

УДК 543.544.5.068.7:582.717

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ВЭЖХ-УФ ДЛЯ БЫСТРОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА АРБУТИНА, БЕРГЕНИНА И ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ В *BERGENIA CRASSIFOLIA*

© Т.М. Шишмарева*, В.М. Шишмарев, Д.Н. Оленников

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,
ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047 (Россия), e-mail: shishmarevatm@mail.ru

Настоящая работа посвящена разработке методики с применением микроколоночной ВЭЖХ-УФ для быстрого количественного анализа арбутина, бергенина и галловой кислоты в *Bergenia crassifolia*. Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительных метрологических характеристиках разработанной методики. Установлено, что известные методики количественного анализа фенологликозидов с применением ТФЭ-спектрофотометрии не могут быть охарактеризованы как селективные и точные, ввиду того что присутствующие примесные соединения, не относящиеся к группе фенологликозидов (бергенин), искажают результаты. Разработанная методика была использована для количественного анализа дикорастущих и коммерческих образцов сырья *B. crassifolia*. Установлено, что содержание арбутина, бергенина и галловой кислоты в образцах корневищ *B. crassifolia*, собранных в Республике Бурятия, составило 38.58–45.97, 66.74–139.76 и 1.22–1.65 мг/г соответственно, а для коммерческих партий сырья – 20.57–41.37, 35.04–83.94 и 0.22–1.28 мг/г соответственно. В ходе исследований было установлено, что процесс постепенного ферментативного изменения цвета листьев (зеленые, красные, черные) приводит к значительным изменениям в химическом составе. Наиболее выраженным явлением является деградация бергенина, присутствие которого отмечено только в зеленых листьях. Концентрация галловой кислоты снижена в черных листьях. Для арбутина характерно повышенное содержание в красных листьях (102.02 мг/г). Дополнительно был проведен количественный анализ цветоносов и цветков *B. crassifolia* и показано, что они отличаются высоким содержанием арбутина – 48.40 и 42.15 мг/г соответственно, а также бергенина (16.89 мг/г). Проведенные исследования показали, что разработанная методика может быть применена для быстрого, селективного и точного количественного анализа трех соединений в различных органах *B. crassifolia*.

Ключевые слова: *Bergenia crassifolia*, *Saxifragaceae*, арбутин, бергенин, галловая кислота, микроколоночная ВЭЖХ-УФ.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № АААА-А17-117011810037-0.

Введение

Бадан толстолистный (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch) – многолетнее травянистое растение семейства Камнеломковые (*Saxifragaceae*) до 50 см высотой [1]. *B. crassifolia* распространен в Сибири, Казахстане, Приморье, на севере Монголии, в Китае и Корее. Вид встречается в лесном поясе и высокогорьях, на скалах и каменистых склонах, под пологом темнохвойной тайги, в зарослях кедрового стланника [1, 2]. Наиболее плот-

Шишмарева Татьяна Михайловна – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, e-mail: shishmarevatm@mail.ru

Шишмарев Вячеслав Михайлович – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, e-mail: shishmarev.2015@mail.ru

Оленников Даниил Николаевич – доктор фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, e-mail: olennikovdn@mail.ru

ные заросли образует в местах, защищенных от ветра и имеющих толстый зимний покров снега, и может «забираться» на высоту свыше 2000 м н. у. м.

В лекарственных целях используют корневища, значительно реже – листья. Лекарственные свойства *B. crassifolia* издавна используются в традиционных медицинах Востока: тибетской [3], китайской [4], монгольской [5]. Водные экстракты корневища и листьев *B. crassifolia* применяют при

* Автор, с которым следует вести переписку.

колитах, энтероколитах неинфекционной природы, в акушерско-гинекологической практике при лечении эрозий шейки матки [6]. Препараты *B. crassifolia* используют в гинекологической практике при обильных менструациях на почве воспалительных процессов придатков, при геморрагических метропатиях, фиброме матки, после родов, при кровотечениях после прерывания беременности [7]. *B. crassifolia* применяют также при колитах недизентерийной природы; при дизентерии – в комбинации с сульфаниламидами и антибиотиками; в стоматологической практике – для смазывания десен при хронических воспалительных процессах в ротовой полости [8]. Современными исследованиями показано, что экстракт листьев *B. crassifolia* в эксперименте обладает противовоспалительной активностью [9], водный и спиртовой экстракты листьев – диуретической [10], отвар и настой листьев – антигипоксической [11]. Экстракты корней и корневищ, этанольный экстракт и сухой экстракт листьев обладают антиоксидантной активностью [9, 12–14].

В настоящее время из *B. crassifolia* выделено и идентифицировано более 100 химических компонентов, включая дубильные вещества, бензаноиды (гидрохинон), флавоноиды, полисахариды, терпены, альдегиды и т.д. [15].

Ранее был предложен вариант одновременного анализа арбутина, бергенина и галловой кислоты в листьях видов *Bergenia* с применением ВЭЖХ, длительность процедуры в котором составила 15 мин [16]. Учитывая возрастающие потребности фармацевтической практики в создании быстрых методов количественного определения действующих веществ в растительном сырье, нами рассмотрена возможность использования микроколоночной ВЭЖХ для реализации данной задачи.

Цель настоящей работы – применение микроколоночной ВЭЖХ-УФ для быстрого количественного анализа арбутина, бергенина и галловой кислоты в *Bergenia crassifolia*.

Экспериментальная часть

Растительное сырье. Образцы *B. crassifolia* были собраны в различных районах Республики Бурятия (Баргузинский, Заиграевский и Прибайкальский) в 2015 г. (табл. 1). Сбор растительного сырья (цветоносы, цветки) проводили в фазу цветения (июнь), а листья и корневища – в фазу плодоношения (июль-август).

Фитоценотическая характеристика изученных ценопопуляций дается на основании геоботанических описаний, проводившихся по общепринятой методике [17, 18].

Общие экспериментальные условия. Для твердофазной экстракции (ТФЭ) применяли полиамид (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Санкт-Петербург, Россия). Хроматографический анализ проводили с использованием хроматографа Милихром А-02 (Эконова, Новосибирск, Россия), снабженного автосеплером, колонкой ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм, Ø5 мкм; MetrohmAG, Herisau, Switzerland), термостатом для колонки и УФ-детектором. В качестве элюента использовали ацетонитрил марки 0 (сорт ООО НПК «Криохим»).

Таблица 1. Описание растительного сырья, использованного в работе

Номер ЦП ^а	Географические координаты	Высота н.у.м., м	Дата сбора	Местообитание	Ассоциация	ОПП ^б , %	ЧВ ^в
Баргузинский район							
1	N 53°40'07,61" E 109°01'45,98"	462	15.07.2015	окр. бухты Змеевая	Сосново-бадановая	55	28
Заиграевский район							
2	N 52°02'39,50" E 108°06'36,40"	975	10.08.2015	окр. с. Добо-Енхор	Сосново-березово-бадановая	60	25
Прибайкальский район							
3	N 52°58'27,50" E 108°17'31,60"	504	28.07.2015	окр. с. Горячинск	Березово-осиново-бадановая	50	22
4	N 52°54'29,60" E 108°10'46,30"	470	31.07.2015	мес-ть Пески	Сосново-березово-бадановая	30	13
5	N 52°57'48,70" E 108°13'56,20"	493	26.08.2015	окр. с. Турка	Сосново-бруснично-бадановая	80	18
6	N 51°59'32,30" E 107°43'56,20"	1238	28.08.2015	мес-ть Пыхта	Кедрово-можжевельниково-бадановая	65	27

^а Цифрами обозначены номера ценопопуляций *B. crassifolia*; ^б Общее проективное покрытие травяного яруса; ^в число видов.

Микроколоночная ВЭЖХ-УФ (МК-ВЭЖХ-УФ). Количественный анализ растительного сырья проводили методом МК-ВЭЖХ-УФ. Для этого 40 мг сырья переносили в пробирку (2 мл), приливали 1 мл 70% этанола и подвергали ультразвуковой обработке (50 кГц, 30 мин, 40°C), после чего центрифугировали (6000 g, 20 мин). Полученное извлечение фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и использовали для анализа (1 мкл). Условия: подвижная фаза – 0,2 М LiClO₄ в 0,006 М HClO₄ (А), MeCN (В); градиентный режим (% В): 0–6 мин 5–25%, 6–11 мин 25%, 11–17 мин 30–60%, 17–20 мин 100%; v 150 мкл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор, λ 276 нм. Расчет содержания индивидуальных компонентов проводили по градуировочным графикам, построенным с применением коммерческих образцов Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) арбутина (№ А4256, ≥98%), галловой кислоты (№ G7384, ≥97.5%), бергенина (№ SMB00073, ≥95%) и хебулиновой кислоты (№ PHL80572, ≥80%).

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) [19]. Значимость различий средних определяли с помощью многогранового теста Дункана. Отличия при $p < 0.05$ считались статистически значимыми. Результаты представлены в виде средних значений $\pm SD$ (стандартное отклонение), определенных в пяти повторностях.

Обсуждение результатов

На территории Республики Бурятия *B. crassifolia* растет на скалах, осыпях, старых моренах и каменистых склонах субальпийского и верхней части лесного пояса, в хвойных и лиственных лесах со средне-сомкнутым пологом. В исследованных ценопопуляциях это растение встречается на высотах 462–1238 м н. у. м. Общее проективное покрытие травяного яруса составляет 30–80%. В видовом составе растительных сообществ насчитывается от 13 до 28 видов высших растений. Общее число зарегистрированных видов достигает 72. Наибольшее число видов отмечено в ЦП-1, 2 и 6. Наибольшая встречаемость бадана толстолистного отмечена в сосново-березово-бадановом (ЦП-2 и ЦП-4) сообществах.

Методика МК-ВЭЖХ-УФ анализа и ее валидация. Для анализа растительного сырья (корневища *B. crassifolia*) были подобраны условия хроматографического анализа в условиях МК-ВЭЖХ-УФ, позволившие реализовать удовлетворительное разделение трех соединений в течение 2 мин (рис. 1).

Валидационный анализ показал, что зависимости площадей хроматографических пиков от концентрации арбутина, бергенина и галловой кислоты в диапазоне концентрации описывались линейной регрессией со значением коэффициента детерминации 0.9998–0.9999 (табл. 2). Величины пределов детектирования (LOD) и количественного определения (LOQ) составили 0.5–10 и 1.5–30 мкг/мл соответственно. Показатели воспроизводимости, вариабельности и стабильности не превышали 1.5%. Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительных метрологических характеристиках разработанной методики.

Сравнительный анализ селективности и точности методов ВЭЖХ и спектрофотометрии в анализе фенологликозидов. Для анализа растительного сырья, содержащего фенологликозиды, предложены различные варианты спектрофотометрического анализа. В качестве наиболее объективных рассматриваются методики, в которые включен этап твердофазной экстракции (ТФЭ) растительного извлечения на патроне из Al₂O₃ [20] или полиамида [21]. Данная процедура позволяет отделить фракцию фенологликозидов, несорбируемых на данных носителях, от соединений, мешающих спектрофотометрическому определению (флавоноиды, танины и др.).

Для выявления селективности определения целевой группы соединений (фенологликозидов) нами было проведено исследование хроматографического профиля фракции несорбируемых компонентов после ТФЭ на образцах смеси веществ сравнения и растительных извлечениях. Исследования смеси веществ сравнения проводились с применением хроматографически чистых образцов арбутина, бергенина и галловой кислоты. Для симуляции реальной растительной пробы в смесь упомянутых соединений была введена хебулиновая кислота – эллаготаннин из плодов *Terminallia chebula* [22].

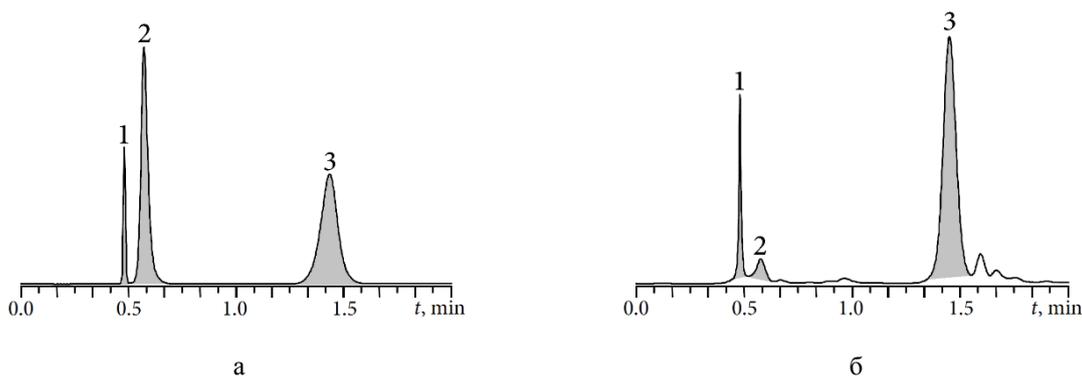


Рис. 1. Хроматограммы (МК-ВЭЖХ-УФ) смеси веществ сравнения (а; арбутин – 3 мг/мл, галловая кислота – 1 мг/мл, бергенин – 2 мг/мл) и спиртового экстракта из корневищ *B. crassifolia* (б) при 276 нм. Числами обозначено положение соединений: 1 – арбутин, 2 – галловая кислота, 3 – бергенин

Таблица 2. Валидационные параметры разработанной методики

Показатель	Соединение ^а		
	I	II	III
Уравнение регрессии: $Y = a \cdot X + b$			
a	$0.45 \cdot 10^{-2}$	$3.72 \cdot 10^{-2}$	$4.70 \cdot 10^{-2}$
b	$-1.59 \cdot 10^{-2}$	$1.87 \cdot 10^{-2}$	$-1.09 \cdot 10^{-2}$
Коэффициент детерминации (r^2)	0.9999	0.9998	0.9999
Стандартное отклонение (S_{yx})	$1.28 \cdot 10^{-2}$	$3.95 \cdot 10^{-2}$	$0.64 \cdot 10^{-2}$
Предел детектирования (LOD), мкг/мл	10	4	0.5
Предел количественного определения (LOQ), мкг/мл	30	10	1.5
Рабочий диапазон, мкг/мл	40–3000	10–2000	2–1000
Воспроизводимость, % ($n = 15$)	1.27	1.14	0.97
Вариабельность “день-в-день”, % ($n = 6$)	1.35	0.97	0.74
Вариабельность “день-через-день”, % ($n = 9$)	1.59	1.24	0.89
Стабильность, % ($n = 7$)	1.27	1.04	0.82

^а I – арбутин, II – бергенин, III – галловая кислота; ^б X – концентрация, мкг/мл; Y – площадь пика.

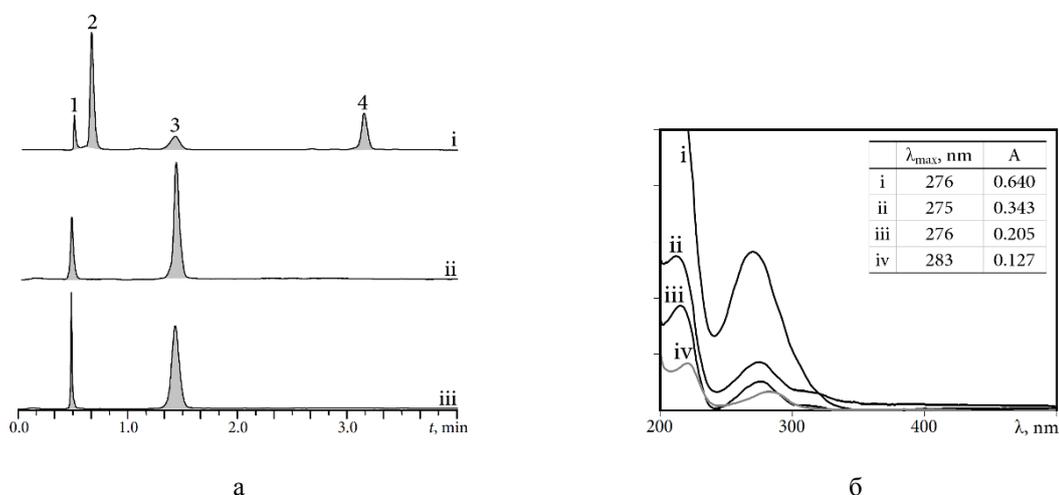


Рис. 2. Хроматограммы (МК-ВЭЖХ-УФ) смеси веществ сравнения (а) и спектры поглощения растворов (б) до (i) и после ТФЭ на Al_2O_3 (ii) и полиамиде (iii) при 276 нм. Числами обозначены соединения: 1 – арбутин, 2 – галловая кислота, 3 – бергенин, 4 – хебулиновая кислота. На врезке к (б) – положения максимумов поглощения (λ_{max}) и значения оптических плотностей растворов в λ_{max} (A). Концентрации соединений в смеси (i): арбутин 11,68 мкг/мл, галловая кислота 13,92 мкг/мл, бергенин 12,97 мкг/мл, хебулиновая кислота 10,72 мкг/мл. (iv) Спектр поглощения раствора арбутина с концентрацией 11,68 мкг/мл

В результате было показано, что применение ТФЭ как на Al_2O_3 , так и на полиамиде приводило к полному удалению галловой кислоты и хебулиновой кислоты из элюата; присутствие бергенина было отмечено в обоих элюатах (рис. 2).

Согласно данным количественного анализа элюатов, арбутин элюируется с Al_2O_3 почти полностью, в отличие от полиамида, который задерживает около 50% соединения (табл. 3). Следует также отметить высокую степень элюции бергенина – 99.0 и 80.6% соответственно для Al_2O_3 и полиамида.

Выявленные особенности элюирования отразились на спектрах поглощения элюатов: максимумы их спектров поглощения находились в области 275–276 нм, что было обусловлено влиянием высоких концентраций бергенина в пробах. Оптические плотности в максимумах поглощения элюатов были выше ожидаемого показателя, характерного для раствора арбутина соответствующей концентрации. Данное явление привело к значительному завышению расчетных показателей содержания арбутина – на 100.92 и 62.15% соответственно для Al_2O_3 и полиамида (табл. 4).

Анализ растительных образцов (отвары) показал, что применение спектрофотометрической методики после ТФЭ на Al_2O_3 приводит к завышению результатов на 9.62 и 122.22% соответственно для отваров из листьев и корней *B. crassifolia* (табл. 5). Столь сильные отличия в результатах обусловлены особенностями химического состава растительного сырья, заключающиеся в различном содержании бергенина, являющегося минорным компонентом листьев и доминирующим в корнях. Факт его ко-элюции с арбутином приводит к выраженному завышению результатов анализа для корней данного вида. Применение ТФЭ на полиамиде также не позволяет добиться правильных результатов анализа.

Таким образом, проведенные исследования показали, что методики количественного анализа фенологликозидов с применением ТФЭ-спектрофотометрии не могут быть охарактеризованы как селективные и точные. Присутствие примесных соединений, не относящихся к группе фенологликозидов (бергенин), приводит к искажению результатов. Следует отметить, что дополнительным преимуществом МК-ВЭЖХ-УФ является экспрессность. Процесс анализа реального образца растительного сырья с применением разработанной методики занимает около 26 мин, против 102 мин для ТФЭ-спектрофотометрии (табл. 6). В случае одновременного анализа серии из 10 образцов данный параметр составляет 8 и 17 мин соответственно для МК-ВЭЖХ-УФ и ТФЭ-спектрофотометрии.

Содержание арбутина, бергенина и галловой кислоты в B. crassifolia. Разработанная методика была использована для количественного анализа дикорастущих и коммерческих образцов сырья *B. crassifolia* (табл. 7). Содержание арбутина, бергенина и галловой кислоты в 6 образцах корневищ *B. crassifolia*, собранных в Республике Бурятия составило 38.58–45.97, 66.74–139.76 и 1.22–1.65 мг/г соответственно; для коммерческих партий сырья данные показатели были следующими: 20.57–41.37, 35.04–83.94 и 0.22–1.28 мг/г соответственно. Следует отметить значительное содержание бергенина в образцах из Бурятии, что указывает на высокое качество растительного сырья.

Помимо традиционного вида растительного сырья – корневищ *B. crassifolia*, особый интерес вызывает изучение листьев данного растения, которые также являются лекарственным сырьем. Следует отметить, что в процессе сушки, а также естественной вегетации, листья *B. crassifolia* могут претерпевать определенные ферментативные изменения, приводящие к изменению внешнего вида сырья. В результате происходит формирование различных «фракций» листьев, отличающихся по цвету – зеленые, красные и бурые. Химические отличия этих «фракций» сырья были изучены методом ВЭЖХ.

Таблица 3. Содержание арбутина, бергенина, галловой кислоты и хебулиновой кислоты в элюатах после ТФЭ с Al_2O_3 и полиамида

Соединение	Должно быть		Найдено после ТФЭ- Al_2O_3		Найдено после ТФЭ-полиамид	
	мкг/мл	%	мкг/мл	Δ , %	мкг/мл	Δ , %
Арбутин	11.68	100	11.41±0.21	-2.31	5.87±0.11	-48.74
Бергенин	12.97	100	12.84±0.26	-1.00	10.45±0.21	-19.42
Галловая кислота	13.92	100	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
Хебулиновая кислота	10.72	100	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00

Таблица 4. Содержание арбутина в смеси веществ сравнения, определенное методом СФМ

Сорбент	Арбутина в пробе, мкг	Найдено арбутина, мкг	Δ , %
Al_2O_3	292.00	586.68±10.56	+100.92
Полиамид	292.00	473.49± 8.04	+62.15

Таблица 5. Результаты анализа арбутина и суммарного содержания фенологликозидов методами ВЭЖХ и СФМ в отварах из растительного сырья

Объект	Арбутин, мг/мл (ВЭЖХ)	Фенологликозиды, мг/мл (СФМ)			
		Al ₂ O ₃		Полиамид	
		мг/мл	Δ, %	мг/мл	Δ, %
Отвар листьев <i>B. crassifolia</i>	4.26±0.07	4.67±0.08	+9.62	2.26±0.04	-46.94
Отвар корней <i>B. crassifolia</i>	2.79±0.05	6.20±0.11	+122.22	3.92±0.07	+40.50

Таблица 6. Временные затраты на проведение анализа методом ВЭЖХ и спектрофотометрии (СФМ)

Процедура	ВЭЖХ		СФМ	
	n = 1	n = 10	n = 1	n = 10
Взятие навески, мин	1	10	1	10
Экстракция, мин	20	20	60	60
ТФЭ-экстракция, мин	0	0	40	90
Детекция аналитического сигнала, мин	5	50	1	10
Общее время анализа, мин	26	80	102	170
Время анализа 1 образца, мин/образец	26	8	102	17

Таблица 7. Содержание арбутина (I), бергенина (II) и галловой кислоты (III) в дикорастущих и коммерческих образцах *B. crassifolia*, мг/г (±SD)

Растительное сырье, ценопопуляция, дата (номер партии)	I	II	III
Дикорастущие образцы			
Республика Бурятия			
Корневища, ЦП-1, 15.VII.2015	45.97±0.78	77.05±1.61	1.54±0.02
Корневища, ЦП-2, 10.VIII.2015	39.34±0.68	139.76±2.65	1.42±0.02
Корневища, ЦП-3, 28.VII.2015	40.75±0.69	80.38±1.69	1.53±0.02
Корневища, ЦП-4, 31.VII.2015	39.90±0.67	66.74±1.20	1.48±0.02
Корневища, ЦП-5, 28.VIII.2015	44.77±0.80	86.93±1.71	1.65±0.03
Корневища, ЦП-6, 28.VIII.2015	38.58±0.73	79.24±1.66	1.22±0.02
Листья зеленые, ЦП-6, 28.VIII.2015	84.64±1.52	4.12±0.08	7.33±0.12
Листья красные, ЦП-6, 28.VIII.2015	102.02±2.04	0.00±0.00	6.30±0.10
Листья бурые, ЦП-6, 28.VIII.2015	30.19±0.54	0.00±0.00	1.23±0.02
Листья черные, ЦП-6, 28.X.2015	28.30±0.48	0.00±0.00	1.09±0.02
Цветоносы, ЦП-6, 11.VI.2015	48.40±0.87	6.68±0.14	1.58±0.02
Цветки, ЦП-6, 11.VI.2015	42.15±0.78	16.89±0.35	0.76±0.01
Коммерческие образцы (корневища)			
ОАО Красногорсклексредства, 30715	36.18±0.68	83.94±1.76	1.28±0.02
ООО Алтай-Фарм, 101214	20.57±0.37	35.04±0.70	0.22±0.00
ИП Емельянов Е.А., 230514	41.37±0.71	36.21±0.75	0.98±0.01

Проведено исследование так называемых «черных» листьев, образующихся после опадания и представляющих собой продукт естественной ферментации сырья. В результате было установлено, что процесс постепенного изменения цвета листьев приводит к значительным изменениям в химическом составе. Наиболее выраженным процессом является деградация бергенина, присутствие которого отмечено только в зеленых листьях. Концентрация галловой кислоты постепенно снижается от зеленых к черным листьям – от 7.33 до 1.09 мг/г. Для арбутина характерно временное «накопление» в стадии формирования красных листьев (102.02 мг/г) с последующим падением содержания до 28.30 мг/г. Несмотря на то, что определение природы данного явления требует дополнительных исследований, на данном этапе можно утверждать, что листья *B. crassifolia* в различной «цветовой» фазе характеризуются определенным набором фитоконпонентов, что может отразиться на их биологической активности. Ранее в результате сравнительных исследований зеленых, красных и бурых листьев *B. crassifolia* была отмечена другая тенденция к изменению их химического состава [14]. Содержание арбутина снижалось от зеленых к бурым листьям, а для красных листьев было отмечено накопление бергенина и галловой кислоты. Мы не можем прокомментировать причину подобных отличий, так как авторами [14] не были подробно описаны условия получения растительного материала для анализа.

Дополнительно был проведен количественный анализ цветоносов и цветков *B. crassifolia* и показано, что они отличаются высоким содержанием арбутина – 48.40 и 42.15 мг/г соответственно. Более того, в цветках *B. crassifolia* выявлено высокое содержание бергенина (16.89 мг/г), что позволяет рекомендовать данный вид растительного сырья в качестве объекта дополнительных фармакологических исследований.

Заключение

Учитывая полученные сведения об особенностях состава корней *B. crassifolia*, нами предложено изменить направление количественной стандартизации данного вида растительного сырья. Высокое содержание арбутина и бергенина, которые являются соединениями с определенной и выраженной биологической активностью, позволяют рекомендовать данные компоненты в качестве маркеров для *B. crassifolia*, взамен безликой характеристики по содержанию «дубильных веществ». Методика анализа последних не может быть использована в условиях современной практики фармакопейного анализа, стремящейся к международным нормам GLP. Анализ «дубильных веществ», предложенный Национальной Фармакопеей, до сих пор использует неселективный метод Левентала (перманганатометрическое титрование), не учитывающий особенности химического строения соединений, входящих в состав растительной ткани [23]. На недостатки данного метода неоднократно указывали исследователи самых разных направлений, однако он до сих пор остается единственным способом оценки качества танинсодержащего растительного сырья.

Отдельно хотелось бы отметить возможность использования нового растительного сырья – цветков бадана толстолистного, характеризующихся высоким содержанием арбутина и бергенина. После осуществления дополнительных фармакологических исследований они могут быть использованы в качестве источников упомянутых соединений.

Выводы

1. Разработана методика с применением микроколоночной ВЭЖХ-УФ для быстрого количественного анализа арбутина, бергенина и галловой кислоты в *Bergenia crassifolia*. Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительных метрологических характеристиках разработанной методики.

2. Методики количественного анализа фенологликозидов с применением ТФЭ-спектрофотометрии не могут быть охарактеризованы как селективные и точные. Присутствие примесных соединений, не относящихся к группе фенологликозидов (бергенин), приводит к искажению результатов.

3. Разработанная методика была использована для количественного анализа дикорастущих и коммерческих образцов сырья *B. crassifolia*. Содержание арбутина, бергенина и галловой кислоты в 6 образцах корневищ *B. crassifolia*, собранных в Республике Бурятия, составило 38.58–45.97, 66.74–139.76 и 1.22–1.65 мг/г соответственно; для коммерческих партий сырья данные показатели были следующими: 20.57–41.37, 35.04–83.94 и 0.22–1.28 мг/г соответственно.

Список литературы

1. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. СПб.; М., 2009. 513 с.
2. Флора Центральной Сибири. Новосибирск, 1979. Т. 1. 536 с.
3. Чжуд-ши: Канон тибетской медицины. М., 2001. 766 с.
4. Ибрагимов В.С. Китайская медицина. Методы диагностики и лечения. Лекарственные средства. Чжень-цзю терапия. М., 1994. С. 426–429.
5. Хайдав Б. Лекарственные растения в монгольской медицине. Улан-Батор, 1985. С. 67.
6. Атлас лекарственных растений СССР. М., 1962. 710 с.
7. Лекарственные сырьевые ресурсы Иркутской области и их врачебное применение. Иркутск, 1947. Вып. 1. С. 29.
8. Лукомский И.Г. Терапевтическая стоматология. М., 1956. 496 с.
9. Шантанова Л.Н., Лубсандоржиева П.Б., Бодоев А.В., Николаев С.М. Противовоспалительные и антиоксидантные свойства сухого экстракта из черных листьев *Bergenia crassifolia* (Saxifragaceae) // Растительные ресурсы. 2008. Т. 44, вып. 3. С. 109–117.
10. Лубсандоржиева П.Б., Цыренжапова О.Д., Бадмаева Н.К., Ракшаина М.Ц., Самбуева З.Г., Даргаева Т.Д. Химико-фармакогносическая характеристика и анатомические особенности листьев *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. // Сохранение биологического разнообразия в Байкальском регионе: проблемы, подходы, практика. Улан-Удэ, 1996. Т. 2. С. 133–134.

11. Макаров В.Г., Макарова М.Н., Александрова А.Е., Селезнёва А.И., Тесакова С.В. Изучение антиоксидантной и антигипоксической активности экстрактов бадана толстолистного // Материалы 9-го Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения «Фитофарм 2005» и конф. молодых ученых Европейского фитохимического общества «Растения и здоровье». СПб., 2005. С. 94–102.
12. Рыжикова М.А., Рыжикова В.О. Применение хемилюминесцентного метода для исследования антиоксидантной активности водных экстрактов из растительного сырья // Вопросы питания. 2006. Т. 75. №2. С. 22–29.
13. Shilova I.V., Pisareva S.I., Krasnov E.A., Bruzhes M.A., Pyak A.I. Antioxidant properties of *Bergenia crassifolia* extract // Pharm. Chem. J. 2006. Vol. 40. Pp. 620–623. DOI: 10.1007/s11094-006-0206-4.
14. Pozharitskaya O., Ivanova S., Shikov A., Makarov V., Galambosi B. Separation and evaluation of free radical-scavenging activity of phenol components of green, brown, and black leaves of *Bergenia crassifolia* by using HPTLC-DPPH method // J. Sep. Sci. 2007. Vol. 30. Pp. 2447–2451. DOI: 10.1002/jssc.200700178.
15. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarova M.N., Makarov V.G., Wagner H. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch – pharmacology and phytochemistry // Phytomedicine. 2014. Vol. 21. Pp. 1534–1542. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.06.009.
16. Boros B., Jakabova S., Madarasz T., Molnar R., Galambosi B., Kilar F., Felinger A., Farkas A. Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin, and gallic acid in leaves of different *Bergenia* species // Chromatographia. 2014. Vol. 77. Pp. 1129–1135. DOI: 10.1007/s10337-014-2624-x.
17. Заугольнова Л.Б., Денисова Л.В., Никитин С.В. Подходы к оценке состояния ценопопуляций растений // Бюлл. Моск. общ. испыт. природы, отдел биол. 1993. Т. 98. №5. С. 100–108.
18. Ценопопуляции растений (очерки популяционной биологии). М., 1988. 184 с.
19. Yuksel N., Kanik A.E., Baykara T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods // Int. J. Pharm. 2000. Vol. 209. Pp. 57–67. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00554-8.
20. Lubsandorzhevia P.B., Zhigzhitov B.S., Dargaeva T.D., Bazarova Z.G., Nagaslaeva L.A. Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch // Pharm. Chem. J. 2000. Vol. 34. Pp. 261–264. DOI: 10.1007/BF02524636.
21. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Vasilieva A.G., Fedorov I.A. LC-MS profile, gastrointestinal and gut microbiota stability and antioxidant activity of *Rhodiola rosea* herb metabolites: A comparative study with subterranean organs // Antioxidants. 2020. Vol. 9. 526. DOI: 10.3390/antiox9060526.
22. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K. In vitro bioaccessibility, human gut microbiota metabolites and hepatoprotective potential of chebulic ellagitannins: a case of Padma Hepaten formulation // Nutrients. 2015. Vol. 7. Pp. 8735–8749. DOI: 10.3390/nu7105406.
23. ФС.2.5.0004.15. Бадана толстолистного корневища. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Т. 4.

Поступила в редакцию 28 декабря 2020 г.

После переработки 9 февраля 2021 г.

Принята к публикации 18 марта 2021 г.

Для цитирования: Шишмарева Т.М., Шишмарев В.М., Оленников Д.Н. Применение микроколоночной ВЭЖХ-УФ для быстрого количественного анализа арбутина, бергенина и галловой кислоты в *Bergenia crassifolia* // Химия растительного сырья. 2021. №3. С. 171–180. DOI: 10.14258/jcrpm.2021039099.

Shishmareva T.M.*, Shishmarev V.M., Olennikov D.N. APPLICATION OF MICROCOLUMN HPLC-UV FOR RAPID QUANTITATIVE ANALYSIS OF ARBUTIN, BERGENIN AND GALLIC ACID IN *BERGENIA CRASSIFOLIA*

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, ul. Sakh'yanovoy 6, Ulan-Ude, 670047 (Russia), e-mail: shishmarevatm@mail.ru

This work is aimed at the development of a microcolumn HPLC-UV assay for the rapid quantitative analysis of arbutin, bergenin, and gallic acid in *Bergenia crassifolia*. The results obtained indicate appropriate metrological parameters of the developed assay. It was found that the known methods of quantitative analysis of phenolic glycosides using SPE-spectrophotometry cannot be characterized as selective and accurate, due to the fact that the presences of the impurity compounds that do not belong to the group of phenolic glycosides negatively influenced the results. The developed assay was used for quantitative analysis of wild and commercial samples of *B. crassifolia* raw material. It was found that the content of arbutin, bergenin, and gallic acid in samples of *B. crassifolia* rhizomes collected in the Republic of Buryatia was 38.58–45.97, 66.74–139.76 and 1.22–1.65 mg/g, respectively, and for commercial batches of raw materials 20.57–41.37, 35.04–83.94 and 0.22–1.28 mg/g, respectively. It was found that the process of gradual enzymatic changes in the color of *B. crassifolia* leaves (green, red, black) leads to significant changes in the chemical composition. The most pronounced phenomenon is the degradation of bergenin, the presence of which is noted only in green leaves. The concentration of gallic acid is reduced in black leaves. Arbutin is characterized by an increased content in red leaves (102.02 mg/g). Additionally, a quantitative analysis of the peduncles and flowers of *B. crassifolia* was realized, and it was shown that they are distinguished by a high content of arbutin 48.40 and 42.15 mg/g, respectively, as well as bergenin in flowers (16.89 mg/g). The study demonstrated that the developed technique can be applied for a quick, selective, and accurate quantitative analysis of three compounds in various organs of *B. crassifolia*.

Keywords: *Bergenia crassifolia*, Saxifragaceae, arbutin, bergenin, gallic acid, microcolumn HPLC-UV.

References

1. *Rastitel'nye Resursy Rossii: Dikorastushchie Tsvetkovye Rasteniya, ih Komponentnyj Sostav i Biologicheskaya Aktivnost. Vol. 2. Semejstva Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae* [Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. Vol. 2. Families Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae]. St. Petersburg; Moscow, 2009, 513 p. (in Russ.).
2. *Flora Centralnoj Sibiri* [Flora of Central Siberia]. Novosibirsk, 1979, vol. 1, 536 p. (in Russ.).
3. *Chzhud-shi: Kanon Tibetskoj Mediciny* [Chzhud-shi: The Canon of Tibetan Medicine]. Moscow, 2001, 766 p. (in Russ.).
4. Ibragimova V.S. *Kitajskaya Medicina. Metody Diagnostiki i Lecheniya. Lekarstvennye Sredstva. Chzhen'-czyu Terapiya* [Chinese medicine. Diagnostic and treatment methods. Medicines. Zhen-chiu therapy]. Moscow, 1994, pp. 426–429. (in Russ.).
5. Haidav B. *Lekarstvennye Rasteniya v Mongolskoj Medicine* [Medicinal plants in Mongolian medicine]. Ulan Bator, 1985, p. 67. (in Russ.).
6. *Atlas Lekarstvennyh Rastenij SSSR* [Atlas of medicinal plants of the USSR]. Moscow, 1962, 710 p. (in Russ.).
7. *Lekarstvennye Syrevye Resursy Irkutskoj Oblasti i ih Vrachebnoe Primenenie* [Medicinal raw materials of the Irkutsk region and their medical use]. Irkutsk, 1947, vol. 1, p. 29. (in Russ.).
8. Lukomsky I.G. *Terapevticheskaya stomatologiya* [Therapeutic dentistry]. Moscow, 1956, 496 p. (in Russ.).
9. Shantanova L.N., Lubsandorzheva P.B., Bodoev A.V., Nikolaev S.M. *Rastitel'nye resursy*, 2008, vol. 44, no. 3, pp. 109–117. (in Russ.).
10. Lubsandorzheva P.B., Tsyrenzhapova O.D., Badmaeva N.K., Rakshaina M.Ts., Sambueva Z.G., Dargaeva T.D. *Sohraneniye Biologicheskogo Raznoobrazia v Baikalskom Regione: Problemy, Podhody, Praktika* [Conservation of biological diversity in the Baikal region: Problems, approaches, practice]. Ulan-Ude, 1996, vol. 2, pp. 133–134. (in Russ.).
11. Makarov V.G., Makarova M.N., Aleksandrova A.E., Selezneva A.I., Tesakova S.V. *Aktualnye problemy sozdaniya novyh lekarstvennyh preparatov prirodnoho proiskhozhdeniya «Fitofarm 2005»* [Actual problems of creating the new medicinal products of natural origin «Fitofarm 2005»]. St. Petersburg, 2005, pp. 94–102. (in Russ.).
12. Ryzhikova M.A., Ryzhikova V.O. *Voprosy Pitaniya*, 2006, vol. 75, no. 2, pp. 22–29. (in Russ.).
13. Shilova I.V., Pisareva S.I., Krasnov E.A., Bruzhes M.A., Pyak A.I. *Pharm. Chem. J.*, 2006, vol. 40, pp. 620–623. DOI: 10.1007/s11094-006-0206-4.
14. Pozharitskaya O., Ivanova S., Shikov A., Makarov V., Galambosi B. *J. Sep. Sci.*, 2007, vol. 30, no. 15, pp. 2447–2451. DOI: 10.1002/jssc.200700178.
15. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarova M.N., Makarov V.G., Wagner H. *Phytomedicine*, 2014, vol. 21, pp. 1534–1542. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.06.009.
16. Boros B., Jakabova S., Madarasz T., Molnar R., Galambosi B., Kilar F., Felinger A., Farkas A. *Chromatographia*, 2014, vol. 77, pp. 1129–1135. DOI: 10.1007/s10337-014-2624-x.
17. Zaugolnova L.B., Denisova L.V., Nikitin S.V. *Bulleten Moskovskogo Obschestva Ispitateley Prirody*, 1993, vol. 98, no. 5, pp. 100–108. (in Russ.).
18. *Tsenopopulyacii Rastenij (Ocherki Populyatsionnoj Biologii)* [Plant cenopopulations (Essays on population biology)]. Moscow, 1988, 184 p. (in Russ.).
19. Yuksel N., Kanik A.E., Baykara T. *Int. J. Pharm.*, 2000, vol. 209, pp. 57–67. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00554-8.

* Corresponding author.

20. Lubsandorzheva P.B., Zhigzhitov B.S., Dargaeva T.D., Bazarova Z.G., Nagaslaeva L.A. *Pharm. Chem. J.*, 2000, vol. 34, pp. 261–264. DOI: 10.1007/BF02524636.
21. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Vasilieva A.G., Fedorov I.A. *Antioxidants*, 2020, vol. 9, 526. DOI: 10.3390/antiox9060526.
22. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K. *Nutrients*, 2015, vol. 7, pp. 8735–8749. DOI: 10.3390/nu7105406.
23. *FS.2.5.0004.15. Badana tolstolistnogo kornevischcha. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izd* [Pharmacopoeia monograph. 2.5.0004.15. *Bergenia crassifolia* rhizomes. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. 4. (in Russ.).

Received December 28, 2020

Revised February 9, 2021

Accepted March 18, 2021

For citing: Shishmareva T.M., Shishmarev V.M., Olennikov D.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 3, pp. 171–180. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021039099.