

Научная статья
УДК 615.074
doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.046

ПОИСК И ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ ГЛИКОЗИДОВ ГИДРОХИНОНА В ЭКСТРАКТЕ ЛИСТЬЕВ БРУСНИКИ *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L. МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**О. В. Матусевич¹, Л. Н. Середа², К. А. Александров³, Н. В. Кузьмина⁴,
Е. М. Голинец⁵, Н. С. Цветов⁶**

^{1,3–5}Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, Россия

^{1,2,6}Лаборатория медицинских и биологических технологий Центра наноматериаловедения
Кольского научного центра РАН, Апатиты, Россия

⁶Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева
Кольского научного центра РАН, Апатиты, Россия

¹oleg.matusevich.office@gmail.com

²l.sereda@ksc.ru

⁶n.tsvetov@ksc.ru

Аннотация

Брусника обыкновенная является вечнозелёным представителем семейства вересковых. Среди простых фенольных гликозидов в фотосинтезирующих органах представителей семейства вересковых доминирует арбутин — гидрохинон-β-D-глюкопиранозид, который может быть использован в качестве антисептика для лечения инфекций мочевыводящих путей. Его бактерицидная активность, вероятно, обусловлена гидрохиноном, высвобождаемым из арбутина под действием β-глюкозидазы. Цель работы — поиск и изучение строения гликозидов гидрохинона в силилированном экстракте листьев брусники с помощью газовой хроматомасс-спектрометрии. Были обнаружены три соединения: арбутин, ацетиларбутин и неидентифицированный гликозид. Полученные данные могут быть полезны как для оптимизации методик стандартизации листьев брусники в качестве лекарственного сырья, так и для понимания процессов биосинтеза в растении, а также для разработки новых биологически активных соединений на базе полученных знаний.

Ключевые слова:

арбутин, листья брусники, гликозиды гидрохинона

Благодарности:

статья выполнена при поддержке федерального бюджета по теме государственного задания Кольского научного центра РАН № FMEZ-2023-0012.

Финансирование:

государственное задание по теме НИР № FMEZ-2023-0012.

Для цитирования:

Поиск и изучение строения гликозидов гидрохинона в экстракте листьев брусники *Vaccinium vitis-idaea* L. методом газовой хроматомасс-спектрометрии / О. В. Матусевич [и др.] // Труды Кольского научного центра РАН. Серия: Технические науки. 2024. Т. 15, № 1. С. 282–288. doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.046.

Original article

SEARCHING AND STUDYING OF THE STRUCTURE OF HYDROCQUINONE GLYCOSIDES IN THE EXTRACT OF LINGONBERRY LEAVES *VACCINIA VITIS-IDEA* L. BY GAS CHROMATO-MASS SPECTROMETRY METHOD

**O. V. Matusevich¹, L. N. Sereda², K. A. Alexandrov³, N. V. Kuzmina⁴,
E. M. Golinets⁵, N. S. Tsvetov⁶**

^{1,3–5}St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia,
Saint Petersburg, Russia

^{1,2,6}Laboratory of Medical and Biological Technologies, Nanomaterial Research Centre of the Kola Science Centre
of RAS, Apatity, Russia

⁶I. V. Tananaev Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Raw Materials
of the Kola Science Centre of RAS, Apatity, Russia

¹oleg.matusevich.office@gmail.com

²l.sereda@ksc.ru

⁶n.tsvetov@ksc.ru

Abstract

Lingonberry is an evergreen representative of the heather family. Among the simple phenolic glycosides in the photosynthetic organs of representatives of the heather family, arbutin- hydroquinone- β -D-glucopyranoside dominates, which can be used as an antiseptic for the treatment of urinary tract infections. Its bactericidal activity is probably due to hydroquinone released from arbutin under the action of β -glucosidase. The aim of the work is to search for and study the structure of hydroquinone glycosides in silylated cranberry leaf extract using gas chromatography mass spectrometry.

Three compounds were found – arbutin, acetyl arbutin and unidentified glycoside. The data obtained can be useful both for optimizing the methods of standardization of lingonberry leaves as medicinal raw materials, and for understanding the processes of biosynthesis in the plant, as well as for developing new biologically active compounds based on the knowledge gained.

Keywords:

arbutin, lingonberry leaves, hydroquinone glycosides

Acknowledgements:

the article was carried out with the support of the federal budget on the topic of the state assignment of the Kola Science Centre of RAS No. FMEZ-2023-0012.

Funding:

state assignment on the topic of research No. FMEZ-2023-0012.

For citation:

Searching and studying of the structure of hydroquinone glycosides in the extract of lingonberry leaves *Vaccinium vitis-idaea* L. by gas chromat-mass spectrometry method / O. V. Matusevich [et al.] // Transactions of the Kola Science Centre of RAS. Series: Engineering Sciences. 2024. Vol. 15, No. 1. P. 282–288. doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.046.

Введение

Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) семейства вересковых (Ericaceae Juss.) является вечнозелёным ягодным кустарничком, распространённым в естественных сообществах от тундровой зоны до подзоны средней тайги [1]. К настоящему времени проведено достаточное количество исследований, позволяющих подробно охарактеризовать фитохимический профиль листьев растений брусники, основу которого составляют фенольные кислоты, флавонолы, процианидины и тритерпеноиды, обуславливающие ряд фармацевтических активностей, таких как диуретические, гепатопротекторные, противоопухолевые, противовоспалительные, противомикробные и т. д. [2, 3]. Поскольку фенольные соединения обладают мощной антиоксидантной активностью, в последние годы в центре внимания находится идентификация отдельных соединений в листьях, ответственных за фармакологическую активность [4].

Одним из характеристичных соединений в листьях многих представителей семейства Вересковые в общем и в листьях растений брусники в частности присутствует арбутин — гидрохинон- β -D-глюкопиранозид, который синтезируется вследствие воздействия инфекционных заболеваний или стрессовых факторов окружающей среды [4–6], может достигать 4 % [7] и является соединением, используемым для стандартизации листьев брусники обыкновенной, согласно XIV изданию Государственной фармакопеи [8]. Арбутин может быть использован в качестве антисептика для лечения инфекций мочевыводящих путей [4], а также в качестве отбеливающего средства для кожи в косметике из-за его ингибирующего действия на активность тирозиназы [9]. Его бактерицидная активность, вероятно, обусловлена гидрохиноном, высвобождаемым из арбутина под действием β -глюкозидазы [5, 10]. В то же время возможно присутствие и других производных гидрохинона, которые также могут проявлять биологическую активность. Однако на данный момент в литературе недостаточно данных касательно детальной идентификации возможных производных гидрохинона.

Растительные фенольные соединения и их гликозиды обычно анализируют ВЭЖХ с использованием УФ- или масс-спектрометрического детектора, что связано, в частности, с отсутствием необходимости дериватизации этих соединений [11]. Однако существуют методики определения арбутина в растениях семейства вересковых с помощью ГХ-МС [4].

Целью работы, с учётом всего вышеперечисленного, стал поиск гликозидов гидрохинона в экстракте листьев брусники.

Материалы и методы

Растительное сырье. Объектом исследования служили фотосинтезирующие органы брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.), собранные в первую декаду сентября 2022 г. [12] в Мончегорском районе Мурманской области. Регистрация фенологических фаз производилась по методике [13] с последующим переводом в международную шкалу ВВСН [11]. Подготовка растительного материала включала в себя сушку на открытом воздухе, измельчение непосредственно перед проведением исследования и ситование.

Экстрагирование проводилось методом ультразвуковой экстракции в предварительно термостатированной до 57 °С ультразвуковой ванне VBS-3DP (Велитек, Россия) в течение 30 мин. Навеска измельчённого до величины фракций, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, и отситованного растительного материала смешивалась с 250 мл водно-спиртовой смеси с содержанием этанола 50 об. %. Полученные экстракты фильтровали с помощью вакуумного насоса V-i120SV (Value, Россия) и выпаривали роторным испарителем ИР-1М3 (ЛЮИП, Россия).

Химические реактивы. Аналитический стандарт арбутина (98 %, Sigma-Aldrich, Германия), силилирующий реагент N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамид + 1 % триметилхлорсилана (х. ч., ООО «Хевел Технолоджи»), пиридин (99,9 %, ООО «Хромлаб»), этиловый спирт (РФК, Россия).

Хроматомасс-спектрометрический анализ. Навеску сухого образца массой $10 \pm 0,3$ мг помещали в стеклянную вials и добавляли 250 мкл пиридина и 250 мкл силилирующего реагента — смеси N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамида с 1 % триметилхлорсилана. Тщательно укупоренную вials выдерживали в термостате при 90 °С в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры полученный раствор использовали для хроматографирования.

Анализ проводился на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5977B GC/MSD (США), способ ионизации — электронный удар, энергия электронов — 70 эВ. Масс-хроматограммы регистрировались по полному ионному току в диапазоне масс m/z от 50 до 1050 а. е. м. Обработку масс-спектров производили в программном пакете NIST2017 (США). Для разделения веществ использовали капиллярную колонку VF-5ms GC (Varian, США): 50 м, 0,25 мм, 0,25 μ м.

Условия хроматографирования: скорость потока газа-носителя (гелия) — 1 мл/мин, температура инжектора и трансферлайна — 300 °С, деление потока (сплит) — 1:20, начало регистрации хроматограммы — с 6-й мин. Температурная программа: 70–320 °С при скорости нагрева 6 °С/мин, выдержка при температуре 320 °С — 120 мин; объём пробы — 1 мкл.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы с помощью программы MS Interpreter (входит в комплект NIST) были спрогнозированы основные направления фрагментации молекулы арбутина (рис. 1).

Для поиска на хроматограмме пиков, отвечающих гликозидам арбутина, была построена хроматограмма по иону m/z 182, что позволило выявить три соединения (табл.).

Масс-спектры веществ в порядке их выхода из колонки

Номер пика	t_R , мин	Масс-спектр, m/z (I, %)
1	35,59	73 (100), 103 (44), 117 (25), 129 (48), 133 (19), 147 (82), 169 (42), 182 (20), 191 (28), 205 (21), 217 (88), 231 (20), 239 (22), 243 (42), 254 (93), 271 (45), 305 (10), 319 (21), 331 (16), 361 (87), 450 (50), 527 (3)
2	36,30	73 (100), 103 (35), 117 (67), 129 (38), 133 (13), 147 (41), 169 (80), 182 (24), 191 (14), 205 (4), 217 (17), 231 (13), 239 (17), 243 (45), 254 (100), 271 (100), 289 (21), 305 (5), 331 (10), 361 (46), 437 (8), 527 (2)
3	36,51	73 (100), 103 (25), 117 (38), 129 (65), 133 (25), 147 (80), 155 (27), 157 (40), 167(27), 169 (31), 182 (36), 191 (22), 199 (31), 205 (17), 217 (100), 231 (11), 239 (25), 243 (42), 254 (100), 271 (100), 289 (6), 305 (6), 331 (23), 361 (62), 420 (100), 437 (6), 527 (1), 587 (4)

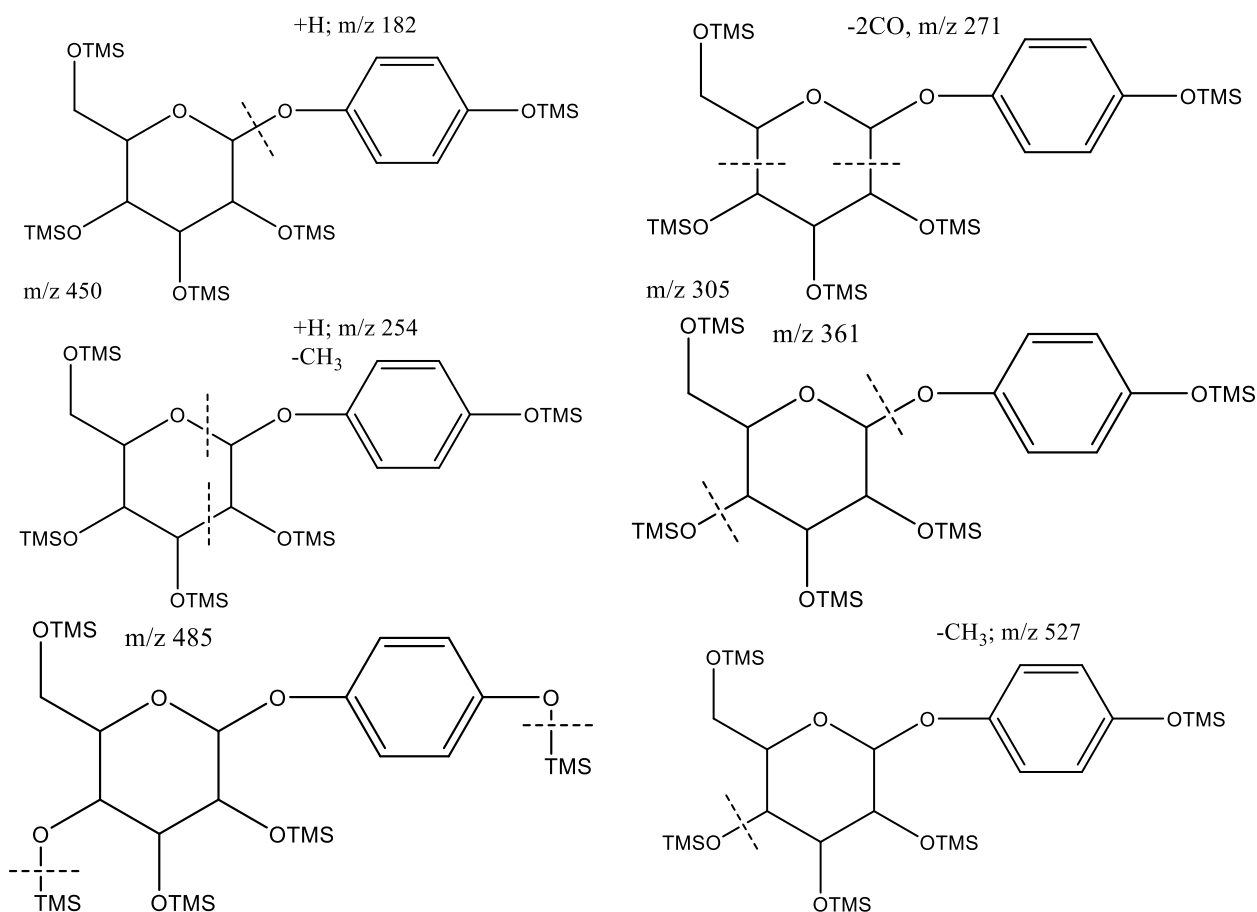


Рис. 1. Направления фрагментации молекулы арбутина (TMS — триметилсилил-)

С использованием стандартного соединения по соответствию масс-спектров и времени выхода компонентов удалось идентифицировать соответствующее пику 1 вещество — арбутин.

Все перечисленные соединения содержат множество общих ионов, в частности, с m/z 182, 254, 271, 361 и 527. Группы пиков молекулярных ионов во всех случаях отсутствуют. Ион с m/z 182 образуется при отщеплении от молекулы гликозида ТМС-производного гидрохинона, а интенсивные сигналы ионов с m/z 254 и 271 свидетельствуют о наличии ТМС-производных гидроксильных групп в углеводном остатке в положениях 2 и 6. Ион с m/z 361 во всех трёх соединениях говорит о наличии остатка гексозы с ТМС-связанными гидроксильными группами в положениях 2, 3 и 6. Общий для этих соединений ион с m/z 527 образуется вследствие отрыва одной метильной группы от атома кремния и TMSO/OH в положении 4.

Все вышеизложенное позволяет предположить, что соединения 2 и 3 являются производными арбутина, содержащими дополнительные группы, связанные через атом кислорода гидроксильной группы в положении 4 углеводной части.

Вещество 1 (арбутин) имеет интенсивный сигнал иона с m/z 450 (67), в то время как соединение 3 ион с m/z 420 (97), а соединение 2 — низкоинтенсивный ион с m/z 437 (8). Поскольку ион с m/z 450, образовываясь при отщеплении гидрохинона от арбутина, соответствовал остатку глюкозы с четырьмя силилированными гидроксильными группами, а также если принять во внимание вышеизложенные рассуждения, то можно предположить, что соединение 3 изначально содержало остаток уксусной кислоты в положении 4 остатка глюкозы. $(450 - 73 (\text{TMS})) = 377 + 43 = 420$ а. е. м.). В отношении соединения 2 аналогичные размышления не привели к пониманию его структуры.

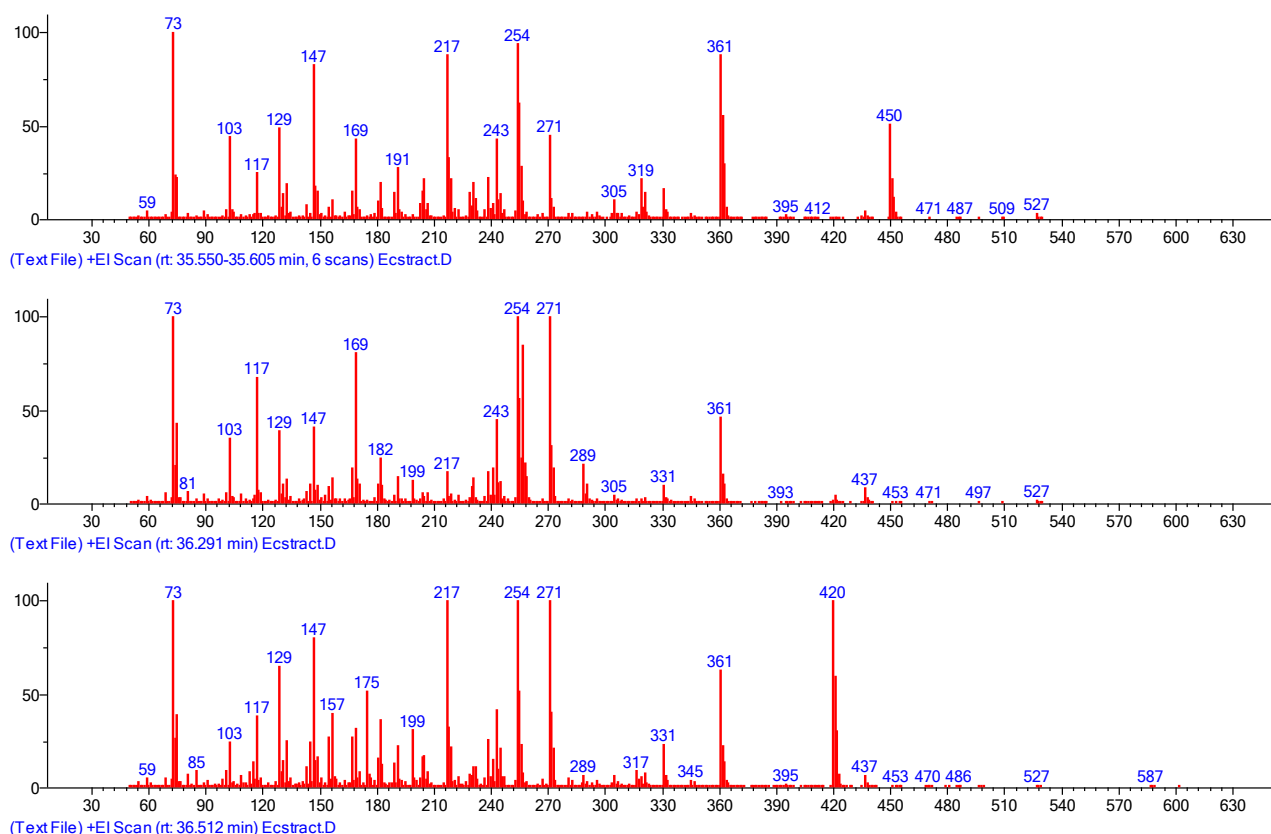


Рис. 2. Масс-спектры, соответствующие соединениям 1–3 (сверху вниз)

Выводы

В настоящей работе представлены результаты поиска производных гидрохинона в бруснике обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.), произрастающей в Мурманской области. Хроматомасс-спектрометрическое исследование силилированного экстракта листьев брусники позволило выявить в его составе три гликозида гидрохинона: арбутин, предположительно ацетат арбутина, и ещё один неидентифицированный гликозид. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации стандартизации листьев брусники как лекарственного сырья, для лучшего понимания биосинтеза в растении, а также для разработки на основе фенольных соединений веществ-кандидатов для проведения доклинических испытаний.

Список источников

1. Exploring *Vaccinium vitis-idaea* L. as a potential source of therapeutic agents: antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and fractions / G. Vilckickyte [et al.] // J. Ethnopharmacol. Elsevier B.V., 2022. Vol. 292, March. P. 115207.
2. Fractionation and Characterization of Triterpenoids from *Vaccinium vitis-idaea* L. Cuticular Waxes and Their Potential as Anticancer Agents / G. Vilckickyte [et al.] // Antioxidants. 2023. Vol. 12, No. 2.
3. Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry = Kvantitativna analiza arbutina i hidrokinona u listovima obične planike (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) plins / K. Jurica [et al.] // Arch. Ind. Hyg. Toxicol. 2015. Vol. 66, No. 3. P. 197–202.
4. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria / M. Blaut [et al.] // Food Chem. Toxicol. 2006. Vol. 44, No. 11. P. 1940–1947.

5. Stalikas C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids // J. Sep. Sci. 2007. Vol. 30, No. 18. P. 3268–3295.
6. Vaccinium vitis-idaea L.: Chemical contents, pharmacological activities / A. A. Shamilov [et al.] // Pharm. Sci. 2020. Vol. 26, No. 4. P. 344–362.
7. Брусники обыкновенной листья: [фармакопейная статья] (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 № 749) // Государственная фармакопея Российской Федерации. М., 2018. XIV изд. Т. IV.
8. A gas chromatography-mass spectrometric method to determine skin-whitening agents in cosmetic products / A. Chisvert [et al.] // Talanta. 2010. Vol. 81, No. 1–2. P. 530–536.
9. Hildebrand D. C., Powell C. C., Schroth M. N. Fire blight resistance in Pyrus: localization of arbutin and beta-glucosidase // Phytopathology. 1969. Vol. 59, No. 10. P. 1534–1539.
10. Proestos C., Sereli D., Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS // Food Chem. 2006. Vol. 95, No. 1. P. 44–52.
11. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants — history and publications / U. Meier [et al.] // J. für Kult. 2009. Vol. 61, No. 2. P. 41–52.

References

1. Vilkickyte G., Petrikaite V., Pukalskas A., Sipailiene A., Raudone L. Exploring Vaccinium vitis-idaea L. as a potential source of therapeutic agents: antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and fractions. Journal of Ethnopharmacology, 2022. Vol. 292, March, pp. 115207.
2. Vilkickyte G., Petrikaite V., Marksa M., Ivanauskas L., Jakstas V., Raudone L. Fractionation and Characterization of Triterpenoids from Vaccinium vitis-idaea L. Cuticular Waxes and Their Potential as Anticancer Agents. Antioxidants, 2023, Vol. 12, No. 2.
3. Jurica K., Karačonji I. B., Šegan S., Opsenica D. M., Kremer D. Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (Arbutus unedo L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry = Kvantitativna analiza arbutina i hidrokinona u listovima obične planike (Arbutus unedo L., Ericaceae) plins. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 2015, Vol. 66, No. 3, pp. 197–202.
4. Blaut M., Braune A., Wunderlich S., Sauer P., Schneider H., Glatt H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology, 2006, Vol. 44, No. 11, pp. 1940–1947.
5. Stalikas C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science, 2007, Vol. 30, No. 18, pp. 3268–3295.
6. Shamilov A. A., Bubenchikova V. N., Chernikov M. V., Pozdnyakov D. I., Garsiya E. R. Vaccinium vitis-idaea L.: Chemical contents, pharmacological activities. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, Vol. 26, No. 4, pp. 344–362.
7. Brusniki obyknovennoj list'ya: [farmakopejnaya stat'ya] (utv. i vvedena v dejstvie Prikazom Minzdrava Rossii ot 31.10.2018 No. 749) [Lingonberry leaves] Pharmacopoeia article (approved and put into effect by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 31.10.2018 No. 749). Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. Moskva, 2018. XIV izd., Vol. IV.
8. Chisvert A., Sisternes J., Balaguer Á., Salvador A. A gas chromatography-mass spectrometric method to determine skin-whitening agents in cosmetic products. Talanta, 2010, Vol. 81, No. 1–2, pp. 530–536.
9. Hildebrand D. C., Powell C. C., Schroth M. N. Fire blight resistance in Pyrus: localization of arbutin and beta-glucosidase. Phytopathology, 1969, Vol. 59, No. 10, pp. 1534–1539.
10. Proestos C., Sereli D., Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. Food Chemistry, 2006, Vol. 95, No. 1, pp. 44–52.
11. Meier U., Bleiholder H., Buhr L., Feller C., Hack H., Heß M., Lancashire P.D., Schnock U., Stauß R., van den Boom T., Weber E., Zwerger P. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants — history and publications. J. für Kult., 2009. Vol. 61, No. 2, pp. 41–52.

Информация об авторах

Олег Владимирович Матусевич — кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории медицинских и биологических технологий КНЦ РАН; доцент, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет;

Лидия Николаевна Середа — младший научный сотрудник;

Кирилл Александрович Александров — ассистент;

Наталья Владиленовна Кузьмина — кандидат химических наук, ассистент;

Елена Михайловна Голинец — преподаватель кафедры общей и медицинской химии;

Никита Сергеевич Цветов — кандидат химических наук, заведующий лабораторией медицинских и биологических технологий КНЦ РАН; научный сотрудник ИХТРЭМС КНЦ РАН.

Information about the authors

Oleg V. Matusevich — PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Medical and Biological Technologies of the Kola Science Centre of RAS; Associate Professor, St. Petersburg State Pediatric Medical University;

Lidiya N. Sereda — Junior Researcher;

Kirill A. Alexandrov — Assistant;

Nataliya V. Kuzmina — PhD (Chemistry), Assistant;

Elena M. Golinets — teacher of the Department of General and Medical Chemistry;

Nikita S. Tsvetov — PhD (Chemistry), Head of Laboratory of Medical and Biological Technologies of the Kola Science Centre of RAS; Researcher, I.V. Tananaev Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Raw Materials of the Kola Science Centre of RAS.

Статья поступила в редакцию 26.03.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 12.04.2024.
The article was submitted 26.03.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 12.04.2024.