https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-122-128 УДК 615.072:322



Оригинальная статья / Research article

Идентификация и количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой (Orthilia secunda)

А. В. Лёзина*, И. И. Тернинко, М. В. Крысько

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Лёзина Алёна Владимировна. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

 $\textbf{ORCID:} A. B. \\ \textit{Лёзина} - \text{https://orcid.org/0000-0002-4738-8570; } \text{И. И.} \\ \text{Тернинко} - \text{https://orcid.org/0000-0002-2942-1015; } \\ \text{M. B. } \\ \text{Крысько} - \text{https://orcid.org/0000-001-8166-4930.} \\ \text{Tennish of the proposition of the propositio$

Статья поступила: 20.10.2021 Статья принята в печать: 06.12.2021 Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Ортилия однобокая *Orthilia secunda* (L.) House (матка боровая) – многолетнее травянистое растение, произрастающее на территории Европы, Сибири, Малой и Средней Азии. Трава ортилии однобокой активно применяется в народной медицине в качестве диуретического, ранозаживляющего и противовоспалительного средства. Из литературных источников известно, что данное лекарственное растительное сырье (ЛРС) содержит флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, витамины, а также простые фенолы и их производные (арбутин и гидрохинон). Наличие арбутина обуславливает высокие антиоксидантные и противовоспалительные свойства растения. Но применение ортилии однобокой в официнальной медицине ограничено ввиду отсутствия полной информации о химическом составе и критериев стандартизации данного вида ЛРС.

Цель. Идентификация и количественное определение арбутина хроматографическими методами в траве ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House, заготовленной в различных фитоценотических зонах.

Материалы и методы. Исследуемое ЛРС – трава ортилии однобокой – была заготовлена в различных эколого-фитоценотических зонах: в июле 2018 года заготовку производили в северной части Казахстана (р-н Кокшетау), в июле-августе 2019 года – в Пермском крае и в Тюменской области. Предварительную идентификацию арбутина и сопутствующих фенольных соединений – галловой кислоты и гидрохинона – осуществляли методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на приборе САМАG с УФ-кабинетом (пластины Merck HPTLC silica gel 60 F154, 20 × 10), полуавтоматический аппликатор Linomat 5 (нанесение проб). Пробы наносили в количестве 5 мкл извлечения и 20 мкл раствора стандартного образца (СО). Элюирование пластин осуществляли в автоматической камере САМАG Automatic Developing Chamber (ADC2). Установка параметров и обработка результатов осуществлялась в программе VisionCATS. Количественное определение арбутина проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), которую осуществляли на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) по валидированной методике, приведенной в Европейской Фармакопее 10.0. Детектор диодноматричный SPD-М2ОА, колонка Intersil C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex, США). Обработку результатов проводили с помощью программы LabSolution. Идентификацию и количественное определение арбутина проводили в сравнении с стандартным раствором, который содержал стандартный образец арбутина (С = 0,025 мг/мл) и СО гидрохинона (С = 0,0125 мг/мл).

Результаты и обсуждение. ВЭТСХ-анализ позволил обнаружить арбутин и галловую кислоту – основной продукт гидролитического расщепления/предшественник биосинтеза танинов гидролизуемой группы – в траве ортилии однобокой из разных мест произрастания. ВЭЖХ-анализ демонстрирует различный хроматографический профиль травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах. Однако во всех изучаемых объектах было подтверждено отсутствие гидрохинона и присутствие веществ, которые предположительно можно отнести к его производным, что подтверждается визуальным подобием спектров этих соединений и близостью экстремумов. Установлено, что арбутин не относится к маркерным (мажоритарным) соединениям ортилии. Его содержание невелико и достигает максимума (около 0,021 %) в траве ортилии однобокой, произрастающей на территории Казахстана, в то время как в траве ортилии, заготовленной на территории Пермского края арбутин идентифицирован не был. Из полученных данных следует, что наибольшее накопление арбутина происходит на территориях с более теплым и сухим климатом (северная часть Казахстана).

Заключение. ВЭТСХ анализ травы ортилии однобокой позволил идентифицировать арбутин и галловую кислоту (основной предшественник танинов гидролизуемой группы). Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах, позволяют говорить о количественных различиях в содержании арбутина в зависимости от региона произрастания. Из данных эксперимента следует, что ортилия, произрастающая в северной части Казахстана накапливает максимальное (0,021 %) количество арбутина, в сравнении с образцами, заготовленными в РФ. При этом ортилия заготовленная в Пермском крае арбутин не накапливает. Не подтверждено (методами ВЭТСХ и ВЭЖХ) наличие гидрохинона, следовательно, говорить о гидролитическом расщеплении арбутина в процессе биосинтеза или сушки не обоснованно. Однако во всех изучаемых объектах присутствуют пики веществ со схожими гидрохинону спектральными характеристиками, что дает возможность предположить присутствие его дериватов. Следовательно, позиционировать арбутин в качестве маркерного соединения ортилии, заготовленной на территории РФ, и проводить стандартизацию сырья по данному соединению не целесообразно.

Ключевые слова: ортилия однобокая, фенольные соединения, арбутин, высокоэффективная жидкостная хроматография, гидрохинон

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. И. Тернинко и А. В. Лёзина участвовали в планировании и составлении дизайна эксперимента, проведении ВЭТСХ-анализа, обработке и систематизации данных, полученных в ходе эксперимента. Вышеуказанные авторы принимали участие в написании статьи. М. В. Крысько проводила ВЭЖХ-анализ и участвовала в обсуждении полученных результатов.

© Лёзина А. В., Тернинко И. И., Крысько М. В., 2021 © Lezina A. V., Terninko I. I., Krysko M. V., 2021 **Финансирование.** Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Лёзина А. В., Тернинко И. И., Крысько М. В. Идентификация и количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой (*Orthilia secunda*). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4−1):122−128. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-122-128

Identification and Quantitative Determination of Arbutin in the Herb of *Orthilia secunda*

Alyona V. Lezina*, Inna I. Terninko, Marina V. Krysko

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Alyona V. Lezina. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

 $\textbf{ORCID:} Alyona\ V.\ Lezina-https://orcid.org/0000-0002-4738-8570; lnna\ I.\ Terninko-https://orcid.org/0000-0002-2942-1015; Marina\ V.\ Krysko-https://orcid.org/0000-001-8166-4930.$

Received: 20.10.2021 Revised: 06.12.2021 Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Orthilia secunda (L.) House is a perennial herb that grows in Europe, Siberia, Asia Minor and Central Asia. The herb of Orthilia secunda is actively used in folk medicine as a diuretic, wound-healing and anti-inflammatory agent. From literary sources it is known that this medicinal plant raw material (PRM) contains flavonoids, tannins, organic acids, vitamins, as well as simple phenols and their derivatives (arbutin and hydroquinone). The presence of arbutin is responsible for the plant's high antioxidant and anti-inflammatory properties. But the use of Orthilia secunda in official medicine is limited due to the lack of complete information on the chemical composition and criteria for standardization of this type of medicinal product.

Aim. Identification and quantification of arbutin by chromatographic methods in Orthilia secunda (L.) House, harvested in various phytocenotic zones.

Materials and methods. The investigated medicinal plant material – the herb of *Orthilia secunda* – was harvested in various phytocenotic zones: in July 2018, harvesting was carried out in the northern part of Kazakhstan (Kokshetau district), in July-August 2019 in the Perm Territory and in the Tyumen Region. Preliminary identification of arbutin and related phenols – gallic acid and hydroquinone – was carried out by high performance thin layer chromatography (HPTLC) on a CAMAG instrument with a UV cabinet (Merck HPTLC silica gel 60 F154 plates, 20×10), semi-automatic Linomat 5 applicator (sample application). Elution of the plates was performed in a CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2). Image fixation was performed on a CAMAG Scanner 3 spectrodensitometer. The quantitative determination of arbutin was carried out by the method of high-performance liquid chromatography, which was carried out on a Prominence LC-20 device (Shimadzu, Japan) according to the validated method described in the European Pharmacopoeia 10.0. Diode array detector SPD-M20A, column Intersil C18 column (250–4.6 mm, 5 μ m) (Phenomenex, USA). The results were processed using the LabSolution software. The identification and quantification of arbutin was carried out in comparison with a standard solution containing a reference sample (RS) of arbutin (C = 0.025 mg/ml) and RS of hydroquinone (C = 0.0125 mg/ml).

Results and discussion. HPTLC analysis made it possible to detect arbutin and gallic acid – the main product of hydrolytic degradation/ precursor of the biosynthesis of tannins of the hydrolysable group – in the herb of *Orthilia secunda* from different places of growth. HPLC analysis demonstrates a different chromatographic profile of Orthilia herb harvested in different phytocenotic zones. However, in all studied objects, the absence of hydroquinone and the presence of substances that can presumably be attributed to its derivatives were confirmed, which is confirmed by the visual similarity of the spectra of these compounds and the proximity of the extrema. It was found that arbutin does not belong to the marker (majority) compounds of Orthilia. Its content is low and reaches a maximum (about 0,021 %) in the herb of *Orthilia secunda* growing on the territory of Kazakhstan, while in the herb of Orthilia harvested in the Perm Territory arbutin was not identified. From the data obtained, it follows that the greatest accumulation of arbutin occurs in areas with a warmer and drier climate (northern part of Kazakhstan).

Conclusion. HPTLC analysis of the herb *Orthilia secunda* allowed the identification of arbutin and gallic acid (the main precursor of tannins of the hydrolysable group). The results of HPLC analysis of Orthilia herb harvested in various phytocenotic zones suggest quantitative differences in the content of arbutin depending on the region of growth. From the experimental data, it follows that Orthilia growing in the northern part of Kazakhstan accumulates the maximum (0,021%) amount of arbutin, in comparison with the samples harvested in the Tyumen region and the Perm region. At the same time, Orthilia harvested in the Perm Territory does not accumulate arbutin. The presence of hydroquinone has not been confirmed (by HPTLC and HPLC methods); therefore, it is not justified to talk about the hydrolytic cleavage of arbutin in the process of biosynthesis or drying. However, in all studied objects there are peaks of substances with spectral characteristics like hydroquinone, which makes it possible to assume the presence of its derivatives. Therefore, it is not advisable to position arbutin as a marker compound of *Orthilia secunda* harvested on the territory of the Russian Federation, and to standardize raw materials for this compound.

Keywords: Orthilia secunda, phenolic compounds, arbutin, high performance liquid chromatography, hydroquinone

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Inna I. Terninko and Alyona V. Lezina participated in the planning and design experiment, HPTLC analysis, processing and systematization of data obtained during the experiment. The above authors took part in writing the article. Marina V. Krysko performed HPLC analysis and participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical Universit" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Lezina A. V., Terninko I. I., Krysko M. V. Identification and quantitative determination of arbutin in the herb of *Orthilia secunda. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration.* 2021;10(4–1):122–128. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-122-128

ВВЕДЕНИЕ

Ортилия однобокая – многолетнее травянистое растение, принадлежащее семейству Вересковые (*Ericaceae*). Широко распространено на территории Европы, Западной и Восточной Сибири, в Малой и Средней Азии [1]. Местообитание – сухие хвойные леса, реже растение произрастает в смешанных и лиственных массивах [2]. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) ортилии однобокой – трава, заготовка происходит в период плодоношения (конец июля-август), поскольку в это время происходит максимальное накопление главных групп БАВ (флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, фенольные соединения) [3, 4].

Ортилия однобокая (матка боровая) активно используется в народной медицине для лечения заболеваний женской репродуктивной сферы [5]. Существуют данные о ее противовоспалительных, ранозаживляющих и гемостатических свойствах [6-8]. Применяют для лечения воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), бесплодия, дисменореи и эндометриоза (ЭМ). На фармацевтическом рынке представлена в виде биологически активных добавок (БАД). Широкий спектр фармакологического действия обусловлен комплексом БАВ, в основном фенольной структуры. Из литературных источников [4] известно, что ортилия однобокая содержит в своем составе арбутин, однако, точные данные о его количественном содержании отсутствуют. Сообщается [9, 18] о противовоспалительном, антиоксидантном [10, 11], отбеливающим кожу [12, 13] и антибактериальном [14] действии арбутина. Учитывая, что антиоксидантная активность ЛР в последнее время приобретает все большее значение [15], арбутин как индивидуальное соединение широко применяется в медицине и косметической промышленности. На данный момент одним из основных источников получения арбутина является ЛРС [16].

Цель работы – идентификация и количественное определение арбутина хроматографическими методами в траве ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House, заготовленной в различных фитоценотических зонах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служило воздушно-сухое ЛРС – трава ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House, заготовленная в трех эколого-фитоценотических зонах. В августе 2018 года заготовку ортилии однобокой осуществляли на севере Казахстана (район Кокшетау). В июле 2019 года заготавливали в Пермском крае, в конце июля-августе 2019 года в Тюменской области.

Предварительную идентификацию арбутина и сопутствующих фенольных соединений – галловой кислоты и гидрохинона – осуществляли методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на приборе CAMAG с УФ-кабинетом (пластины Merck HPTLC silica gel 60 F154, 20×10). Пробы извлечений наносили полуавтоматическим аппликатором Linomat 5. Элюировали пластины в автоматической камере CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2). Установка параметров и обработка результатов осуществлялась в программе VisionCATS.

В качестве испытуемых растворов использовали водно-спиртовые извлечения (экстрагент спирт этиловый 70 %). Около 2,0 (точная навеска) измельченной травы (размер частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия 7 мм) помещали в круглодонную колбу со шлифом, экстрагировали этанолом 70 % в соотношении 1:4 с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение часа. Затем колбу охлаждали и извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Процесс экстрагирования повторяли. Водно-спиртовые извлечения объединяли, отстаивали в холодильнике 24 часа, после чего отфильтровывали.

Растворы стандартных образцов (СО) арбутина (C=5 мг/мл) (аналитический стандартный образец, партия №3-SYQ-69-1, годен до 10.2021, Sigma Aldrich), галловой кислоты (C=2 мг/мл) (сертифицированный стандартный образец, TraceCERT®, партия № ВССС0553, годен до 11.2021, Sigma Aldrich) и гидрохинона (C=2,5 мг/мл) (вторичный фармацевтический стандартный образец, партия № SA00340113, годен до 06.202, Sigma Aldrich) готовили растворением в этаноле 96% (х.ч., Гатчинский спиртовый завод, номер паспорта МЦ0000001338, бессрочный).

На хроматографическую пластину наносили по 5 мкл исследуемых извлечений и по 20 мкл растворов СО. Развитие хроматограмм осуществляли в системе этилацетат:муравьиная кислота:вода (88:6:6). Прохождение фронта составило 90 %. Идентификацию пятен на хроматограмме осуществляли в фильтрованном УФ-свете при 254 и 366 нм. Сравнивали показатели удерживания (Rf), окраску, размер и форму пятна.

Количественное определение арбутина проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) по валидированной методике, приведенной в Европейской Фармакопее 10.0 [17]. Детектор диодноматричный SPD-M20A, колонка Intersil C18 (250 \times 4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex, США). Температура термостата колонки 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока элюента 1,2 мл/мин. Подвижная фаза (ПФ) – метанол:вода (10:90). Регистрация поглощения осуществлялась при длине волны 280 нм. Обработку результатов проводили с помощью программы LabSolution.

Пробоподготовка

Около 5,0 грамм (точная навеска) порошка травы ортилии помещали в круглодонную колбу на 100 мл. Добавляли 25 мл воды очищенной и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Колбу охлаждали, фильтровали через ват-

ный тампон. После фильтрования ватный тампон помещали в колбу к остатку порошка и добавляли новую порцию 25 мл воды очищенной. Экстракцию повторяли. Новую порцию экстракта охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтраты объединяли, доводили водой очищенной в мерной колбе до 50,0 мл. 1,0 мл полученного извлечения с помощью автоматического дозатора (диапазон 100–1000 мкл, дискретность 5 мкл, Финляндия, ВІОНІТ) помещали в мерную колбу на 25,0 мл, доводили водой очищенной до метки и тщательно перемешивали.

В качестве стандартного раствора использовали смесь растворов СО арбутина и гидрохинона.

Раствор СО арбутина: 50,0 мг арбутина (аналитический стандартный образец, партия № 3-SYQ-69–1, годен до 10.2021, Sigma Aldrich) растворяли в ПФ в мерной колбе на 50,0 мл и доводили до метки ПФ.

Раствор СО гидрохинона: 2,5 мг гидрохинона (вторичный фармацевтический стандартный образец, партия № SA00340113, годен до 06.202, Sigma Aldrich) растворяли в ПФ в мерной колбе на 10 мл и доводили до метки ПФ.

К 5,0 мл раствора СО гидрохинона прибавляли 2,5 мл раствора СО арбутина и доводили до объема 10,0 мл ПФ (раствор A).

1,0 мл раствора A помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили ПФ до метки (раствор B).

Хроматографируют последовательно стандартный раствор 5 раз и испытуемый раствор 3 раза.

Проводили 3 параллельных определения арбутина в траве ортилии.

Идентификацию арбутина на хроматограммах испытуемого раствора проводили по времени удерживания в сравнении с хроматограммами стандартного раствора, а также путем сопоставления спектров отдельных пиков и спектра пика арбутина в стандартном растворе.

Расчет количественного содержания (X) арбутина (%) проводили по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_{\text{CO}} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2, 5 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_2 \cdot a_1 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 10 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_{\text{CO}} \cdot 62, 5 \cdot P}{S_2 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где S_1 – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора; S_2 – площадь пика арбутина на хроматограмме стандартного раствора; a_1 – навеска ЛРС, г; $a_{\rm CO}$ – навеска СО арбутина, г; P – содержание основного вещества арбутина в СО, %; W – влажность ЛРС, %.

Испытания проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

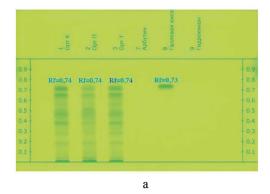
Хроматограммы идентификации отдельных фенольных соединений и их гликозидов методом ВЭТСХ приведены на рисунке 1.

Предварительная хроматографическая идентификация фенольных соединений позволила обнаружить арбутин и галловую кислоту – основной продукт гидролитического расщепления / предшественник биосинтеза танинов гидролизуемой группы – в траве ортилии однобокой из разных мест произрастания. Гидрохинон в траве ортилии идентифицирован не был.

Результаты ВЭЖХ анализа приведены на рисунках 2–3 и в таблице 1.

Хроматограммы испытуемых растворов, приведенные на рисунке 2, демонстрируют различный хроматографический профиль травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах.

Однако во всех изучаемых объектах было подтверждено отсутствие гидрохинона. Пики веществ с высокой интенсивностью, которые лежат в диапазоне 37,5–50,0 минут (время выхода СО гидрохинона – 46,2 мин) предположительно относятся к различным (метилированным или гликозилированным) производным гидрохинона. Необходимо отметить, что спектры данных соединений (рисунок 4) визуально схожи и имеют близкие, но различные максимумы, что дает возможность позиционировать их как соединения с родственной структурой. Однако данная гипотеза нуждается в подтверждении посредством выделе-



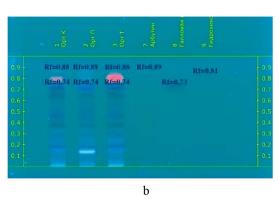


Рисунок 1. ВЭТСХ-анализ фенольных соединений (детекция а – при λ = 254 нм, b – при λ = 366 нм)

Figure 1. HPTLC analysis of phenolic compounds (detection a – at λ = 254 nm, b – at λ = 366 nm)

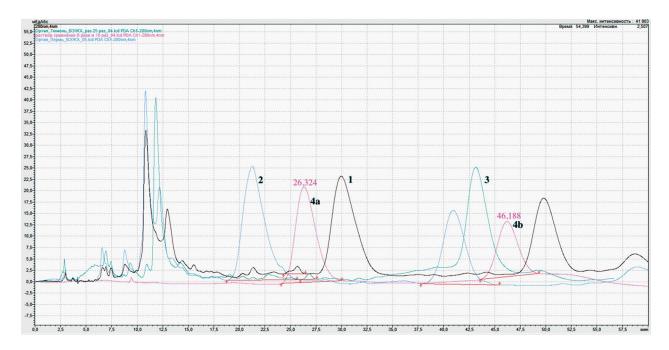


Рисунок 2. Хроматограммы извлечений из травы ортилии однобокой, заготовки:

1 – Казахстан, 2 – Пермский край, 3 – Тюменская область и стандартного раствора 4 (а-абутин, b-гидрохинон)

Figure 2. Chromatograms of extracts from the herb of Orthilia secunda harvested in:

1 - Kazakhstan, 2 - Perm region, 3 - Tyumen region and a standard solution 4 (a- arbutin, b- hydroquinone)

ния индивидуальных соединений и установления их структуры.

Пики веществ на хроматограммах, несмотря на удовлетворительный фактор асимметрии (0,8–1,2), имеют большую ширину, что может говорить о не удовлетворительной сорбционной способности и не-

обходимости корректирования (в части ПФ) фармакопейной методики. Также необходимо отметить, что пик с высокой интенсивностью на хроматограмме испытуемого раствора травы ортилии, заготовленной в Казахстане, с временем удерживания 29,97 мин имеет спектр с максимумами поглощения, характерными

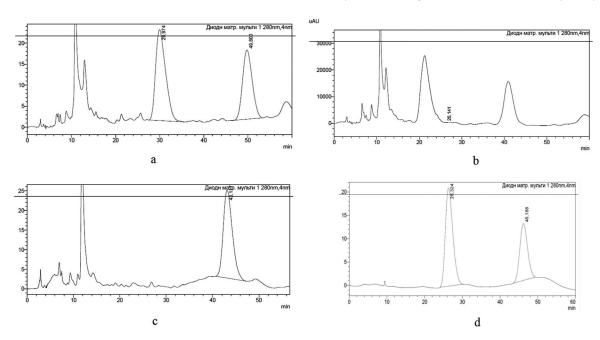


Рисунок 3. Хроматограммы испытуемых растворов травы ортилии заготовленной в различных регионах.

а –Казахстан; b – Пермь; с – Тюмень; и стандартного раствора В (d)

Figure 3. Chromatograms of the tested solutions of Orthilia secunda herb harvested in different regions.

a – Kazakhstan; b – Perm; c – Tyumen; and standard solution B (d)

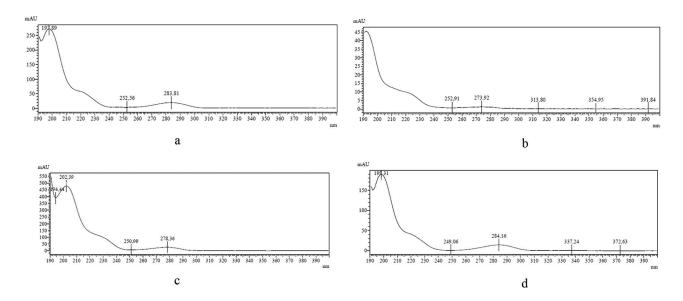


Рисунок 4. УФ-спектры отдельных пиков на хроматограммах испытуемых растворов травы ортилии, заготовленной.

а – Казахстан (пик с tR 49,80); b – Пермь (пик с tR 40,93); с – Тюмень (пик с tR 43,12) и пика гидрохинона в стандартном растворе (d)

Figure 4. UV spectra of individual peaks on the chromatograms of the tested solutions of Orthilia herb harvested.

a – Kazakhstan (peak with tR 49,80); b – Perm (peak with tR 40,93); c – Tyumen (peak with tR 43, 12) and the peak of the hydroquinone in standard solution (d)

для арбутина (λ = 220 и 284 нм), что может говорить об очень близкой химической структуре данного соединения.

Таблица 1. Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортлии однобокой

Table 1. Results of HPLC-analysis of Orthilia secunda

	•		
Трава ортилии однобокой заготовленной в регионе Orthilia secunda grass harvested in the region	Время удерживания пика арбутина, мин Retention time of the peak of arbutin, min	Площадь пика арбутина Arbutin peak area	Содержание арбутина, % $(n=3, P=0.95)$ Arbutin content,% $(n=3, P=0.95)$
Казахстан Kazakhstan	25,67	89786	0,021 ± 0,001
Пермский край Perm Krai	не идентифицирован not identified		
Тюменская область Tyumen Oblast	26,84	47460	0,011 ± 0,001

Примечание. Площадь пика арбутина на хроматограмме CO – 2900921.

Время удерживания арбутина на хроматограмме раствора сравнения – 26,32.

Note. Arbutin peak area on the SS chromatogram – 2900921.

The retention time of arbutin on the chromatogram of the reference solution is 26.32.

Установлено, что арбутин не относится к маркерным (мажоритарным) соединениям ортилии. Его содержание невелико и достигает максимума (около 0,02 %) в траве ортилии однобокой, произрастающей на территории Казахстана, в то время как в траве ор-

тилии, заготовленной на территории Пермского края арбутин идентифицирован не был. Гипотеза о гидролизе арбутина не подтверждена исследованием, т. к. в извлечениях не идентифицирован гидрохинон – агликон арбутина, который образуется в процессе гидролитического расщепления. Из полученных данных следует, что наибольшее накопление арбутина происходит на территориях с более теплым и сухим климатом (северная часть Казахстана), в то время как на территории Российской Федерации арбутина накапливается в минимальных количествах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЭТСХ анализ травы ортилии однобокой позволил идентифицировать арбутин и галловую кислоту (основной предшественник танинов гидролизуемой группы). Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах, позволяют говорить о количественных различиях в содержании арбутина в зависимости от региона произрастания. Из данных эксперимента следует, что ортилия, произрастающая в северной части Казахстана накапливает максимальное (0,021 %) количество арбутина, в сравнении с образцами, заготовленными в Тюменской области. При этом ортилия заготовленная в Пермском крае арбутин не накапливает. Не подтверждено (методами ВЭТСХ и ВЭЖХ) наличие гидрохинона, следовательно, говорить о гидролитическом расщеплении арбутина в процессе биосинтеза или сушки не обоснованно. Однако во всех изучаемых объектах присутствуют пики веществ со схожими гидрохинону спектральными характеристиками, что дает возможность предположить присутствие его дериватов.

Следовательно, позиционировать арбутин в качестве маркерного соединения ортилии, заготовленной на территории РФ, и проводить стандартизацию сырья по данному соединению не целесообразно.

ЛИТЕРАТУРА

- Beatty G. E., Provan J. Comparative phylogeography of two related plant species with overlapping ranges in Europe, and the potential effects of climate change on their intraspecific genetic diversity. BMC Evolutionary Biology. 2011;11(1):29. DOI: 10.1186/1471-2148-11-29.
- 2. Устенова Г.О. Правила сбора, заготовки и хранения лекарственного растения ортилии однобокой (*Orthilia secunda*). *Becmник Ka3HMY*. 2018:1:345–347.
- Ботоева Е. А., Убеева И. П., Николаев С. М. Оценка фармакотерапевтической эффективности сухого экстракта ортилии однобокой. Acta Biomedica Scientifica. 2009;2:40–41.
- 4. Ботоева Е. А. О химико-фармакологической характеристике фитосредств, использованных для экспериментальной фармакотерапии повреждений матки. Вестник БГУ. Медицина и фармация. 2011;12:147–153.
- Ломбоева С. С., Танхаева Л. М., Олейников Д. Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (Orthilia secunda (L.) House). Химия растительного сырья. 2008;2:65–68.
- Фадеева Н. И. Сравнительная оценка эффективности разных фитопрепаратов, содержащих ортилию однобокую (Orthília secúnda), в лечении хронического эндометрита. Бюллетень медицинской науки. 2017;7:43–46.
- Kang S. H., Jeon Y. D., Cha J. Y. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of Euphorbia supina Raf. Extract. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):256. DOI: 10.1186/s12906-018-2323-5.
- Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):98–102. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Tada M., Kohno M., Niwano, Y. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA. BMC Biochemistry. 2014;15:23. DOI: 10.1186/1471-2091-15-23.
- Mir H., Komi E. A. D., Pouramir M. The hepatoprotective effects of Pyrus biossieriana buhse leaf extract on tert-butyl hydroperoxide toxicity in HepG2 cell line. *BMC Research Notes*. 2021;14:298. DOI: 10.1186/s13104-021-05713-6.
- 11. Pandey B. P., Pradhan S. P., Adhikari K. Bergenia pacumbis from Nepal, an astonishing enzymes inhibitor. *BMC Complementary Medicinal and Therapy*, 2020;20:198. DOI: 10.1186/s12906-020-02989-2.
- Liang K., Xu K., Bessarab D. Arbutin encapsulated micelles improved transdermal delivery and suppression of cellular melanin production. *BMC Research Notes*. 2016;9:254. DOI: 10.1186/s13104-016-2047-x.
- Hong S. Y., Lansky E., Kang S. S. A review of pears (Pyrus spp.), ancient functional food for modern times. BMC Complementary Medicine and Therapy. 2021;21:219. DOI: 10.1186/s12906-021-03392-1.
- Trill J., Simpson C., Webley F. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments of adult female urinary tract infection (ATAFUTI): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18:421. DOI: 10.1186/s13063-017-2145-7.
- Тринеева О.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф. Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами. *Разработка и ре*гистрация лекарственных средств. 2020;9(3):59–66. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66.
- Wang S., Fu C., Bilal M. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in Pseudomonas chlororaphis P3. Microbial Cell Factories. 2018;17:174. DOI: 10.1186/s12934-018-1022-8.
- The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. Available at: https://pheur.edqm.eu/home. Accessed: 18.08.2021.
- Polouliakh N., Ludwig V., Meguro A., Kawagoe T., Heeb O., Mizuki N. Alpha-arbutin promotes wound healing by lowering ROS and upregulating insulin/igf-1 pathway in human dermal fibroblast. Frontiers of Physiology. 2020;4;11:586843. DOI: 10.3389/fphys.2020.586843.

REFERENCES

- Beatty G. E., Provan J. Comparative phylogeography of two related plant species with overlapping ranges in Europe, and the potential effects of climate change on their intraspecific genetic diversity. BMC Evolutionary Biology. 2011;11(1):29. DOI: 10.1186/1471-2148-11-29.
- Ustenova G. O. Rules for the collection, preparation and storage of the medicinal plant Orthilia secunda. Vestnik KazNMU. 2018;1:345– 347. (In Russ.)
- Botoeva E. A., Ubeeva I. P., Nikolaev S. M. Evaluation of the pharmacotherapeutic efficacy of dry extract of Orthilia secunda. Acta Biomedica Scientifica. 2009;2:40–41. (In Russ.)
- 4. Botoeva E. A. On the chemical and pharmacological characteristics of herbal remedies used for experimental pharmacotherapy of uterine injuries. *Vestnik BGU. Meditsina i farmatsiya = The Bryansk State University Herald.* 2011;12:147–153. (In Russ.)
- 5. Lomboeva S. S., Tankhaeva L. M., Oleynikov D. N. Method for the quantitative determination of the total content of flavonoids in the aerial part of *Orthilia secunda* (L.) House. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* = *Chemistry of plant raw material*. 2008;2:65–68. (In Russ.)
- Fadeeva N. I. Comparative assessment of the effectiveness of different herbal remedies containing Orthília secúnda in the treatment of chronic endometritis. Byulleten' meditsinskoy nauki = Bulletin of Medical Science. 2017;7:43–46. (In Russ.)
- Kang S. H., Jeon Y. D., Cha J. Y. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. Extract. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):256. DOI: 10.1186/s12906-018-2323-5.
- 8. Skibina A. A., Bokov D. O., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylina I. A. HPLC-Analysis of phenolic complex in pectoral species № 4 and it's dry extract. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2019;8(2):98–102. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Tada M., Kohno M., Niwano, Y. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA. BMC Biochemistry. 2014;15:23. DOI: 10.1186/1471-2091-15-23.
- Mir H., Komi E. A. D., Pouramir M. The hepatoprotective effects of Pyrus biossieriana buhse leaf extract on tert-butyl hydroperoxide toxicity in HepG2 cell line. *BMC Research Notes*. 2021;14:298. DOI: 10.1186/s13104-021-05713-6.
- 11. Pandey B. P., Pradhan S. P., Adhikari K. Bergenia pacumbis from Nepal, an astonishing enzymes inhibitor. *BMC Complementary Medicinal and Therapy*. 2020;20:198. DOI: 10.1186/s12906-020-02989-2.
- Liang K., Xu K., Bessarab D. Arbutin encapsulated micelles improved transdermal delivery and suppression of cellular melanin production. *BMC Research Notes*. 2016;9:254. DOI: 10.1186/s13104-016-2047-x.
- Hong S. Y., Lansky E., Kang S. S. A review of pears (Pyrus spp.), ancient functional food for modern times. *BMC Complementary Medicine and Therapy*. 2021;21:219. DOI: 10.1186/s12906-021-03392-1.
- 14. Trill J., Simpson C., Webley F. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments of adult female urinary tract infection (ATAFUTI): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18:421. DOI: 10.1186/s13063-017-2145-7.
- Trineeva O.V., Slivkin A.I., Safonova E.F. Determination of nettle leaves extracts antioxidant activity by various methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):59–66. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66.
- Wang S., Fu C., Bilal M. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in Pseudomonas chlororaphis P3. Microbial Cell Factories. 2018;17:174. DOI: 10.1186/s12934-018-1022-8.
- The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. Available at: https://pheur.edam.eu/home. Accessed: 18.08.2021.
- Polouliakh N., Ludwig V., Meguro A., Kawagoe T., Heeb O., Mizu-ki N. Alpha-arbutin promotes wound healing by lowering ROS and upregulating insulin/igf-1 pathway in human dermal fibro-blast. Frontiers of Physiology. 2020;4;11:586843. DOI: 10.3389/fphys.2020.586843.