

УДК 581.192

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2021.4.28

**ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *PYROLA INCARNATA* (DC.) FREYN И *PYROLA ROTUNDIFOLIA* L., ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЯКУТИИ**

© Кириллина К.С., Чирикова Н.К.

*Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Россия, 677000, Якутск, ул. Белинского, 58**Резюме*

**Цель.** Изучение качественного и количественного состава биологически активных веществ *P. incarnata* и *P. rotundifolia*, произрастающих в Республике Саха (Якутия).

**Методика.** Образцы были собраны в Центральной Якутии во время цветения. Для изучения фитохимического состава были использованы: методика качественного анализа на содержание некоторых биологически активных веществ, методика определения дубильных веществ, методика количественного определения фенольных соединений по Фолина-Чокальтеу, методика определения количественного содержания суммы флавоноидов.

**Результаты.** Исследование показало, что в надземных частях растений содержатся: арбутин, аминокислоты, флавоноиды, дубильные вещества, иридоиды, катехины, тритерпеновые и фенольные соединения. В результате определения количественного содержания биологически активных соединений в листьях *P. incarnata* и *P. rotundifolia* были установлены суммарные содержания дубильных веществ в водных экстрактах, флавоноидов и фенольных соединений в спиртовых и водных экстрактах. Также были получены дифференциальные спектры объектов исследования.

**Заключение.** После изучения фитохимического состава *P. incarnata* и *P. rotundifolia* можно сделать вывод, что надземные части объектов исследования являются источником ценных соединений, обеспечивающих защиту от окислительного стресса, поэтому их использование в народной медицине оправдано.

*Ключевые слова:* грушанка, биологически активные соединения, спектрофотометрический метод, ЛРС, суммарное содержание фенольных соединений, *Pyrola incarnata*, *Pyrola rotundifolia*

**PHENOLIC COMPOUNDS OF *PYROLA INCARNATA* (DC.) FREYN AND *PYROLA ROTUNDIFOLIA* L., GROWING IN YAKUTIA**

Kirillina K.S., Chirikova N.K.

*North-Eastern Federal University, 58, Belinskogo St., 677000, Yakutsk, Russia**Abstract*

**Objective.** A study of the qualitative and quantitative composition of biologically active substances of *P. incarnata* and *P. rotundifolia* growing in the Republic of Sakha (Yakutia).

**Methods.** The samples were collected in Central Yakutia during flowering. To study the phytochemical composition, we used the method of qualitative analysis on the content of some biologically active substances, the method of determination of tannins, the method of quantitative determination of phenolic compounds by means of Folin-Ciocalteu reagent and method of quantitative determination of the amount of flavonoids.

**Results.** The study showed that the above-ground parts of plants contain arbutin, amino acids, flavonoids, tannins, iridoids, catechins, triterpene and phenolic compounds. As a result of determination of the quantitative content of biologically active compounds in leaves of *P. incarnata* and *P. rotundifolia* the total content of tannins in aqueous extracts, flavonoids and phenolic compounds in alcohol and aqueous extracts were established. Differential spectra of the study objects were also obtained.

**Conclusion.** After studying phytochemical composition of *P. incarnata* and *P. rotundifolia* it is possible to draw a conclusion that above-ground parts of objects of study are a source of valuable compounds providing protection against oxidative damage, therefore their use in folk medicine is justified.

*Keywords:* wintergreen, biologically active compounds, spectrophotometric method, medicinal product, total phenolic content, *Pyrola incarnata*, *Pyrola rotundifolia*

## Введение

Грушанка мясокрасная – *Pyrola incarnata* (DC.) Freyn. Данное растение является типичным циркумполярным бореальным видом, распространенным почти во всех областях северного полушария с умеренным и умеренно-холодным климатом. Обладает широкой амплитудой толерантности к абиотическим факторам, таким как увлажнение, освещенность и химический состав почвы. Это вечнозеленое, длиннокорневищное травянистое растение. В народной медицине используют надземную часть растения, которая применяется при заболеваниях ЖКТ, сердечно-сосудистой системы, кровотечениях, болезнях почек, простуде, женских болезнях, после родов и т. д. [3]. Последние исследования показали, что *P. incarnata* демонстрирует нейропротекторные эффекты в отношении  $\beta$ -амилоидиндуцированных нарушений памяти [7].

Грушанка круглолистная – *Pyrola rotundifolia* L. Является распространенным видом Республики Саха (Якутия), произрастает главным образом в хвойных и лиственных лесах, часто встречается на болотах и в заболоченных территориях [2]. *P. rotundifolia* имеет короткое корневище, дающее многочисленные надземные побеги. В народной медицине используют надземную часть, в частности листья, из которых изготавливают отвары и настои. Применяется после родов, при заболеваниях ЖКТ, выделительной системы, женских болезнях, понижает уровень глюкозы в крови, обладает вяжущим, ранозаживляющим эффектом. В одном из новейших исследований установлено, что экстракт показал умеренную радикальную продувочную и хелатирующую активность, а также хорошую ингибирующую способность окисления линолевой кислотой по сравнению со стандартами [10].

Травы *Pyrola* были использованы в качестве ведущих ролей в 39,4% китайских традиционных препаратов для лечения ревматоидного артрита, остеопротекции, питания и тонизирования почек, циркулирующей крови, облегчения боли, очищения тепла и питания печени и селезенки. Кроме того, травы *Pyrola* используются в качестве вспомогательных веществ в 60,6% препаратов китайской традиционной медицины для лечения регуляции Ци, питания почек, печени и селезенки и т. д. [8].

Химафилин и урсоловая кислота, выделенные из *P. rotundifolia*, показали значительную ингибирующую активность при обоих отеках при пероральном приеме (33% и 24% соответственно в дозе 500 мг/кг,  $p < 0,05$ , и 49% и 31% соответственно в дозе 150 мг/кг,  $p < 0,01$ ). Это первый отчет о компонентах с противовоспалительной и анальгетической активностью из всех трав *Pyrola* [5].

В дополнение к вышеперечисленным фармакологическим эффектам, травы *Pyrola* отображали и другие виды деятельности. *P. rotundifolia* применялась в качестве гемостатика в клинике при кровоизлияниях в дыхательные пути, особенно при легочном туберкулезном гемоптитисе [11]. Он обладал сильной ингибирующей активностью по нейраминидазе, процентная скорость ингибирования достигала 79,10%, а значение внутреннего контроля составляло  $40 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  [20].

В результате фитохимических исследований были выявлены: флавоноиды (процианидин В1, процианидин В3, процианидин В2-3'-О-галлат, процианидин В2-3,3'-ди-О-галлат), фенолгликозиды (6'-О-галлоилгомоарбутин), арбутин, пирлазид А, пирлазид В, 2-метил-7-гидроксиметил-1,4-нафтохинон, 2,6-диметил-1,4-нафтохинон, дибутилфталат [13, 6], иридоиды (монотропеин), органические кислоты (п-метоксикоричная), стероиды (ситостерин), тритерпены (тараксерол), фенолы и их производные – гомоарбутин. Согласно исследованию 1989 года, три основных компонента *P. incarnata* — это гомоарбутин (40,8 мг/г сухой массы), гиперин (6,87 мг/г сухой массы) и гиперин-2''-О-галлат (7,31 мг/г сухой массы) [16].

Целью исследования является изучение качественного и количественного состава биологически активных веществ *P. incarnata* и *P. rotundifolia*, произрастающих в Якутии.

## Методика

Растительное сырье. Объектами исследования являлись грушанка мясокрасная – *Pyrola incarnata* (DC.) Freyn и грушанка круглолистная – *Pyrola rotundifolia* L. Образцы растительного сырья были собраны в Центральной Якутии во время цветения. Для анализа использовались зеленые части растения. Сбор и хранение исследуемого сырья осуществлялись согласно требованиям, описанным в Государственной фармакопее РФ XIII [1].

Получение извлечения для исследования состава биологически активных веществ. Измельченное растительное сырье с размером частиц 1 мм, массой 1 г экстрагировали 70% спиртом этиловым.

Экстракция проводилась при температуре около 100 °С на водяной бане с применением обратного водяного холодильника. Далее полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр, сырье промывали дважды 70% спиртом этиловым порциями и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем колбы доводили до метки 70% спиртом этиловым. Для определения суммарного содержания органических кислот и фенольных соединений также было получено водное извлечение из объектов исследования.

Общие экспериментальные условия. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Санкт-Петербург). Для изучения химического состава растительного сырья были использованы: методика качественного анализа на содержание некоторых биологически активных веществ [1], методика определения дубильных веществ [1], методика количественного определения фенольных соединений по Фолина-Чокальтеу [9].

Методика определения дубильных веществ. Около 2 г измельченного сырья, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и фильтруют около 100 мл в коническую колбу вместимостью 200-250 мл. Отбирают пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую колбу вместимостью 750 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) соответствует 0,004157г дубильных веществ в пересчете на танин. Содержание дубильных веществ (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

V – объем раствора перманганата калия, израсходованного на титрование извлечения, в миллилитрах; V<sub>1</sub> – объем раствора перманганата калия израсходованного на титрование в контрольном опыте, в мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора перманганата калия (в пересчете на танин); в г; m – масса сырья в г; W – потеря в массе при высушивании сырья в %; 250 – общий объем извлечения в миллилитрах; 25 – объем извлечения, взятого для титрования, в мл.

Методика определения количественного содержания суммы флавоноидов. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70% и взвешивают с погрешностью ±0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5% в спирте 70% и доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин. (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют через 30 мин. на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно определяли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина.

Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно-сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot K^V}{M} \cdot \frac{M_s}{D_s \cdot K_s^V} \cdot \frac{100}{100 - W} \cdot 100$$

, где D – оптическая плотность исследуемого раствора; D<sub>s</sub> – оптическая плотность раствора стандартного образца рутина; M – масса сырья, г; M<sub>s</sub> – масса стандартного образца рутина, г; K<sup>V</sup> – коэффициент разбавления исследуемого раствора; K<sub>s</sub><sup>V</sup> – коэффициент разбавления раствора стандартного образца рутина; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Анализы проводили в 6 повторностях, результаты статистически обрабатывали по методике ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [1].

## Результаты исследования и их обсуждение

Методом качественных реакций в листьях *P. incarnata* и *P. rotundifolia* были выявлены аминокислоты, дубильные вещества, катехины, арбутин, фенольные соединения, иридоиды и тритерпеновые соединения. В результате определения количественного содержания биологически активных веществ в листьях *P. incarnata* и *P. rotundifolia* были установлены суммарные содержания фенольных соединений, дубильных веществ и флавоноидов (табл.).

Таблица. Количественное содержание фенольных соединений в листьях *P. incarnata* и *P. rotundifolia*, в мг/г

Листья	Общее содержание фенольных соединений в водном извлечении	Общее содержание фенольных соединений в спиртовом извлечении	Общее содержание дубильных веществ	Общее содержание флавоноидов
<i>Pyrola rotundifolia</i> Грушанка круглолистная	337,52±0,39	171,86±0,38	141,33±0,23	22,62±0,83
<i>Pyrola incarnata</i> Грушанка мясокрасная	385,94±0,44	161,23±0,95	163,57±0,20	21,78±0,64

Исследования показали, что фенольные соединения из надземной части *Pyrola* обладают определенной антибактериальной активностью и благотворно влияют на почки [18, 12]. В результате количественного анализа фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу было установлено, что в водных извлечениях *P. incarnata* содержится 385,94±0,44 мг/г, в *P. rotundifolia* 337,52±0,39 мг/г. В спиртовых извлечениях *P. incarnata* содержится 161,23±0,95 мг/г и в *P. rotundifolia* 171,86±0,38 мг/г соответственно. В водных извлечениях *Pyrola* количество фенольных соединений превышает спиртовые примерно в 2-2,3 раза. Данные позволяют предположить, что фенольные соединения *Pyrola* лучше всего извлекаются с помощью воды. Первичными соединениями, обнаруженными в *P. incarnata*, являются гиперин и 2'-О-галлоилгиперин, которые играют важную роль в обеспечении антиоксидантной активности.

По литературным данным, в растениях рода *Pyrola* были обнаружены такие фенольные соединения, как: кверцитрин, гомоарбутин, арбутин, гиперин, гиперин-2''-О-галлат, 2'-О-галлоилгиперин, процианидин В1, процианидин В3, процианидин В2-3'-О-галлат, процианидин В2-3,3'-ди-О-галлат. В одном из более поздних исследований выяснилось, что 2'-О-галлоилгиперин является потенциально защитным антиоксидантом для предотвращения серьезных повреждений легочных тканей [19]. Более ранние исследования показали, что окислительный стресс играет важную роль в синтезе вторичных метаболитов в растениях [14, 15, 17]. В исследованиях Х. Н. Уао и соавт. (2016) было отмечено, что в пробах, отобранных в августе наибольшее содержание фенолов равно 217,73±9,14 мг/г, что ниже по сравнению с количеством фенольных соединений в якутских популяциях *Pyrola*. Полученные данные свидетельствуют о наличии связи между высоким содержанием фенольных соединений и антиоксидантной активностью, что сопоставимо с результатами других авторов.

Флавоноиды являются одним из важных активных компонентов растений рода *Pyrola*, а также считаются ведущими активными компонентами при сердечно-сосудистых заболеваниях. Дифференциальные спектры спиртовых извлечений исследуемых объектов в комплексе с хлоридом алюминия близки дифференциальному спектру поглощения ГСО рутина с хлоридом алюминия. В спиртовых извлечениях листьев *P. incarnata* содержится 21,78±0,64 мг/г и в *P. rotundifolia* - 22,62±0,83 мг/г флавоноидов в пересчете на рутин [17].

В водных извлечениях листьев объектов исследования установлено суммарное содержание дубильных веществ: 141,33±0,23 мг/г у *P. rotundifolia* и 163,57±0,20 мг/г у *P. incarnata*. В работе Н. С. Фурсы и соавт. (2016) в грушанке круглолистной, произрастающей в Белгородской, Томской, Ярославской областях, содержание флавоноидов равно 5,1±0,1 мг/г, дубильных веществ 71,3±1,1 мг/г. Таким образом, *P. rotundifolia* произрастающая на территории Республики Саха (Якутия) содержит в 2 раза больше таннидов и в 4 раза больше флавоноидов. Следовательно, можно сделать вывод, что якутские популяции грушанок накапливают гораздо большее количество ценных биологически активных соединений.

## Заключение

Впервые был изучен качественный и количественный состав фенольных соединений *P. incarnata* и *P. rotundifolia*, произрастающих в Республике Саха (Якутия). Исследование показало, что в надземных частях растений содержатся: арбутин, аминокислоты, дубильные вещества, иридоиды, катехины, тритерпеновые и фенольные соединения. Установлено суммарное содержание дубильных веществ, флавоноидов и фенольных соединений в спиртовых и водных извлечениях. После изучения фитохимического состава *P. incarnata* и *P. rotundifolia* можно сделать вывод, что у них схожий состав биологически активных компонентов. Надземные части объектов исследования являются источником ценных соединений, обеспечивающих защиту от окислительного стресса, поэтому их использование в народной медицине оправдано. В заключение следует отметить, что растениям рода *Pyrola* следует придавать большее значение и интегрировать их с различными новыми технологиями в ходе дальнейших исследований, потому как исследования по изученному роду проводятся в основном в Китае.

## Литература (references)

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIII. – М.: ФЭМБ, 2015. – 1470 с. [*Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. Izdanie XIII. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIII. Moscow: FEMB, 2015. – 1470 p. (in Russian)*]
2. Кахерская Ю.С., Горячкина Е.Г., Федосеева Г.М. Изучение аминокислот грушанки круглолистной и ортилии однобокой // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2014. – N3. – С. 89-92. [Kakher'skaya Yu.S., Goryachkina E.G., Fedoseeva G.M. *Acta Biomedica Scientifica*. – 2014. – N3. – P. 89-92. (In Russian)]
3. Никифорова А.А. Виталитет и онтогенетическая структура ценопопуляций *Pyrola incarnata* (DC) Freyn в нарушенных лесах Лено-Амгинского междуречья (Центральная Якутия) // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. – 2012. – Т.14, №1-8. [Nikiforova A.A. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossijskoj akademii nauk*. Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. – 2012. – V.14, N1-8. (In Russian)]
4. Фурса Н.С., Бузук Г.Н., Таланов А.А., Иванов А.П., Кузьмичева Н.А., Горькова А.С. Неофициальные виды семейства вересковых как перспективные акваретики и уроантисептики // *Вестник фармации*. – 2016. – N3. – С. 59. [Fursa N.S., Buzuk G.N., Talanov A.A., Ivanov A.P., Kuz'micheva N.A., Gor'kova A.S. *Vestnik farmatsii*. Pharmacy bulletin. – 2016. – N3. – P. 59 (In Russian)]
5. Kosuge T., Yokota M., Sugiyama K. et al. Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in traditional Chinese medicine. III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. – 1985. – V.33, N12. – P. 5355-5357
6. Li D., Yang S., Song B.A. et al. Research Advances on *Pyrola* L. // *Journal of Guizhou University (Natural Science Edition)*. – 2008. – N2.
7. Li S.J., Liu Q., He X.B. et al. *Pyrola incarnata* demonstrates neuroprotective effects against  $\beta$ -amyloid-induced memory impairment in mice // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – V.30, N2. – P. 126858.
8. Liu C.H., Ai Q.J. Overview of research of *Pyrola calliantha* H. Andres // *Journal of Industrial Technological Economics*. – 1994. – N6. – P. 75-76.
9. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent // *Methods in enzymology*. – 1999. – V. 299. – P. 152-178.
10. Szewczyk K., Bogucka-Kocka A., Vorobets N. et al. Phenolic composition of the leaves of *Pyrola rotundifolia* L. and their antioxidant and cytotoxic activity // *Molecules*. – 2020. – V.25, N7. – P. 1749.
11. Wang X.L., Wang J.X., Yu Y.M., Guo W.J. Overview of clinical research in herba *Pyrolae* // *Shannxi Journal of Traditional Chinese Medicine*. – 2000. – V.21, N1. – P. 45-46.
12. Xu W.F., Li X.C., Dong J.D., Deng S.H. Study of antibacterial efficacy of *luticaosu* in vivo and vitro // *Acta Academiae Medicinae Shandong*. – 1996. – V.3. – P. 45-46.
13. Yang X., She J., Liu J. et al. A Comprehensive Review of the Genus *Pyrola* Herbs in Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2020. – V.20, N1. – P. 57-77.
14. Yao X.H., Zhang Z.B., Song P. et al. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata* // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – V.94. – P. 405-412.
15. Yao X.H., Zhang D.Y., Duan M.H. et al. Preparation and determination of phenolic compounds from *Pyrola incarnata* Fisch. with a green polyols based-deep eutectic solvent // *Separation and Purification Technology*. – 2015. – V.149. – P. 116-123.

16. Yazaki K., Shida S., Okuda T. Galloylhomarbutin and related polyphenols from *pyrola-incarnata* // *Phytochemistry*. – 1989. – V.28, N2. – P. 607-609.
17. Zhang D.Y., Luo M., Wang W. et al. Variation of active constituents and antioxidant activity in *pyrola* [*P. incarnata* Fisch.] from different sites in Northeast China // *Food Chemistry*. – 2013. – V.141, N3. – P. 2213-2219.
18. Zhang L., Yu Y.M., Wang J.X., Pang Z.G. A survey of the studies on the mechanism of *Pyrola* // *Northwestern Journal of Pharmacology*. – 1998. – V.13, N6. – P. 270-271.
19. Zhang S.D., Wang P., Zhang J. et al. 2'-O-galloylhyperin attenuates LPS-induced acute lung injury via up-regulation antioxidation and inhibition of inflammatory responses in vivo // *Chemico-biological interactions*. – 2019. – V.304. – P. 20-27.
20. Zhao Z.F., Wu N., Tian X. et al. Chemical constituents, biological activities and quality control of plants from genus *Pyrola* // *China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2017. – V.42, N4. – P. 618-627.

### Информация об авторах

*Кириллина Кристина Степановна* – студент института естественных наук ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова». E-mail: kristinakirillina22@gmail.com

*Чирикова Надежда Константиновна* – доктор фармацевтических наук, доцент ВАК по специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», профессор биологического отделения института естественных наук ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова». E-mail: hofnung@mail.ru

**Конфликт интересов:** результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019) и при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-09-00361.