

УДК 638.17 : 543.544

**ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА
И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В
ОПЫТНЫХ ОБРАЗЦАХ ПРОПОЛИСА**

*ПИСАРЕВ Д.И., ЖИЛЯКОВА Е.Т., НОВИКОВ О.О.,
НОВИКОВА М.Ю., МАЛЮТИНА А.Ю.*

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет», г. Белгород, Россия
Тел.: (057) 706-30-71, e-mail: ezhilyakova@bsu.edu.ru

Аннотация. Используя ОФ ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования, были идентифицированы гидроксикоричные кислоты в 6 образцах прополиса. Выявлено, что состав прополиса имеет стабильный набор гидроксикоричных кислот, включающий 6 компонентов: транс-пара-кумаровую, феруловую, изоферуловую, кофейную, 3,4-диметилкофейную и коричную. Установлено, что около 90% всех оксикоричных кислот приходится на транс-пара-кумаровую, феруловую и кофейную кислоты с преобладанием первой. Методом абсолютной градуировки определено количественное содержание доминирующих гидроксикоричных кислот в опытных образцах прополиса.

Ключевые слова: прополис, гидроксикоричные кислоты, обращённо-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография, метод абсолютной градуировки.

Анотація. Використовуючи ЗФ ВЕРХ в градієнтному режимі елюювання, були ідентифіковані гідроксикоричні кислоти в 6 зразках прополісу. Виявлено, що склад прополісу має стабільний набір гідроксикоричних кислот, до складу якого 6 компонентів: транс-пара-кумаровую, феруловую, ізоферуловую, кавову, 3,4-діметілкофейную і коричну. Встановлено, що близько 90% всіх оксікоричних кислот припадає на транс-пара-кумаровую, феруловую і кавову кислоти з переважанням першої. Методом абсолютної градуювання визначено кількіс-

ний вміст домінуючих гідроксикоричних кислот у дослідних зразках прополісу.

Ключові слова: прополіс, гідроксикоричні кислоти, звернений-фазна високоефективна рідинна хроматографія, метод абсолютної градування.

Abstract. Using RP HPLC in a gradient elution mode, hydroxycinnamic acids in 6 propolis samples were identified. It was found that the composition of propolis has a stable set of hydroxycinnamic acids, including 6 components: trans-para-coumaric, ferulic, isoferulic, coffee, 3,4-dimethyl caffeine and cinnamon. It has been established that about 90% of all oxycoric acids are trans-para-coumaric, ferulic and caffeic acids with a predominance of the former. The quantitative content of the dominant hydroxycinnamic acids in propolis prototypes was determined by the absolute calibration method.

Key words: propolis, hydroxycinnamic acids, reversed-phase high-performance liquid chromatography, absolute calibration method.

Прополис – продукт жизнедеятельности пчёл, представляющий собой клейкую смолистую массу с характерным ароматным запахом и горько-жгучим вкусом. Прополис различается по окраске, и может иметь красный, зелёный или жёлтый цвет в зависимости от источника и сезона сбора [2, 4].

В состав прополиса входят полифенольные соединения, смолы, бальзамы, эфирные масла и воск. Полифенольные соединения представлены флавоноидами, дубильными веществами, оксикумаринами, гидроксикоричными кислотами. Смолы состоят в основном из органических кислот. Бальзамы – смесь эфирных масел, обуславливающих аромат и вкус прополиса, дубильных веществ, ароматических альдегидов. Также в прополис входят микроэлементы, жирные и аминокислоты. Однако химический состав прополиса может варьировать в широких пределах в зависимости от региона происхождения и растений, из почек которых изготавливался указанный продукт. Причём

пробы прополиса, взятые даже из одного улья, не всегда имеют идентичный химический состав [2, 3].

Одной из важнейших групп биологически активных соединений прополиса, обуславливающей характер его фармакологического действия являются гидроксикоричные кислоты.

Гидроксикоричные кислоты представляют собой вещества природного происхождения, встречающиеся практически во всех высших растениях. Обнаруженный широкий спектр разноплановых фармакологических эффектов данных соединений наряду со слабыми или умеренными побочными действиями, позволяет говорить об их перспективности в качестве терапевтических агентов.

Химическое изучение состава и количественное определение гидроксикоричных кислот в опытных образцах прополиса

В качестве объектов исследования взяты 6 опытных образцов прополиса из разных регионов России. Из опытных образцов готовили извлечения спиртом этиловым 80%-ным по традиционной схеме изготовления настоек в соотношении 1:10. Полученные извлечения фильтровали и использовали для непосредственного анализа.

Хроматографическое разделение спиртовых извлечений прополиса выполняли на жидкостном хроматографе *Agilent Technologies 1200 Infinity* с автоматическим пробоотборником *Agilent 1200*, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом. Регистрацию спектров поглощения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора серии *Agilent 1200*, период сканирования – 2 нм.

Обработку спектров и хроматограмм проводили помощью программного обеспечения «*Agilent Chem Station*».

Эффективность колонки устанавливали путём вычисления числа теоретических тарелок N по формуле 1.

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_r}{\mu_{0,5}} \right)^2 \quad (1)$$

где t – время удерживания определяемого вещества, мм;
 $\mu_{0,5}$ – ширина на половине высоты пика, мм.

Оптимальный критерий эффективности колонки – не менее 5000 [5].

Эффективность разделения сопредельных пиков определяли путем расчёта коэффициента разделения R_s по формуле 2, значение которого согласно Европейской Фармакопее должен быть не менее 1,5:

$$R_s = \frac{\Delta l}{\mu_{0,5(1)} + \mu_{0,5(2)}}, \quad (2)$$

где Δl – расстояние между вершинами двух соседних пиков, мм;

$\mu_{0,5(1)}, \mu_{0,5(2)}$ – ширина на половине высоты пиков двух компонентов, мм.

Форму хроматографического пика, определяли путем расчета коэффициента асимметрии пика (T_f) по формуле 3, оптимальное значение которого – менее 2.

$$T_f = \frac{\mu_{0,05}}{2 \times f}, \quad (3)$$

где $\mu_{0,05}$ – ширина пика на высоте 5,0% от базовой линии, мм;

f – расстояние от начала пика на высоте 5,0% от базовой линии до перпендикуляра, проведенного из его вершины, мм.

Подвижная фаза: 1,0%-ный водный раствор кислоты муравьиной (А) – спирт этиловый 95%-ный (Б).

Колонка стальная - *Ascentis express C₁₈ 2,7μm × 100 мм × 4,6мм*.

Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

Температура темростата - +35°C.

Объём вводимой пробы - 1 μl.

Для разделения гидроксикоричных кислот использовался градиентный режим элюирования, поскольку присутствие в их молекулах аналогичных структурных фрагментов, обуславливающих сходную полярность, не позволяет адекватно разделять их в изократическом режиме элюирования.

Условия градиентного элюирования полифенолов, в том числе гидроксикоричных кислот, разработанные нами ранее

[1], использованы также для изучения прополиса и приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Условия градиентного элюирования гидроксикоричных кислот прополиса

Время, мин	А, %	Б, %
0	90	10
10	80	20
20	70	30
30	50	50
40	10	90

Идентификацию гидроксикоричных кислот проводили по идентичности времени удерживания испытуемых компонентов, с веществами-свидетелями, зарегистрированных в сходных условиях эксперимента и по итогам диодно-матричной детекции. В указанных выше условиях хроматографирования СО кислоты кофейной имеет время удерживания $t_r \sim 7,4$ мин, кислоты феруловой $t_r \sim 11,8$ мин, изоферуловой $\sim 13,28$, кислоты *транс*-п-кумаровой 11,3 мин, 3,4-диметил-кофейной – 17,6 мин, кислоты коричной $\sim 25,18$ мин.

Для решения вопроса о выборе длине волны детектирования были изучены профили УФ-спектров искомым гидроксикоричных кислот, приведенные на рисунке 1.

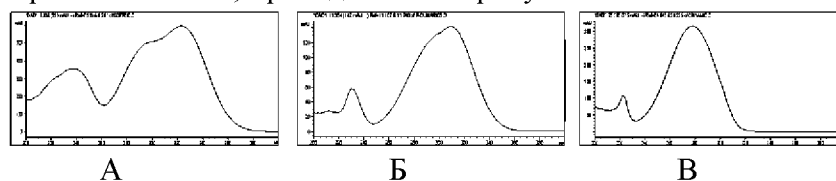


Рисунок 1 - УФ-спектры стандартных образцов некоторых гидроксикоричных кислот:

А – кислоты кофейной; Б – кислоты *транс*-п-кумаровой;
В – кислоты коричной

На рисунке 1 видно, что *транс*-п-кумаровая кислота характеризуется присутствием двух максимумов поглощения при длинах волн 230 и 310 нм, причем максимум при 310 нм имеет большую интенсивность и специфичность. Кофейная кислота

и её производные имеют практически одинаковые профили УФ-спектров, максимумы наблюдаются при длинах волн 237 и 325 нм, последний более интенсивный. Кислота коричная поглощает при длинах волн 223 и 278 нм. Опираясь на полученные данные, в качестве аналитических длин волн использовали 310 нм для *транс*-п-кумаровой, 325 нм для производных кофейной кислоты и 280 нм для коричной кислоты.

Относительное содержание индивидуальных компонентов рассчитывали методом внутренней нормализации, по отношению площади хроматографического пика отдельного компонента к сумме площадей всех пиков зарегистрированных оксикоричных кислот согласно формуле 4:

$$X_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S}, \quad (4)$$

где S_i – среднее значение площади пика компонента на хроматограммах суммы;

$\sum S$ – среднее значение суммы всех площадей пиков на хроматограммах.

Хроматограмма разделения спиртового извлечения из прополиса представлена на рисунке 2.

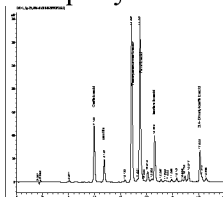


Рисунок 2 - Хроматограмма 80%-ного спиртового извлечения из прополиса (детектор диодно-матричный λ_{\max} – 325нм)

Как видно на приведенном рисунке 2, все компоненты, присутствующие на хроматограмме, разделяются по базовой линии, что свидетельствует о хорошей селективности использованных хроматографических условий.

Результаты расчёта параметров пригодности примененной хроматографической системы приведены в таблице 2.

Представленные в таблице 2 результаты расчета критериев пригодности ($N > 5000$, $R_s > 1,5$, $T_f < 2$), в общем, соответст-

вуют реферируемым значениям. Следовательно, можно утверждать, что примененная хроматографическая система может быть признана подходящей для определения оксикоричных кислот в прополисе.

Таблица 2 – Показатели пригодности хроматографической системы для определения оксикоричных кислот в прополисе

t_R	N	S, mAU средняя	R_s	T_f	W_b	Идентифицированный компонент
7,466	20506	867	12,32	0,8	0,1227	Кислота кофейная
11,064	37928	5732	3,05	0,84	0,1393	Кислота <i>транс</i> -п-кумаровая
11,864	44773	3317	1,22	0,79	0,1320	Кислота феруловая
13,278	54958	412	1,19	0,84	0,1333	Кислота изоферуловая
17,630	96895	400	1,84	1,01	0,1333	3,4-диметилкофейная кислота
24,634	135041	224	2,18	1,1	0,1578	Кислота коричная

t_R – абсолютное время удерживания, N – число теоретических тарелок, S, mAU средняя – средняя площадь хроматографического пика на хроматограмме, R_s – коэффициент разделения пиков, T_f – коэффициент асимметрии, W_b – ширина пика на базовой линии.

В хроматографическом поведении гидроксикоричных кислот можно отметить ряд закономерностей. Поскольку гидроксикоричные кислоты, соединения достаточно полярные, то на привитых неполярных стационарных фазах имеют высокую подвижность по сравнению с другими фенольными соединениями вследствие ограниченного проникновения внутрь гидрофобной фазы среды. Однако, различные заместители оказывает заметное влияние на их подвижность. Так, самой

подвижной является кофейная кислота, содержащая две полярные гидроксильные группы. У *транс*-*п*-кумаровой кислоты на одну гидроксильную группу меньше, что снижает её полярность, тормозя, таким образом, подвижность. Метоксилирование значительно уменьшает подвижность, так как снижается полярность молекулы. Поэтому феруловая, изоферуловая и особенно 3,4-диметилкофейная кислоты обладают наименьшей подвижностью.

Исследованные опытные образцы прополиса показали идентичный состав оксикоричных кислот. Во всех образцах присутствовали *транс*-*п*-кумаровая, феруловая, изоферуловая, кофейная, 3,4-диметил-кофейная и коричная кислоты в разных соотношениях.

Используя полученные в ходе хроматографирования площади пиков компонентов гидроксикоричных кислот (таблица 2), методом внутренней нормализации удалось рассчитать удельный вес каждого из компонентов внутри указанной группы.

Процентное распределение гидроксикоричных кислот внутри группы представлено на рисунке 3.

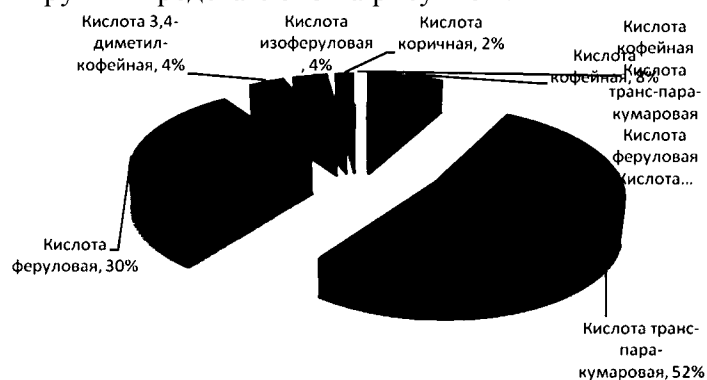


Рисунок 3 – Процентное распределение гидроксикоричных кислот в прополисе внутри группы

Данные, представленные на рисунке 3, показывают, что в прополисе из группы гидроксикоричных кислот наибольшее содержание приходится на *транс*-*п*-кумаровую, феруловую и кофейную кислоты.

Для количественного определения оксикоричных кислот в прополисе использован метод абсолютной градуировки. При этом оценивали содержание доминирующих оксикоричных кислот: *транс*-п-кумаровой, феруловой и кофейной. Для этого, заранее были построены калибровочные кривые, приготовленные из градуировочных растворов стандартных образцов кофейной, феруловой и *транс*-п-кумаровой кислот.

ПРИМЕЧАНИЕ: 1. Приготовление растворов СО кислот феруловой, кофейной и *транс*-п-кумаровой.

Для построения градуировочных графиков по 0,025 г (аналитическая навеска) кислот *транс*-п-кумаровой (CAS № 501-98-4, 99,7%; *Sigma-Aldrich*), кофейной (CAS № 331-39-5, 99,0%; *Dr. Ehrenstorfer GmbH*), феруловой (CAS1135-24-6, *Acros* 99,0%) переносили в мерные колбы объемом 25 мл, прибавляли по 20 мл спирта этилового 95%-ного, встряхивали до полного растворения и доводили до метки указанным растворителем (раствор А).

Из полученного раствора А далее готовили серию калибровочных растворов, состоящую из 6 образцов. Для этого в каждую из 6 мерных колб вместимостью 25 мл пипеткой переносили раствор А в объемах: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0, мл, содержимое колб тщательно перемешивали и доводили спиртом этиловым 95%-ным до метки (растворы Б).

Затем в хроматограф вкалывали по 1 μ л приготовленных градуировочных растворов, в том числе раствор А и отмечали их площади пиков. Полученные результаты переводили в графическую форму путём построения градуировочного графика зависимости площади пика (S) от количества вколотого вещества (С%). Таким образом, диапазон концентраций калибровочных растворов составил 0,002 – 0,1%.

В указанном диапазоне концентраций калибровочные зависимости во всех трёх случаях имели прямолинейную зависимость, уравнения регрессии имели вид: кислота *транс*-п-кумаровая – $y = 81807x - 34,936$ ($R^2 = 1$); кислота кофейная – $y = 58224x$ ($R^2 = 1$); кислота феруловая – $y = 91745x - 1320$ ($R^2 = 0,993$), где x – концентрация соответствующей кислоты в %, y – площадь хроматографического пика, R^2 – коэффициент корреляции.

Результаты расчета содержания гидроксикоричных кислот в прополисе разных опытных образцов представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Содержание гидроксикоричных кислот в лабораторных образцах прополиса

№ опытного образца прополиса	1	2	3	4	5	6
Содержание, % кислоты <i>транс</i> -п-кумаровой	1,60	1,43	1,546	2,1	1,81	1,76
Содержание, % кислоты феруловой	1,16	0,93	1,08	1,60	1,30	1,30
Содержание, % кислоты кофейной	0,352	0,193	0,40	0,44	0,364	0,41

Данные, представленные в таблице 3 свидетельствуют, что содержание кислоты *транс*-п-кумаровой в опытных образцах прополиса находилось в диапазоне 1,43 – 2,1%; кислоты феруловой – 0,93 – 1,6%; кислоты кофейной – 0,193 – 0,44%.

Список использованных источников

1. Писарев, Д.И., Новиков, О.О., Малютина, А.Ю. и др. (2016). Исследование *Glechoma hederacea* L. в рамках научного направления «Фармацевтический ремейк». Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. № 12 (233), вып. 34, С. 181-193.
2. Попова, В.И., Литвиненко, В.И., Куцанян, А.С. (2016). Лекарственные растения мировой флоры: энциклопед. справочник. Харьков: Діса плюс, 540 с.
3. Тихонов, А. И., Ярных Т.Г., Черных В.П., Зупанец, И.А., Тихонова, С.А. (1998). Теория и практика производства лекарственных препаратов прополиса. Харьков: «Основа», 384 с.
4. Хлгатын, С.В., Бержец В.М., Хлгатын, Е.В. (2008). Прополис: состав, биологические свойства и аллергенная активность. Успехи современной биологии. Т. 128. №1, С. 77-88.
5. European Pharmacopoeia, 2014. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France: 2727.