Т. 66. № 3. С. 56.
8. Gosch C., Halbwirth H., Kuhn J., Miosic S. // Plant Science. 2009. Т. 176. № 2.
9. Рылина Е.В. Дис. ... канд. фарм. наук. М., 2010.
10. Zhang Zh., Li Sh., Zhang Sh., Gorenstein D. // Phytochemistry. 2006. № 67. P. 784.
11. Andreotti C., Costa G., Treutter D. // Scientia Horticulturae. 2006. № 109. P. 130.
12. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под ред. И.М. Скурхина, В.А. Тутельяна. М., 1998.
13. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М., 1986.
14. Шатиц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига, 1988.
15. Wagner E. // Deutsche Apotheker Zeitung. 1985. № 30. P. 1515.
16. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Платонов И.А., Павлова Л.В. // Химия растительного сырья // 2015. № 1. С. 95.

Поступила в редакцию 15.02.18

После доработки 11.04.18

Принята к публикации 05.09.18

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ARBUTHIN IN LEAVES OF MALUS SYLVESTRIS BY METHOD OF HIGH-EFFICIENT LIQUID CHROMATOGRAPHY

N.V. Nesterova*, I.A. Samylina, A.N. Kuzmenko, I.A. Kuzmenko, I.I. Krasnyuk (Jr.), A.A. Evgrafov

(I.M. Sechenov First Moscow State Medicine University;
*e-mail: nestero-nadezhda@yandex.ru)

As a result of our research, we proposed chromatographic conditions for the separation of arbutin and the conditions for sample preparation of raw materials. – Malus Sylvestris leaves for analysis by HPLC. According to the studies, the content of arbutin should not be less than 0.7%.

Key words: apple tree leaves, arbutin, high-performance liquid chromatography.

Сведения об авторах: Нестерова Надежда Викторовна – аспирант кафедры фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (nestero-nadezhda@yandex.ru); Самылина Ирина Александровна – профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук, чл.-корр. РАН (laznata@mail.ru); Кузьменко Алексей Николаевич – профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (kuzmenko.mma@mail.ru); Кузьменко Иван Алексеевич – студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; Краснюк Иван Иванович (мл.) – зав. кафедрой аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (krasnyuk.79@mail.ru); Евграфов Александр Александрович – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, докт. фарм. наук (afkx_farm@mail.ru).