

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
И СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРОПОЛИСА**

Магистерская диссертация
обучающегося по направлению подготовки 04.04.01 Химия
очной формы обучения, группы 11001740
Пискаревой Анны Алексеевны

Научный руководитель:
д. фарм.н., доцент
общей химии
Писарев Д.И.

Рецензент
к. фарм.н., доцент
Шаталов Д.О.

БЕЛГОРОД 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	5
1.1 Краткая характеристика химического состава и фармакологической активности прополиса.....	5
1.2 Аналитические подходы к стандартизации прополиса.....	7
1.3 Области применения прополиса.....	11
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
2.1 Объекты исследования.....	15
2.2 Методы исследования.....	16
2.2.1 Определение состава образцов прополиса с помощью ОФ ВЭЖХ.....	18
2.2.2 Разработка метода абсолютной градуировки для расчета количественного содержания веществ - маркеров.....	19
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	21
3.1 Результаты анализа аптечных образцов прополиса.....	21
3.2 Результаты анализа образцов прополиса разных цветовых форм.....	30
3.3 Оценка количественного содержания фенилэтилового эфира кофейной кислоты в прополисе	40
3.4 Оценка количественного содержания доминирующих гидроксикоричных кислот в прополисе.....	47
3.5 Компонентный состав изученных образцов прополиса.....	51
ВЫВОДЫ.....	55
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

ВВЕДЕНИЕ

Прополис - клейкая смолистая субстанция, собираемая пчёлами с почек деревьев и модифицируемая ими своими ферментами [1]. Этот продукт представляет собой слоистую на изломе массу, может иметь разные цвета от тёмно-зеленого до жёлтого и красного. На вкус горький, жгучий, со смолистым запахом. Прополис представляет собой уникальный продукт, в состав которого входит более 800 веществ. Все они по общности некоторых свойств объединены в четыре группы: смолы, бальзамы, эфирные масла и воск. Установлено, что из всех компонентов прополиса более 25% занимают флавоноиды - апигенин, хризин, кверцетин, кемпферол, галангин, пиностробин и другие, а также феноловые кислоты, такие как феруловая, кофейная, коричная, пара-кумаровая, и другие [2].

В настоящее время известно, что он обладает противовирусным, бактерицидным, противогрибковым, противовоспалительным, иммуностимулирующим, вазопротекторным действием и не только. Данная информация позволяет использовать прополис в лечении заболеваний. [3,4].

В настоящее время различного рода исследования помогают понять, какие именно вещества, содержащиеся в прополисе, помогают при том или ином заболевании. Трудно не согласиться, что абсолютно все вещества прополиса не нужны для лечения одной болезни или купирования симптома. В перспективе, с применением методов разделения смесей веществ, выделения и их очистки, использование хроматографии, можно было бы выделять индивидуальные вещества из прополиса и использовать их в более узком профиле в качестве лекарственных средств.

Ряд фармакологических свойств прополиса прежде всего связан с производными оксикоричных кислот. Один из них - фенилэтиловый эфир кофейной кислоты является важнейшим биоактивным компонентом.

Повышенный интерес к данному соединению вызван в связи с его противоопухолевой, антиоксидантной и цитопротективной активностью. Отсутствие нормативной документации, регламентирующей качество прополиса и единых требований к содержанию биологически активных групп веществ в прополисе, послужило мотивом для определения цели и задач настоящего исследования.

Целью данной работы является разработка аналитических подходов для оценки качества прополиса и препаратов на его основе.

Для достижения намеченной цели необходимо решить ряд *задач*:

1. Осуществить поиск информационного массива по изучаемой тематике;
2. Предложить ряд аналитических методик по установлению химического состава образцов прополиса;
3. Определить и охарактеризовать спектр веществ-маркеров для дальнейшей стандартизации прополиса;
4. Дать количественную оценку содержанию веществ-маркеров для стандартизации прополиса.

Научная новизна и практическая значимость работы заключается в том, что впервые проведена стандартизация образцов прополиса, используя вещества-маркеры, в качестве которых задействованы доминирующие оксикоричные кислоты и их сложные эфиры. Полученные данные можно применить для разработки нормативной документации, регламентирующей оценку качества прополиса

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Краткая характеристика химического состава и фармакологической активности прополиса

Прополис – продукт, производимый рабочими пчёлами для запечатывания улья от воздействия неблагоприятных внешних факторов. Представляет собой массу, неоднородную на изломе, с выраженным смолистым запахом и горько-жгучим вкусом. Он имеет твёрдую, воскообразную консистенцию, которая при температуре ниже 15 °С становится ломкой. В зависимости от компонентов, входящих в состав прополиса, его цветовые оттенки могут варьировать, приобретая зелёную, жёлтую или красную окраску. Прополис обычно умеренно растворим в органических растворителях, таких как спирт, ацетон, хлороформ, пропиленгликоль, бензол, диметилсульфоксид, этилендиамин. В воде практически не растворяется. [5]

Характерным является воздействие температурного фактора на прополис. В температурном диапазоне от 50 до 150 °С наблюдается потеря в массе примерно на 6,0%. При данной температуре прополис «выгорает». Первая фаза характеризуется испарением воды и значительной частью летучих соединений. Следующим этапом является сгорание органических соединений с выходом углекислого газа. При температуре 60-70 °С градусов происходит плавление воска. В широком смысле, воск в составе прополиса обладает хорошей температурной стабильностью до 200 °С, что соответствует температуре плавления. [6-8]

Порода пчел, их физиологическое состояние, этап развития пчелосемьи, флора в радиусе полета пчелы, время года, а также наличие антропогенных факторов – все это влияет на химический состав прополиса.

Состав прополиса чрезвычайно сложен и характеризуется широкой вариабельностью. В состав прополиса входят вещества флавоноидной

природы: флавоны (хризин, тектохризин, лютеолин, апигенин и др.), флавонолы (кверцетин, кемпферол, галангин, рамноцитрин), флавононы (пиноцембрин, пиностробин и др.), гидроксикоричные и фенолокислоты (кофейная, п-кумаровая, феруловая, коричная, ванилиновая и др.). Прополис содержит ненасыщенные жирные кислоты, попадающие с секретом верхнечелюстных желез рабочих пчел. В прополисе также обнаружено большое количество эфирных масел, терпенов, в частности - а-ацетоксибетулиленол, бисаболол, микроэлементов, азотистых соединений – белки, амиды, амины. Могут присутствовать аминокислоты, в частности фенилаланин, гистидин, аспарагиновая, глутаминовая кислоты, триптофан, лейцин, цистин, валин, серин, аргинин, пролин, лизин. Встречается незначительное количество витаминов группы В [9-12] Комплекс биологически активных веществ, входящих в состав прополиса в частности полифенолы обладают антибактериальным, желчегонным, мочегонным, вазопротекторным и противовоспалительным действием [13-18]. Фенолокислоты прополиса оказывают вяжущее действие, способствуют заживлению ран и язв [10-12]. Антибактериальную активность обуславливают бензойная кислота, бензилбензоат, кониферилловый, коричный спирты.

Важнейший активный ингредиент прополиса - фенэтиловый эфир кофейной кислоты (CAPE) - ответственный за развитие таких хорошо известных эффектов прополиса, как антибактериальный, антиоксидантный, противовоспалительный, иммуномодулирующий, противоопухолевый и противовирусный. Он уменьшает синтез простагландинов и лейкотриенов, действуя в качестве мощного противовоспалительного агента, влияет на некоторые медиаторы, прямо ингибирует высвобождение митохондриального цитохрома С, угнетает перекисное окисление липидов, активирует фенолсульфотрансферазу и глутатионтрансферазу, включая молекулы адгезии, цитокины и индуцибельной синтетазы оксида азота [19, 20]. Было установлено положительное воздействие данного соединения в

лечении онкологии, диабета, неврологических заболеваний [21]. В тоже время недавние результаты дают новое понимание молекулярных механизмов, участвующих противовирусном эффекте и деятельности этого природного соединения.

Среди флавоноидов прополиса можно выделить флавонолы, которые являются наиболее распространенными представителями флавоноидов в природе и обладают широким терапевтическим эффектом [22, 23]. Например, кверцетин имеет противовоспалительное действие, понижает факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и позиционируется как агент, подавляющий процессы атерогенеза [24]. Изорамнетин защищает кардиомиоциты от активных форм кислорода, подавляя апоптоз, обладает антиканцерогенными свойствами, индуцируя апоптоз клеток миелоидной эритролейкемии [25]. 3,4'-диметокси-кемпферол, рамнетин, пендулетин проявляют противовоспалительную активность [26]. В свою очередь, галангин способен подавлять факторы, определяющие устойчивость бактерий к антибиотикам [27]. Кемпферол запускает процесс апоптоза клеток рака яичников, имеет выраженные антиоксидантные свойства, что проявляется в подавлении оксидативного стресса [28,29]. Предполагается, что кемпферол обладает противовоспалительным и антиаллергенным действием, препятствует развитию атеросклероза [30-32]. Он также обладает нейропротекторным действием, предотвращая развитие болезни Паркинсона [33]. Кемпферол предотвращает разрушение клеток поджелудочной железы от хронической гипергликемии [34]. В экспериментах *in vivo* кемпферол способен регулировать дифференциацию проадипоцитов, что проявляется в уменьшении разрастания жировой ткани [35].

1.2 Аналитические подходы к стандартизации прополиса

Прополис является достаточно сложным объектом для стандартизации, что связано с колебаниями в его химическом составе [16, 22].

В основном предлагаемые способы оценки качества опираются на стандартизацию по доминирующим компонентам прополиса: флавоноидам [12,36,37], органическим кислотам, воску.

Устанавливают общепринятые параметры, такие как кислотное и эфирное число, число омыления и йодное число, рН и органолептические характеристики.

Стандартизацию прополиса проводят различными методами. Например, существует методика ТСХ анализа и УФ-спектрофотометрии в пересчёте на пиностробин. Описан также способ стандартизации прополиса по пиностробину с помощью метода ВЭЖХ [12, 36]. В официальном препарате (настойке) и субстанции прополиса рекомендовались реакции с железом (III) хлоридом, цианидиновая проба [12].

Экспериментально доказана возможность стандартизации лекарственных препаратов на основе продукта пчеловодства-прополиса методом ВЭЖХ.

Для полноценного использования препаратов на основе продуктов пчеловодства в медицинской практике необходимо четко осознавать тот факт, что стандартизация и совершенствование методов контроля качества вышеуказанных препаратов является важнейшим условием их эффективного применения.

Следует отметить, что прополис входит в ряд мировых фармакопей. Например, ФС «Прополис» существует в фармакопее Китая, где его идентификацию рекомендуют проводить методом ТСХ в пересчёте на галангин и хризин. Фармакопейной статьи на прополис в отечественной фармакопее пока не существует, однако в РФ зарегистрировано 6 предприятий-производителей препаратов на основе прополиса. Отечественные производители препаратов на основе прополиса пользуются ГОСТ 28886-90 «Прополис. Технические условия», ранее использовалась также и ВФС 42-1084-81 «Прополис».

В указанной нормативной документации для идентификации фенольных соединений, входящих в состав прополиса включены две реакции: цианидиновая проба и взаимодействие со свинца (II) ацетатом. Естественно, что такой подход к определению качества прополиса при современном уровне развития фармацевтической отрасли не может быть признан объективным. Поэтому в настоящее время для оценки качества прополиса используют в основном физико–химические методы анализа [26].

Например, метод УФ-спектрофотометрии при стандартизации прополиса базируется на том, что одной из групп флавоноидов в его составе являются флавононы, поглощающие, как известно в области 290 нм. Спиртовые растворы некоторых образцов прополиса также имеют указанную длину волны. Однако, в данном случае не учитываются другие группы веществ и их вклад в поглощение. Поэтому такую методику вряд ли можно признать объективной.

Существует еще один альтернативный метод в ГОСТ Р 55312-2012 [38]. Определение флавоноидных соединений в прополисе данного ГОСТа предлагает использовать спектрофотометрический метод определения флавоноидов в прополисе в пересчете на рутин.

1.3 Области применения прополиса

Терапевтические свойства прополиса известны очень давно. В древности прополис использовали в качестве вяжущего, обволакивающего, кровоостанавливающего средства [39]. Прополис обладает многочисленными фармакологическими эффектами. Антибактериальные и противовирусные свойства прополиса связывают в первую очередь с входящими в его составе веществами терпеноидной и флавоноидной природы. Антибактериальные свойства прополиса используют в гинекологии, при некоторых заболеваниях, в частности эрозии, кольпите, эндоцервиците [40]. Широкое применение прополис находит в стоматологии при гингивитах, стоматитах, глосситах [41], парадонтозе [42], а также в оториноларингологии при фарингитах,

ларингитах и тонзиллитах [22]. Прополис входит в состав некоторых лечебных и профилактических зубных паст, как противокариозное средство.

У препаратов прополиса обнаружены противовирусные свойства в отношении вируса герпеса [43], опоясывающего лишая [44], папилломатоза [45].

Обширный полифенольный состав, в первую очередь флавоноиды обуславливает антиоксидантные свойства прополиса [46,47]. Высокой антиоксидантной активностью также отличаются гидроксикоричные кислоты, входящие в состав прополиса [48]. Указанные свойства прополиса используются не только в терапевтических целях, но и в пищевой промышленности в качестве консерванта [49].

Известные кардиопротекторные свойства прополиса. Кофейная кислота в составе прополиса обладает гипотензивным [50], антикоагулянтными [51], противоишемическими и антиаритмическими свойствами [40].

Прополис обладает гипогликемическим действием [41]. Извлечения из прополиса оказывают превентивное действие при обусловленной диабетом нефропатии, диабетической ангиопатии [42].

С помощью прополиса и прополисосодержащих препаратов возможно лечение онкологических заболеваний внутренних органов, судя по найденным исследованиям. Механизм действия прополиса связывают с активизацией апоптоза амитотических клеток, усилением токсической активности Т-киллеров в отношении опухолевых клеток [44,45]. Существуют исследования, подтверждающие превентивное действие зелёного прополиса в отношении возникновения рака мочевого пузыря [46]. Противоопухолевые свойства выявлены в том числе и у мексиканского прополиса [47]. Такие же свойства выявлены в, так называемом, средиземноморском прополисе [48]. Выраженные противоопухолевые свойства обнаружены у китайского, индийского прополиса и прополиса из Туниса. У мексиканского прополиса определены цитотоксические свойства против опухолей поджелудочной железы [47]. Прополис предупреждает развитие и лечит рак простаты [41].

Противоопухолевый и туморопротективный эффекты прополиса обусловлены флавонооидами хризином, пинобанксином, а также оксикоричными кислотами (п-кумаровой, кофейной) [49].

В офтальмологии прополис показал эффективность при неоваскуляризации роговой оболочки глаза [53], а также при алкогольной дистрофии роговой оболочки глаза [54].

В гастроэнтерологии прополис используется как антиульцерогенный агент, ингибирующий фермент деформилазу основного возбудителя язвенной болезни *Helicobacter pylori* [55]. Прополис ускоряет процесс репарации экспериментальной язвы желудка [56].

В ветеринарии прополис показал эффективность при лечении остеосаркомы собак [57].

Терпеноидный комплекс прополиса обладает выраженным анальгезирующим действием, превосходящим по активности многие местные анестетики. [58].

В косметологии прополис нашёл применение как фотопротективный агент, используемый в производстве кремов от загара [61].

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования взяты 7 опытных образцов прополиса в виде комков из пасек разных регионов России (табл. 2.1). Были использованы образцы жёлтого и зелёного цветов образцов прополиса.

Таблица 2.1.

Образцы прополиса в виде комков

№	Место сбора	Год, месяц сбора
1	с. Бессоновка, Белгородская область	2018 г., август
2	Михайловский р-н, Волгоградская область	2017 г., июль-август
3	Липецкая область	2016 г.
4	Ставропольский край	2016 г.
5	п. Разумное, Белгородская область	2017 г., август
6	с. Красный Октябрь, Белгородская область	2018 г., июль-август
7	Корочанский р-н, Белгородская область	2018 г., июль-август

Опытные образцы прополиса экстрагировали спиртом этиловым 80%-ным. Для приготовления извлечений использовали метод мацерации, для этого по 1,0 г измельченных образцов прополиса, переносили в конические колбы вместимостью 250 см³, заливали 100 мл спирта этилового 80%-ного, закрывали пробками и настаивали сутки.

Полученные извлечения фильтровали в мерные колбы, вместимостью 100 мл, доводили тем же экстрагентом до метки по необходимости и использовали для непосредственного анализа.

В качестве образцов сравнения были использованы 6 аптечных образцов прополиса (табл. 2.2.).

Таблица 2.2.
Настойки прополиса

№	Производитель	Адрес производителя	Дата изготовления
1	ЗАО «ВИФИТЕХ»	Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск, ГНЦ ПМ (ЛП-000515)	5.08.2017
2	ООО «БЭГРИФ»	г. Бердск, ул. Химзаводская, д.11, кв. 19	18.09.2016
3	ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика»	г. Иваново, ул. Генерала Горбатова, д. 19-а	20.07.2017
4	ООО «Гиппократ»	г. Самара, ул. Октинская, д.10 кв.13 (ЛСР – 007054/09)	3.07.2016
5	ЗАО «МосФарма»	г. Москва, Фармацевтический проезд, д.1	14.08.2016
6	ОАО «Татхимфармпрепараты»	г. Казань, ул. Беломорская, д. 260 (Р.№ЛС – 000448)	25.07.2017

2.2 Методы исследования

Реализация исследований осуществлялась с помощью метода обращенно – фазовой Высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиентном режиме элюирования.

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «*Agilent Technologies 1200 Infinity*» производства США с автоматическим пробоотборником *Agilent 1200*, дегазатором, градиентным насосом и термостатом той же серии. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей серии *Agilent 1200* (диапазон длин волн от 190 до 950 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм; объемом 13 мкл), шаг сканирования - 2 нм.

Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «*Agilent Chem Station*».

Для испытаний использовали стальную хроматографическую колонку *Ascentis express C₁₈ 2,7μм × 100 мм × 4,6 мм*.

Для приготовления подвижных фаз использовали следующие растворители: воду сверхчистую (для жидкостной хроматографии), спирт этиловый (по ГОСТ Р 51652), кислоту муравьиную (квалификация х.ч. по ГОСТ 61).

Эффективность колонки определяли вычислением числа теоретических тарелок *N*. Чем выше эффективность, тем больше эта величина и меньше расширение пика первоначально узкой полосы по мере продвижения ее через колонку, тем уже пик на выходе из колонки[4]. В качестве оптимального критерия эффективности колонки использована величина - не менее 5000 [10].

Расчет числа теоретических тарелок проводили по формуле 2.1:

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_r}{\mu_{0.5}} \right)^2, \quad (2.1)$$

где t_r - время удерживания определяемого вещества, мм;

$\mu_{0.5}$ - ширина на половине высоты пика, мм.

Основным критерием оценки адекватного разделения соседних пиков служил коэффициент разделения R_s . При этом пики должны быть разделены

по базовой линии. Коэффициент разделения R_s , должен быть не менее 1,5 согласно Европейской Фармакопее [10].

Коэффициент разделения пиков R_s вычисляли по формуле 2.2:

$$R_s = \frac{\Delta l}{\mu_{0,5(1)} + \mu_{0,5(2)}}, \quad (2.2)$$

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 путём расчёта коэффициента асимметрии пика (T_f) по формуле 2.3:

$$T_f = \frac{\mu_{0,05}}{2 \times f}, \quad (2.3)$$

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.

Оптимальной величиной коэффициента асимметрии T_f принят показатель – менее 2.

подвижная фаза: 1,0%-ный водный раствор кислоты муравьиной (А) – спирт этиловый 95%-ный (Б) в градиентном режиме элюирования;

Колонка: *Ascentis express C₁₈* 2,7μм, 100 мм × 4,6 мм.

Скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

Температура колонки +35 °С;

Объём вводимой пробы 1 μл.

Состав подвижной фазы программировали в условиях, указанных в таблице 2.3..

2.2.1 Определение состава образцов прополиса в помощью ОФ ВЭЖХ

Состав подвижной фазы программировали в условиях, указанных в таблице 2.3.

Таблица 2.3.

Условия градиентного элюирования

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

Детектирование осуществляли при длинах волн: 268, 290, 310, 325, 336 нм - для флавонов, 350, 360, 375 нм – для флавонолов.

Идентификацию компонентов осуществляли по совпадению времён удерживания анализируемых веществ со стандартными образцами, зафиксированных в аналогичных условиях эксперимента и по результатам диодно-матричного детектирования.

Относительное содержание индивидуальных флавоноидов рассчитывали методом внутренней нормализации, то есть определяли, как отношение площади хроматографического пика и суммы площадей пиков всех идентифицированных флавоноидов по формуле 2.4:

$$X_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S}, \quad (2.4)$$

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

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

2.2.2 Разработка методики количественного содержания веществ - маркеров

Фенэтиловый эфир кофейной кислоты и гидроксикоричные кислоты.

Анализируемые образцы экстрагировали методом мацерации в соотношении 1:10 80%-ым этиловым спиртом.

Изготовленные извлечения отстаивали, фильтровали и хроматографировали. Условия хроматографирования такие же, как указаны в разделе 2.2.1.

Для анализа использовался градиентный режим элюирования (условия представлены в таблице 2.3.), поскольку присутствие родственных соединений, то есть других сложных эфиров кофейной кислоты, имеющих близкую полярность, не позволяет эффективно определять данный компонент в изократическом режиме элюирования.

Эффективность экстракции оценивали путём сравнения площадей пиков фенилэтилового эфира кофейной кислоты и гидроксикоричных кислот у полученных извлечений.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В задачи настоящей работы входило обнаружение спектра веществ, по которым можно будет стандартизовать прополис. Для этого были исследованы аптечные образцы прополиса и приготовленные этанольные извлечения образцов прополиса в виде комков, собранные из разных пчелиных ульев России. В первоначальных экспериментах были исследованы образцы с аптеки, хроматограммы представлены в разделе 3.1. Ожидалось, что это послужит базовым толчком для определения основных групп веществ, по которым можно будет в дальнейшем выявить вещества-маркеры. Это было прежде всего необходимо выяснить. Как видно из рисунков 3.1 – 3.17. результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса с помощью диодно-матричного детектирования, в образцах были обнаружены оксикоричные кислоты, флавононы, флавонолы и халконы, флавоны, фенолокислоты и альдегиды, эфиры и пренильные производные кофейной и п-кумаровой кислот. Пики идентифицировали по стандартным образцам.

3.1 Результаты анализа аптечных образцов прополиса

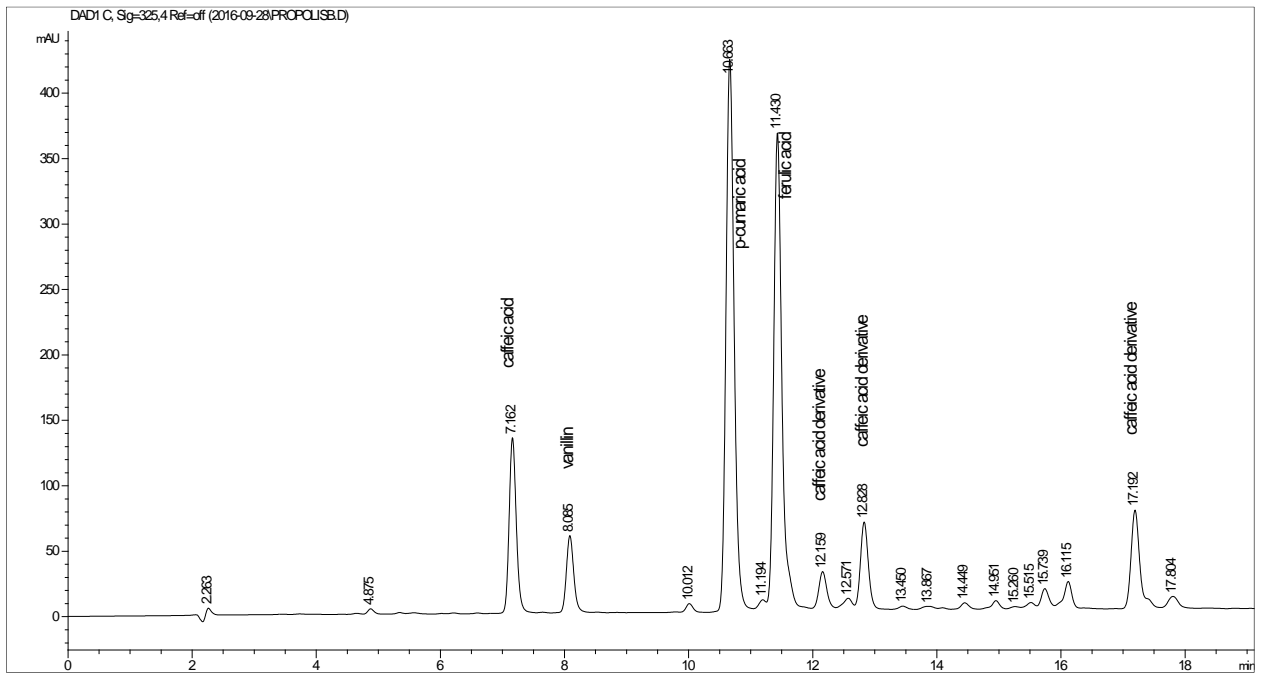


Рис. 3.1. Хроматограмма прополиса (производство ЗАО «ВИФИТЕХ») при диодно-матричной детекции $\lambda = 325$ нм - оксикоричные кислоты

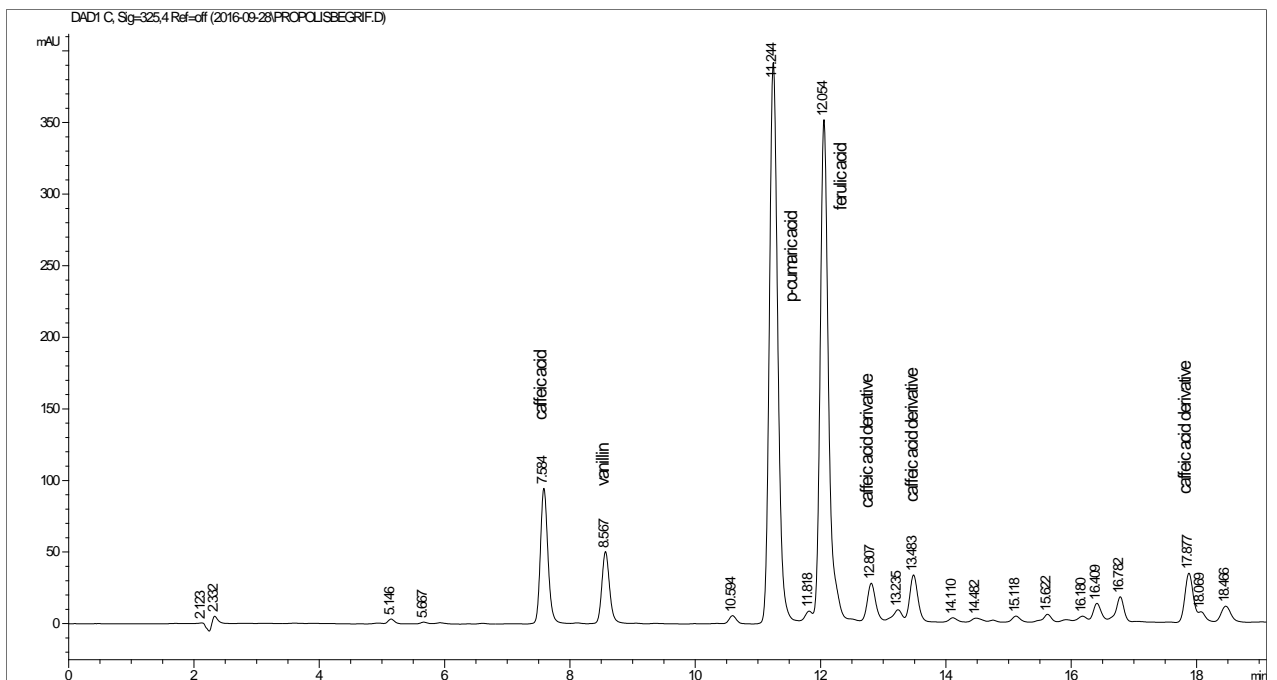


Рис. 3.2. Хроматограмма прополиса (производство ООО «БЭГРИФ») при диодно-матричной детекции $\lambda = 325$ нм - оксикоричные кислоты

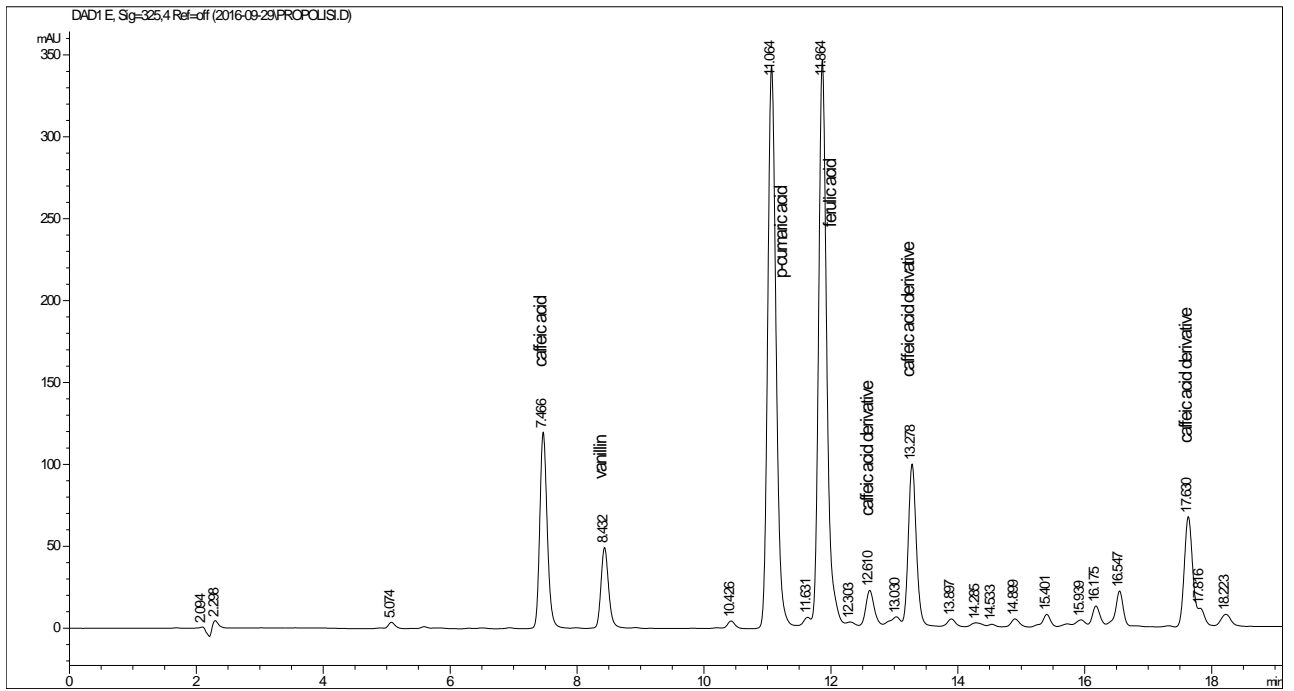


Рис. 3.3. Хроматограмма прополиса (производство ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика») при диодно-матричной детекции $\lambda = 325$ нм - оксикоричные кислоты

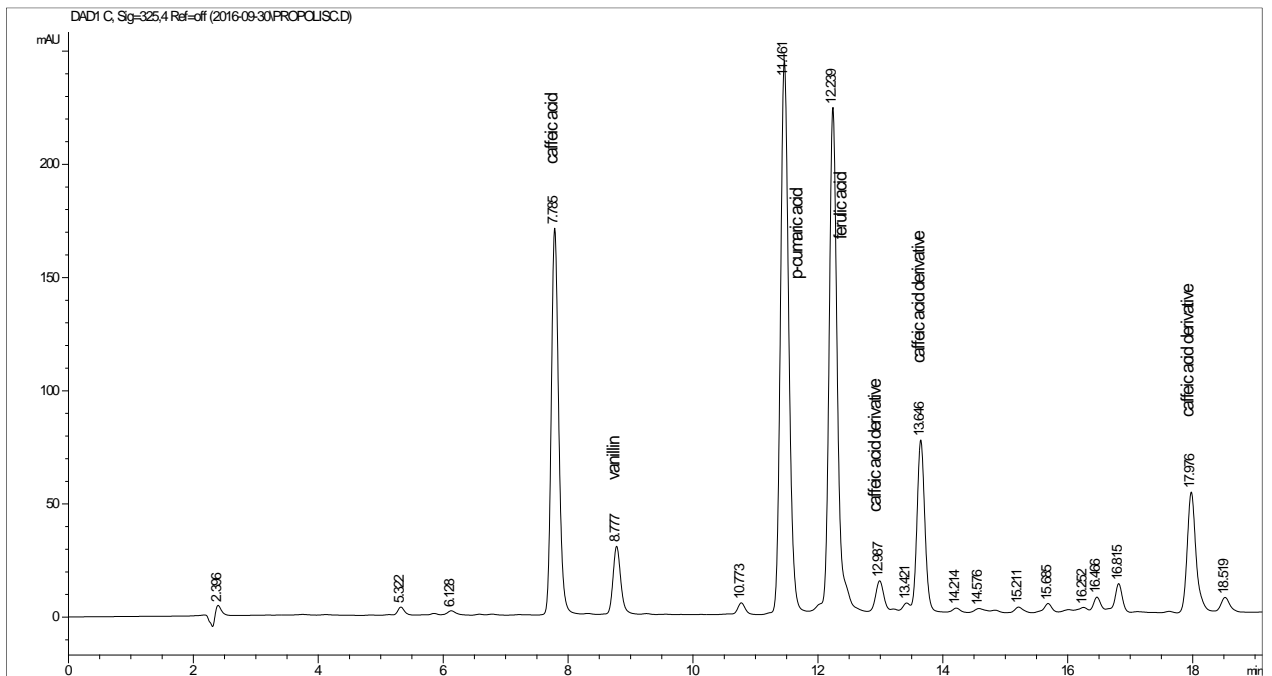


Рис.3.4. Хроматограмма прополиса (производство ООО «Гиппократ») при диодно-матричной детекции $\lambda = 325$ нм - оксикоричные кислоты

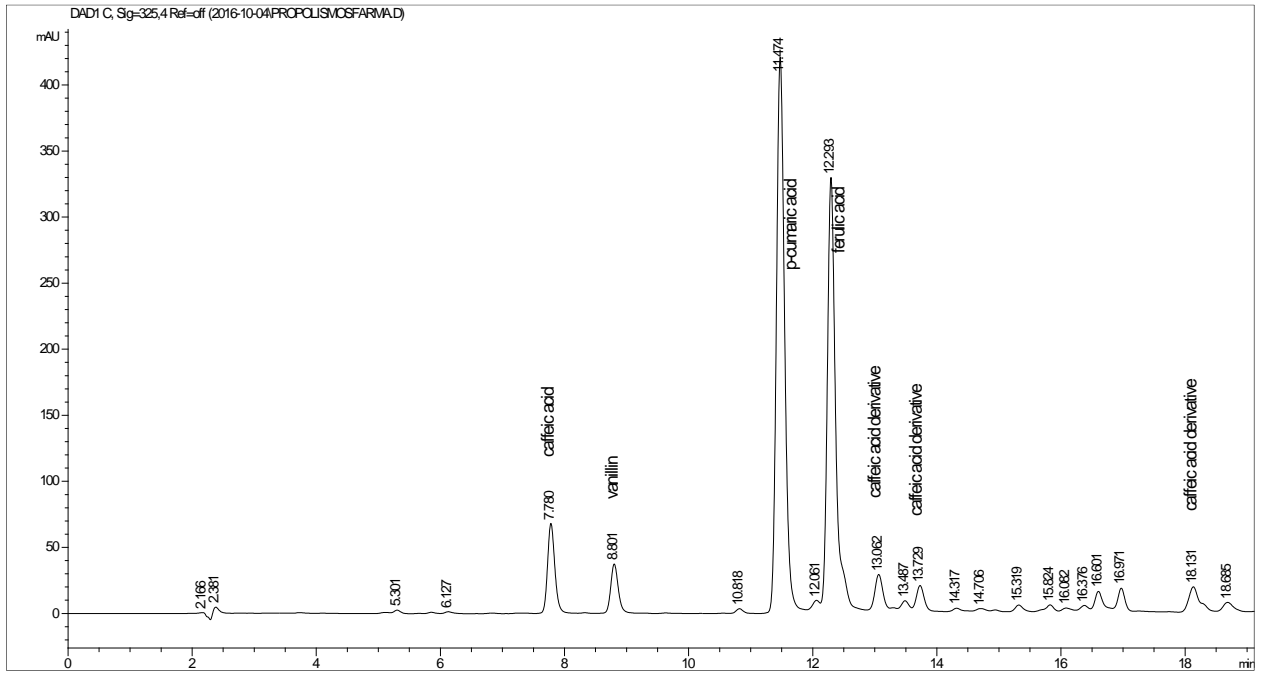


Рис.3.5. Хроматограмма прополиса (производство ЗАО «МосФарма») при диодно-матричной детекции $\lambda = 325$ нм - оксикоричные кислоты

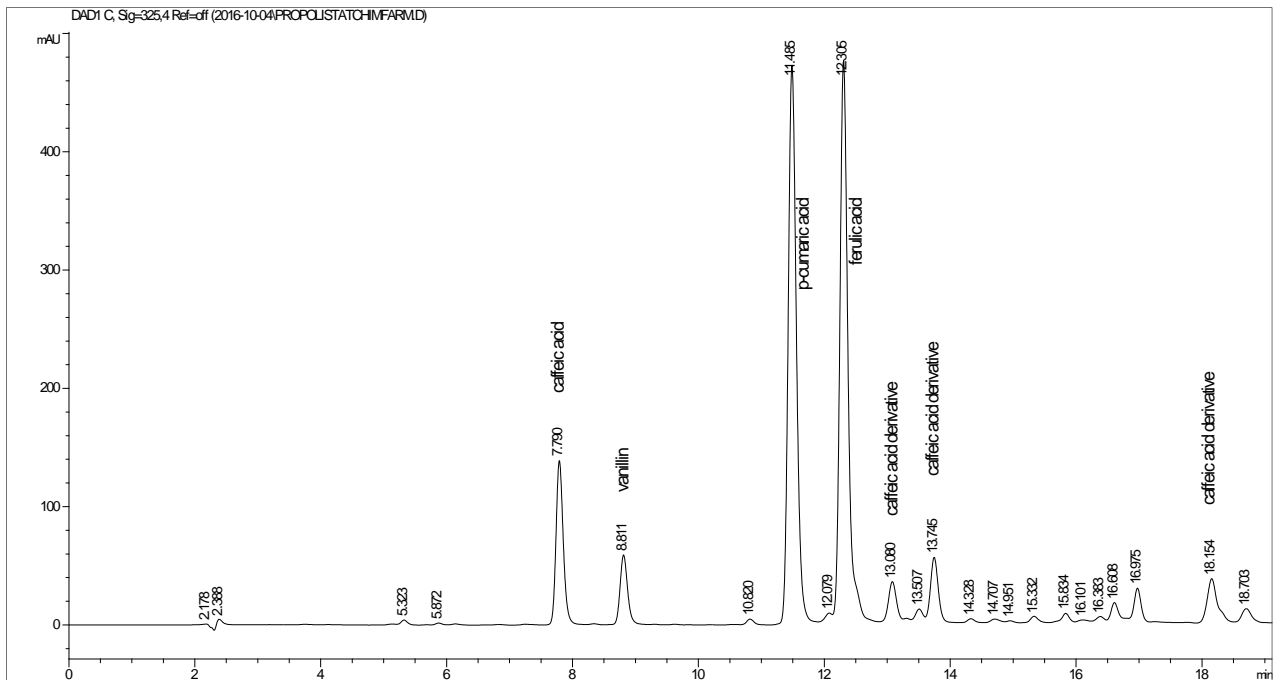


Рис. 3.6. Хроматограмма прополиса (производство ОАО «Татхимфармпрепараты») при диодно-матричной детекции $\lambda = 325$ нм - оксикоричные кислоты

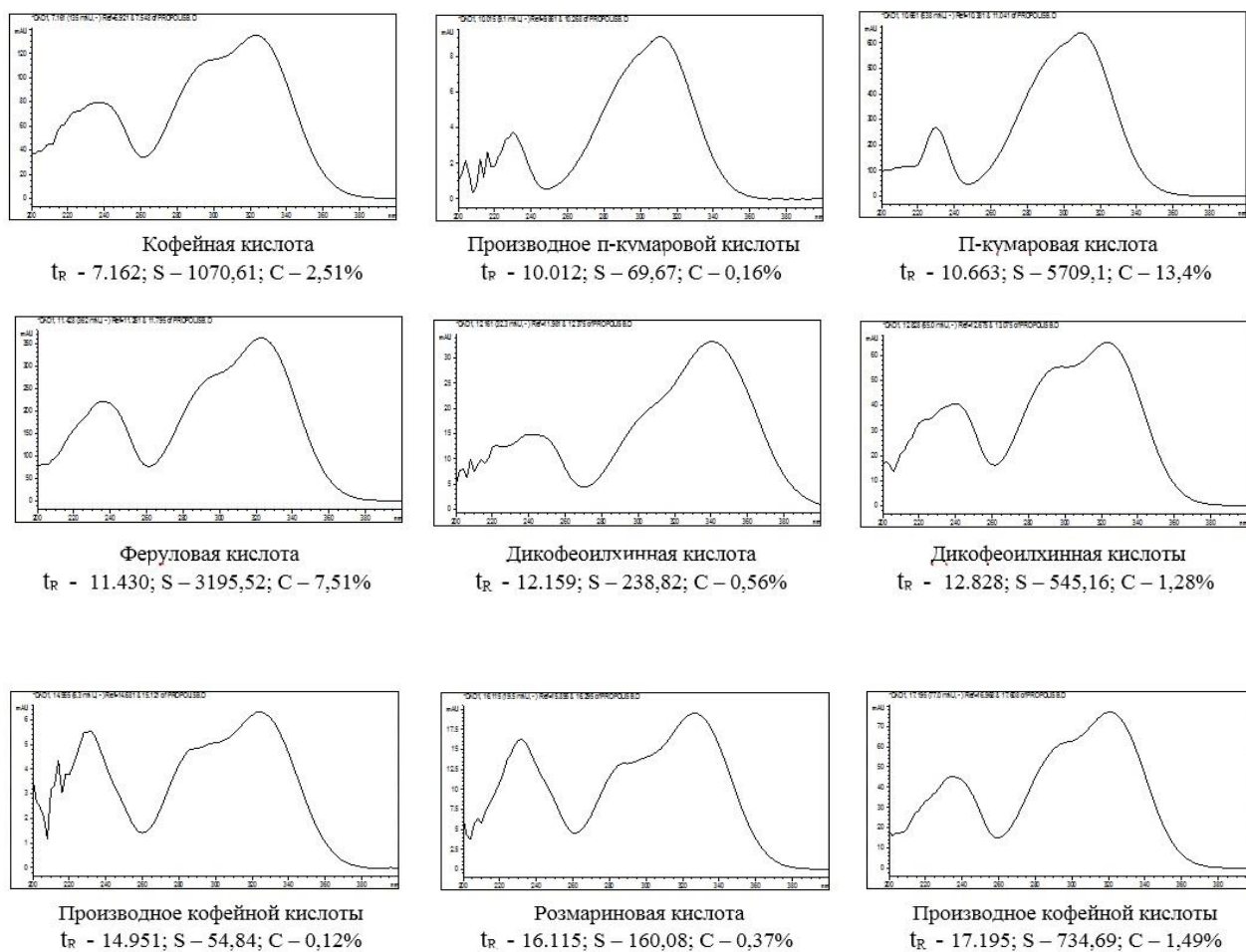


Рис. 3.7. Результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса при длине волны $\lambda = 325$ нм диодно-матричного детектирования (оксикоричные кислоты)

Результаты показывают, что доминирующими компонентами среди оксикоричных кислот являются п-кумаровая, феруловая и кофейная кислоты.

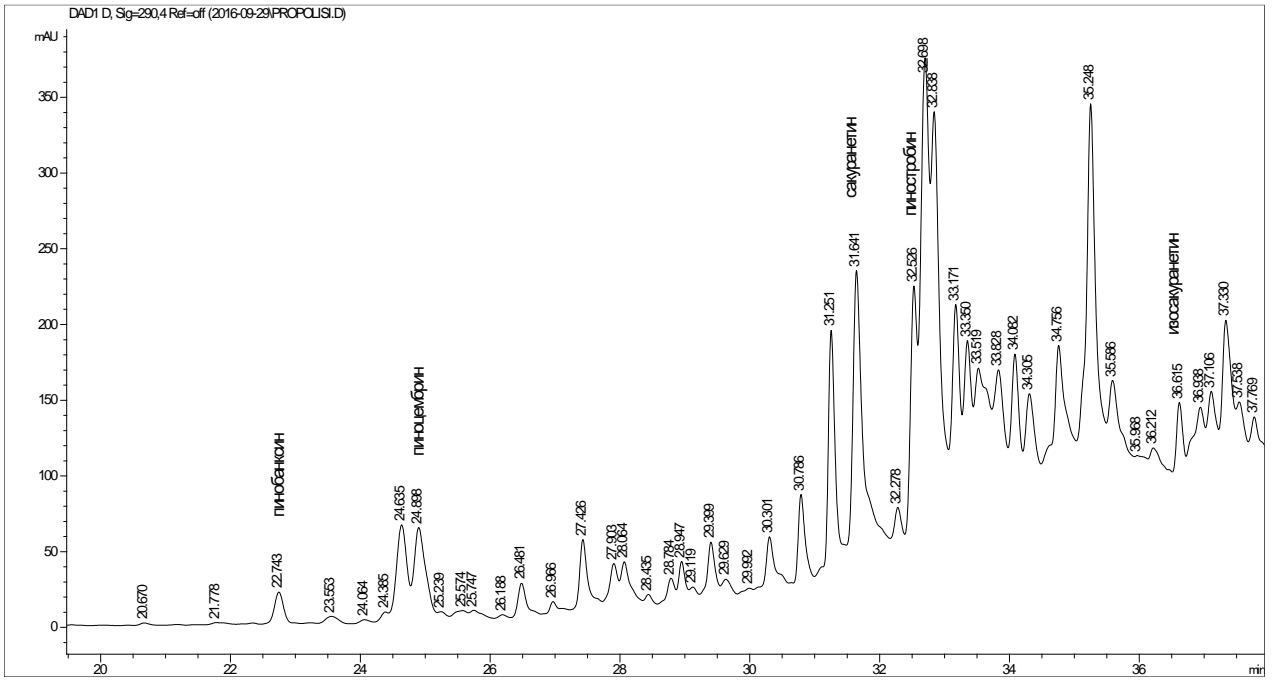
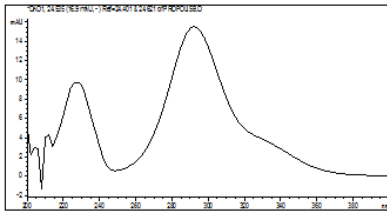
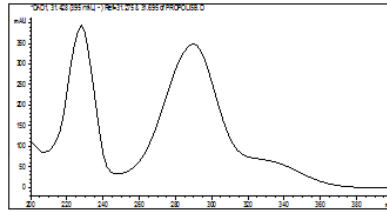


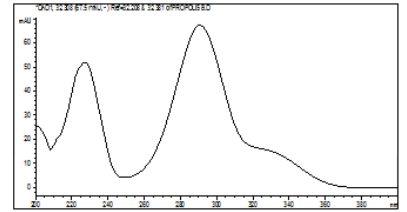
Рис. 3.8. Хроматограмма прополиса при диодно-матричной детекции $\lambda = 289$ нм - флаваноны



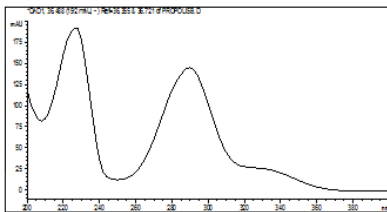
Пиноцембрин
 $t_R - 24.538; S - 106,42; C - 0,25\%$



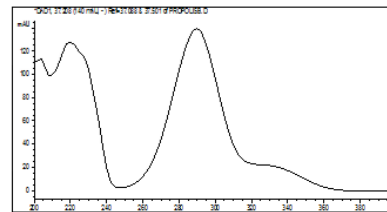
Сакуранетин
 $t_R - 31.427; S - 3044,2; C - 7,15\%$



?
 $t_R - 32.311; S - 363,58; C - 0,85\%$



Исокуранетин
 $t_R - 36.488; S - 1176,8; C - 2,76\%$



Пиностробин
 $t_R - 37.209; S - 1139,0; C - 2,67\%$

Рис. 3.9. Результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса при длине волны $\lambda = 289$ нм диодно-матричного детектирования (флаваноны)

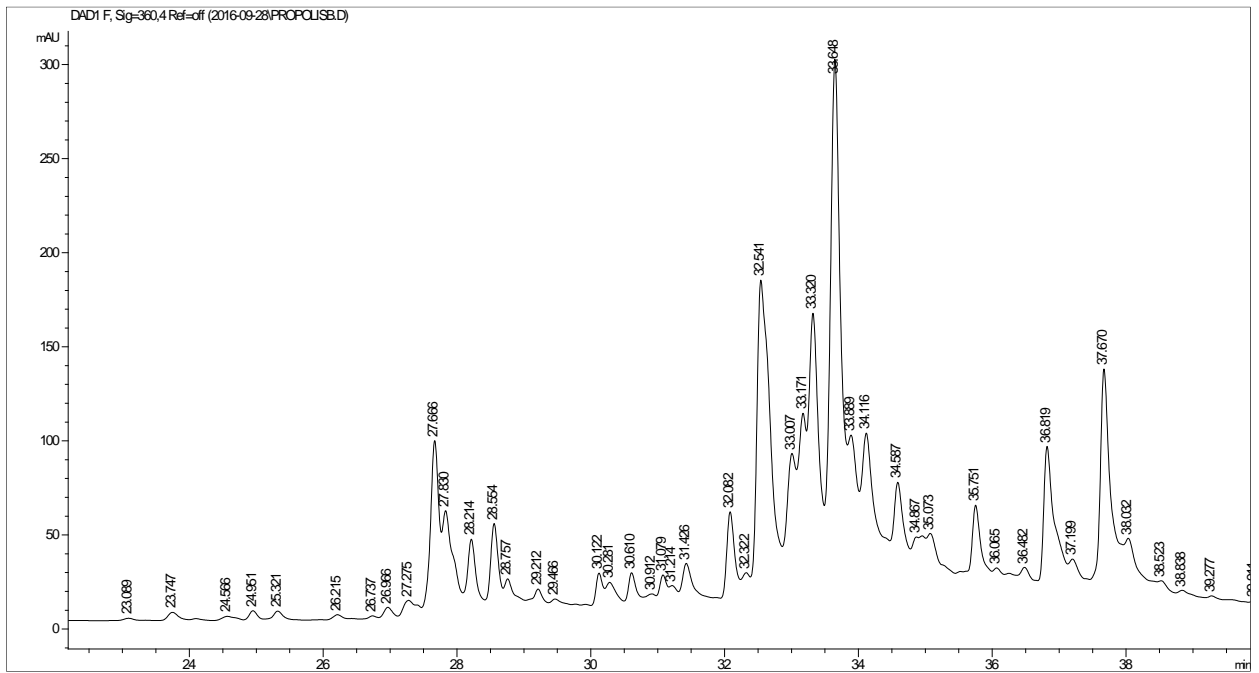
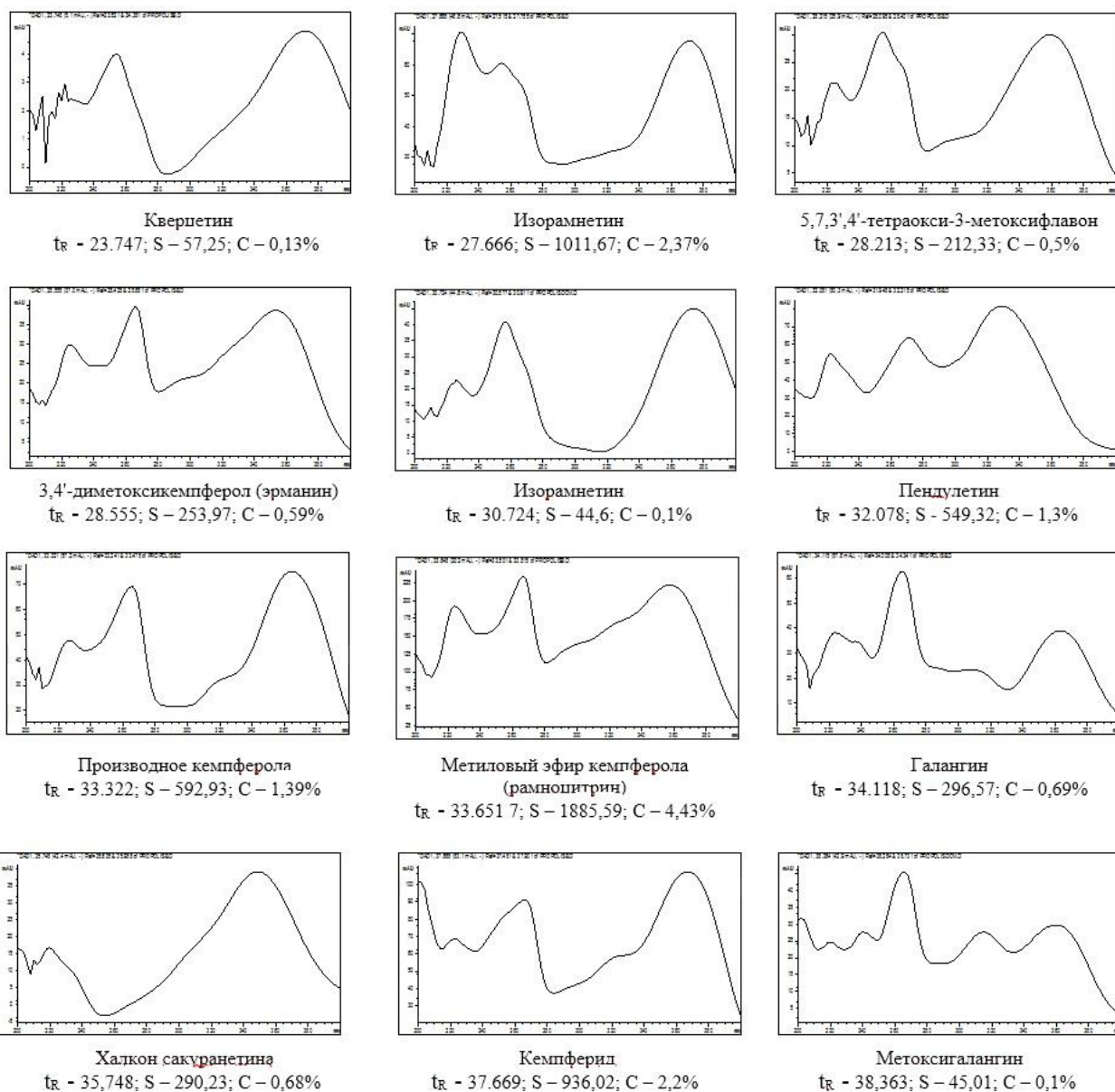


Рис. 3.10. Хроматограмма прополиса, зарегистрированная при $\lambda = 360$ нм диодно-матричного детектирования – флавонолы и халконы



* t_R – время удерживания, мин; S – площадь пика компонента на хроматограмме; C – процент от общей суммы веществ

Рис. 3.11. Результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса при длине волны $\lambda = 360$ нм диодно-матричного детектирования (флавонолы и халконы)

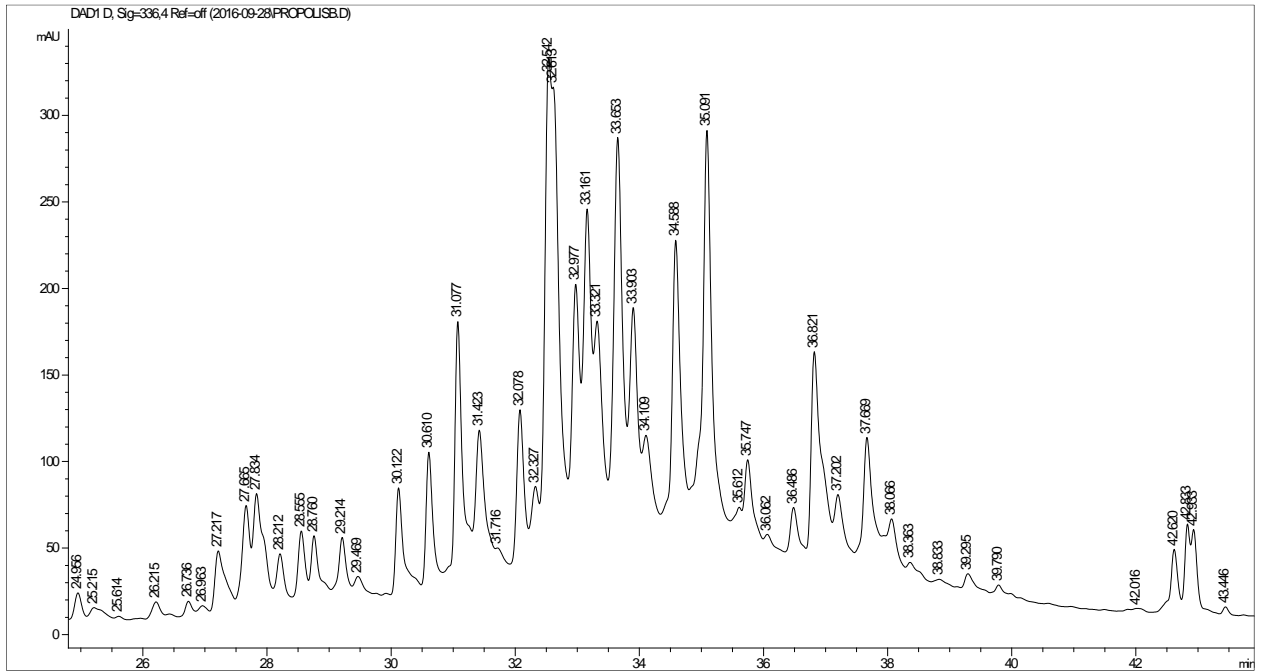


Рис.3.12. Хроматограмма прополиса при диодно-матричной детекции $\lambda = 336$ нм – флавоны

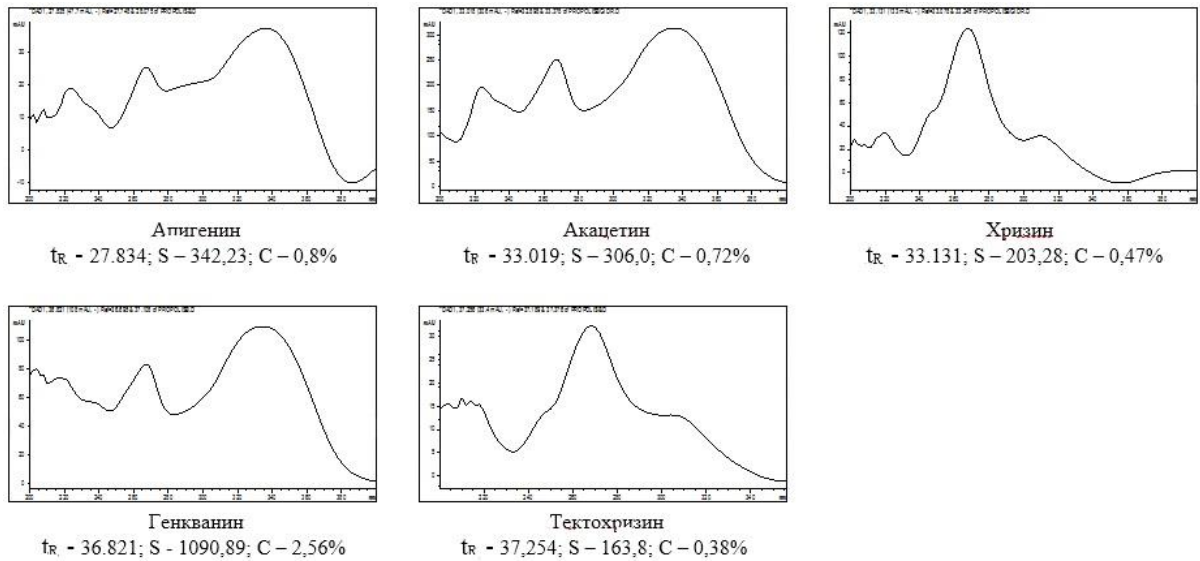


Рис.3.13. Результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса при длине волны $\lambda = 336$ нм диодно-матричного детектирования (флавоны)

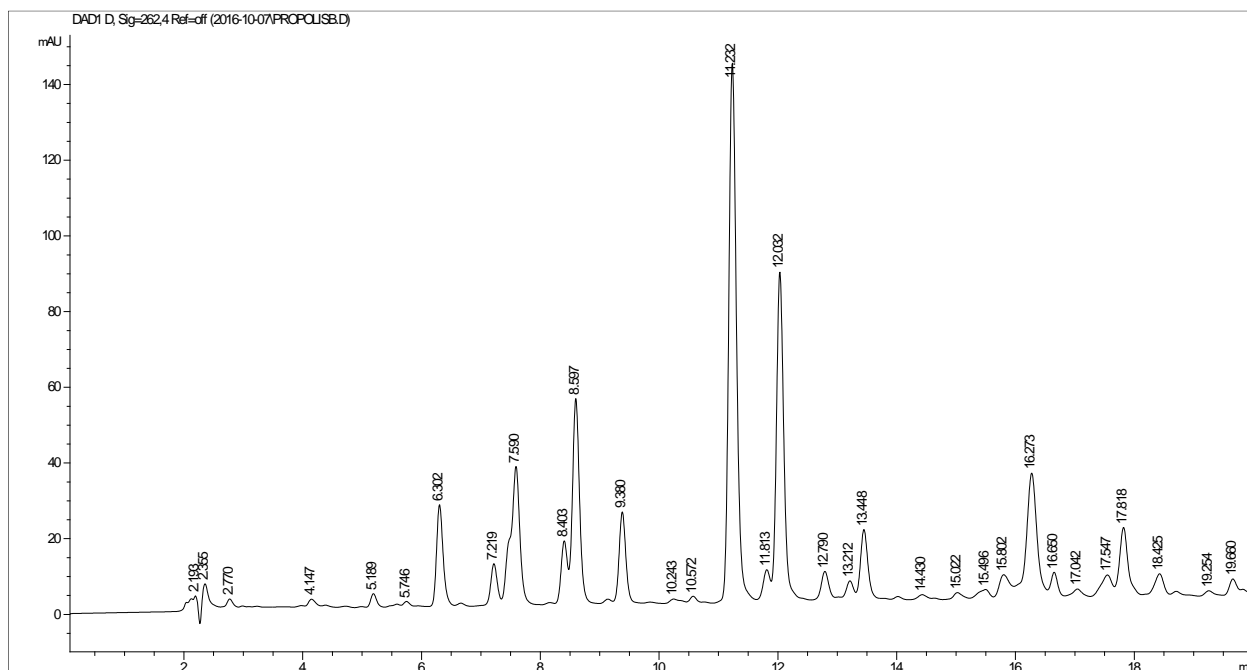


Рис. 3.14. Хроматограмма прополиса, зарегистрированная при длине волны $\lambda = 260$ нм диодно-матричного детектирования (фенолокислоты и альдегиды)

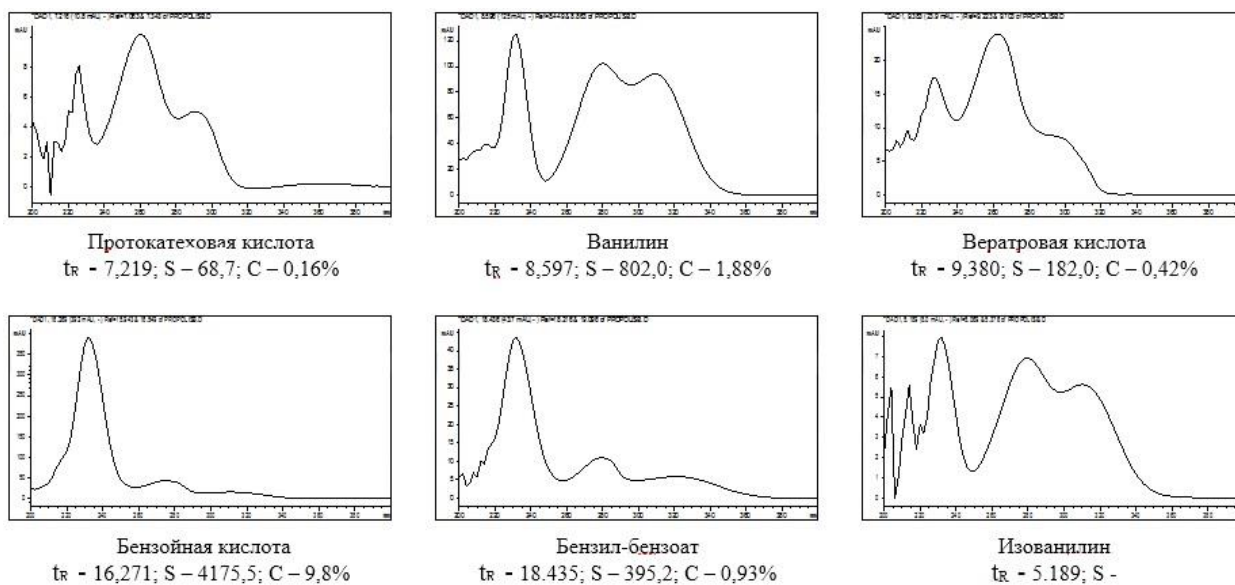


Рис.3.15. Результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса при длине волны $\lambda = 260$ нм диодно-матричного детектирования (фенолокислоты и альдегиды)

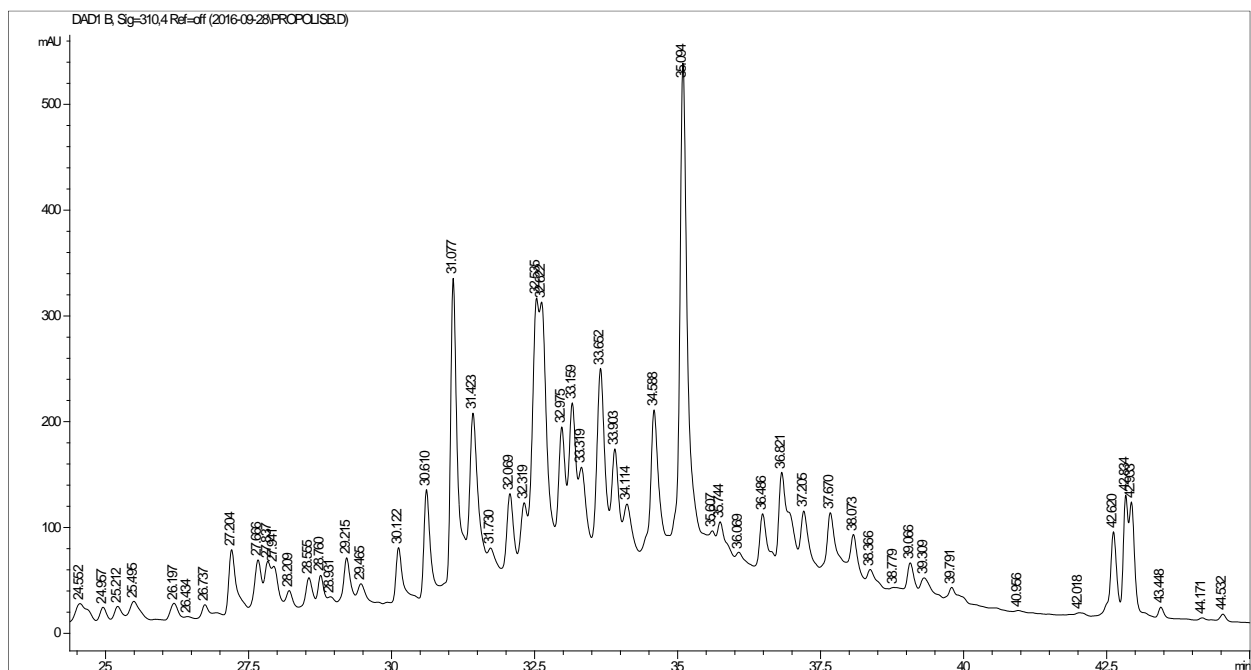


Рис. 3.16. Хроматограмма прополиса, зарегистрированная при длине волны $\lambda = 310$ нм диодно-матричного детектирования (эфирные и пренильные производные кофейной и п-кумаровой кислот)

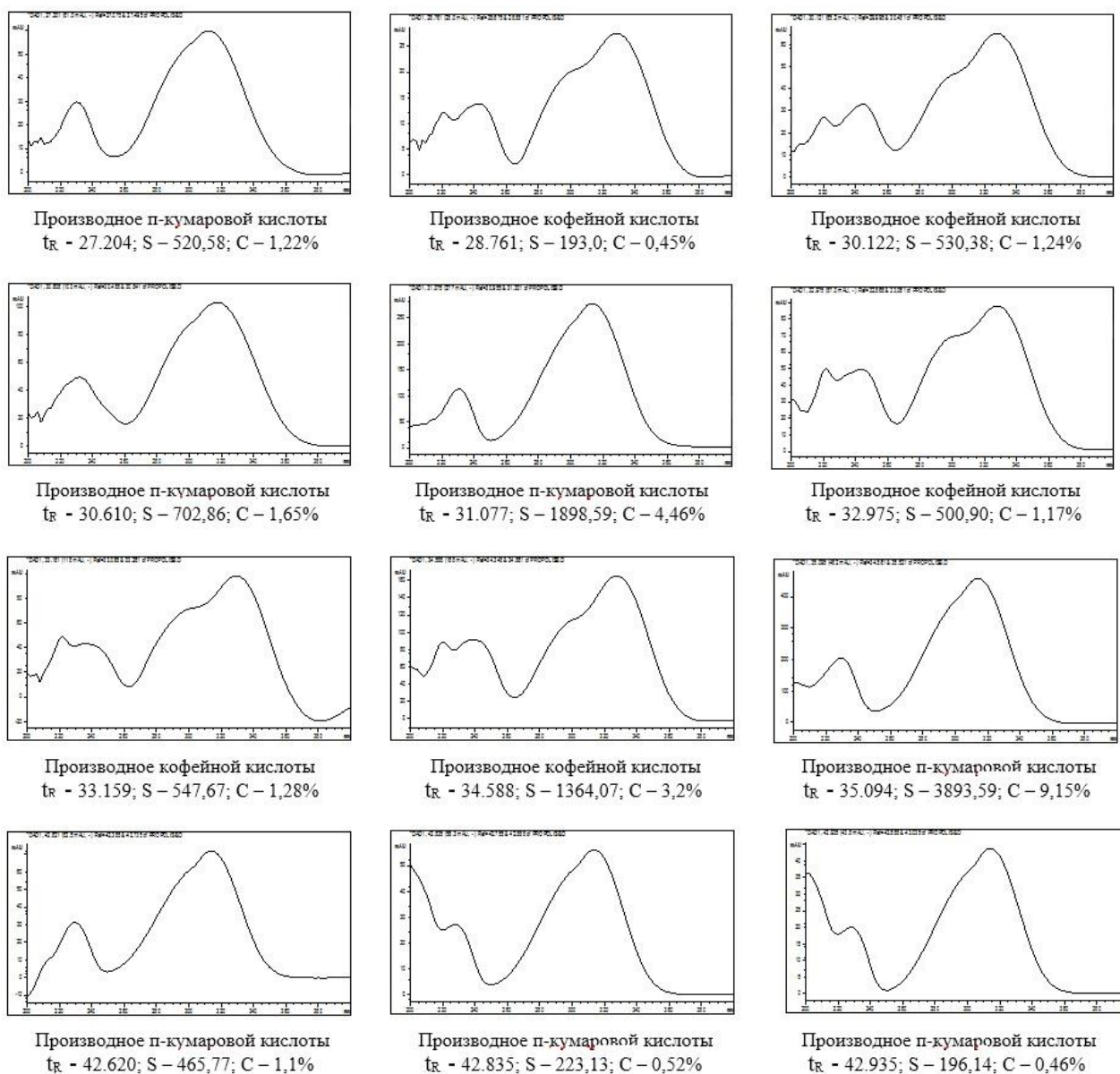


Рис. 3.17. Результаты расшифровки УФ-спектров компонентов прополиса при длине волны $\lambda = 310$ нм диодно-матричного детектирования (эфирные и пренильные производные кофейной и п-кумаровой кислот)

3.2 Результаты анализа образцов прополиса разных цветовых форм

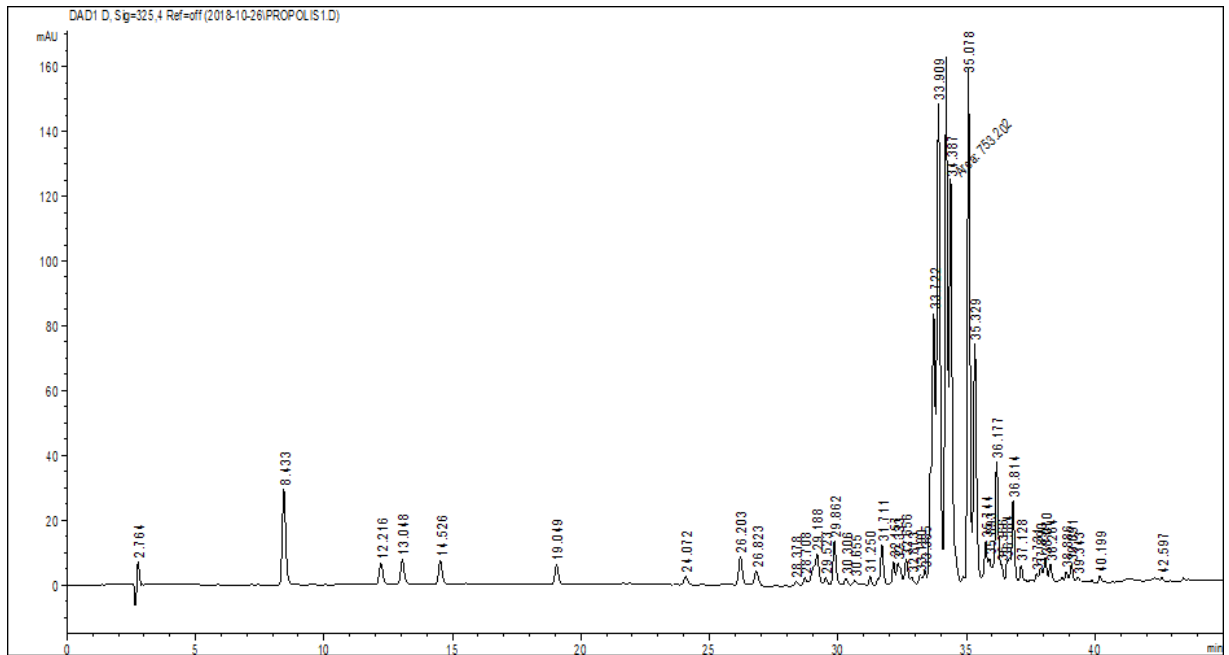


Рис. 3.18. Хроматограмма этанольного извлечения образца №1

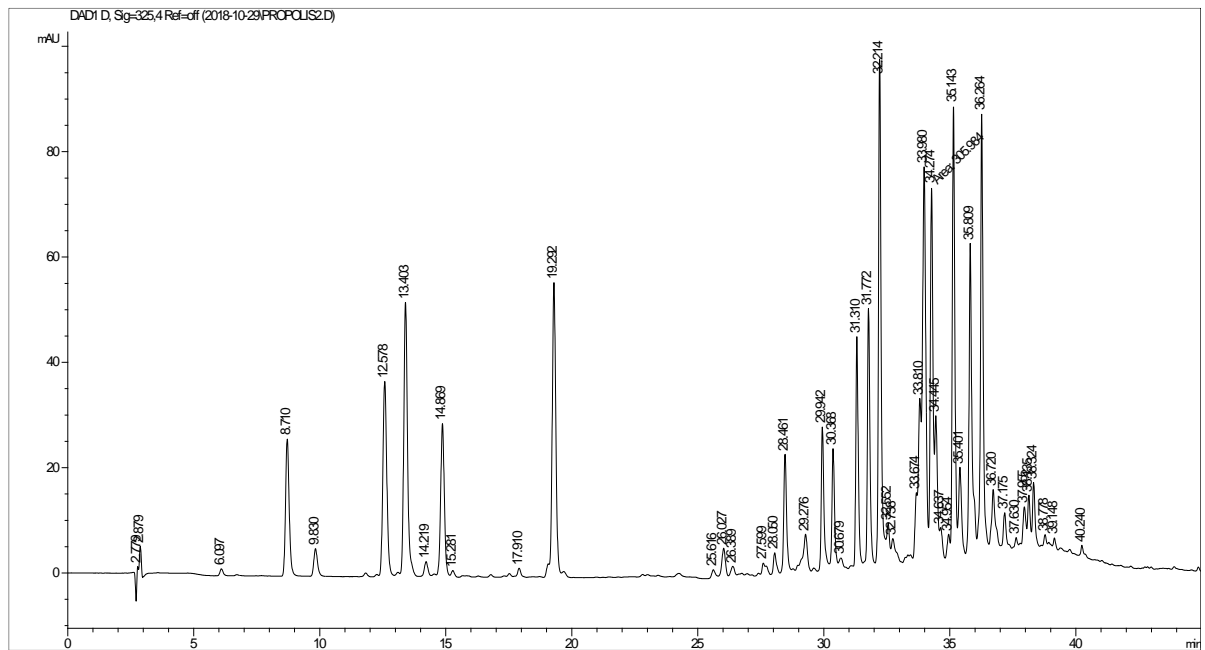


Рис. 3.19. Хроматограмма этанольного извлечения образца №2

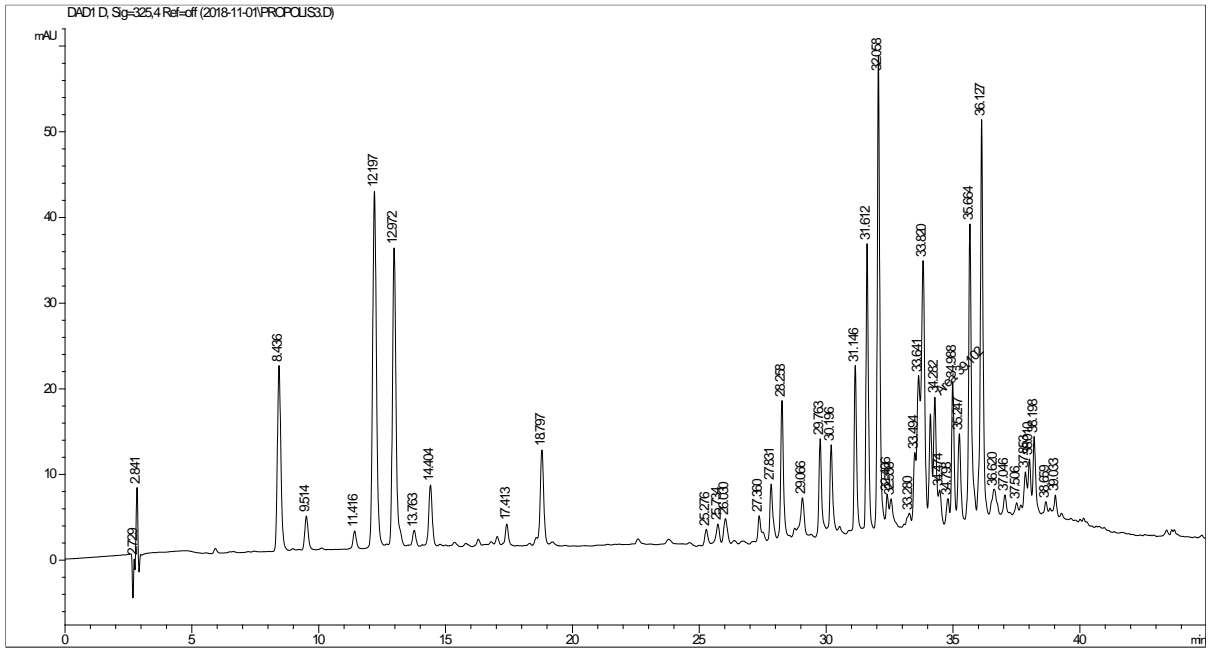


Рис. 3.20. Хроматограмма этанольного извлечения образца №3

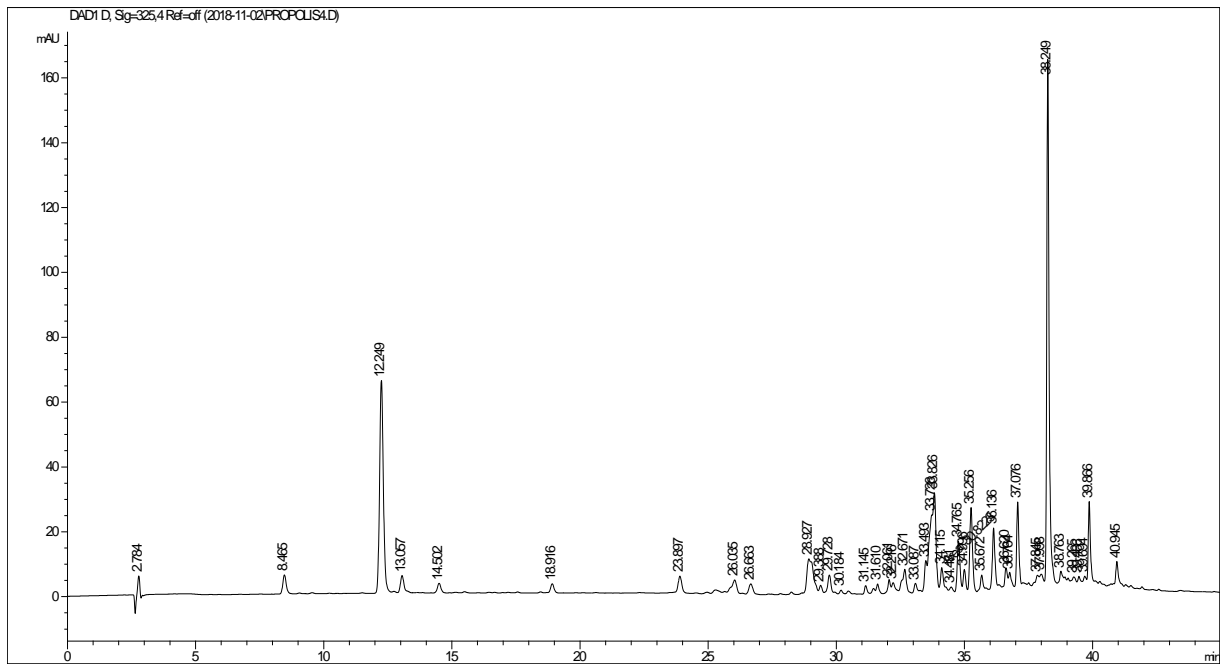


Рис. 3.21. Хроматограмма этанольного извлечения образца №4

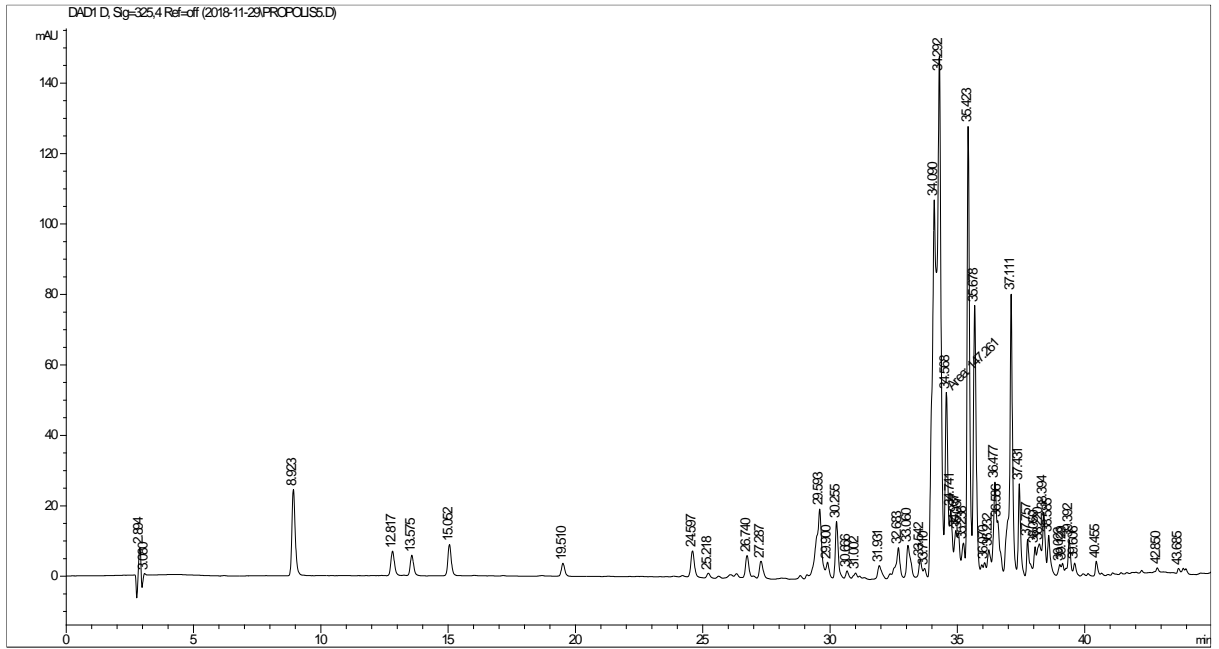


Рис. 3.22. Хроматограмма этанольного извлечения образца №5

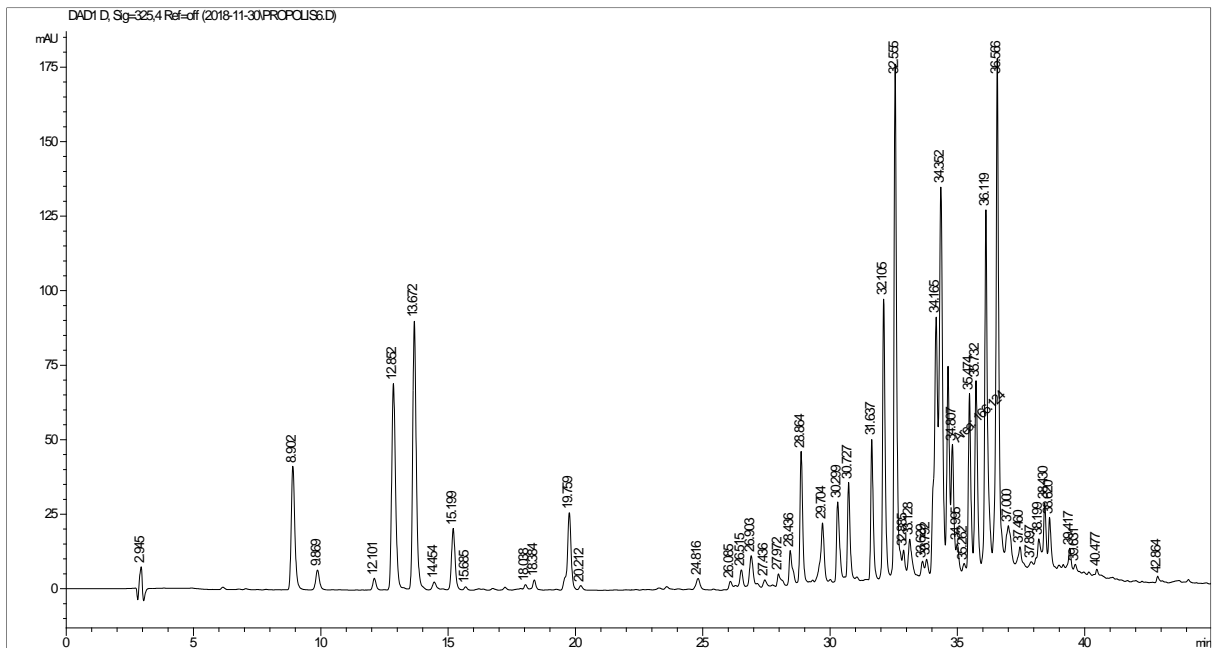


Рис. 3.23. Хроматограмма этанольного извлечения образца №6

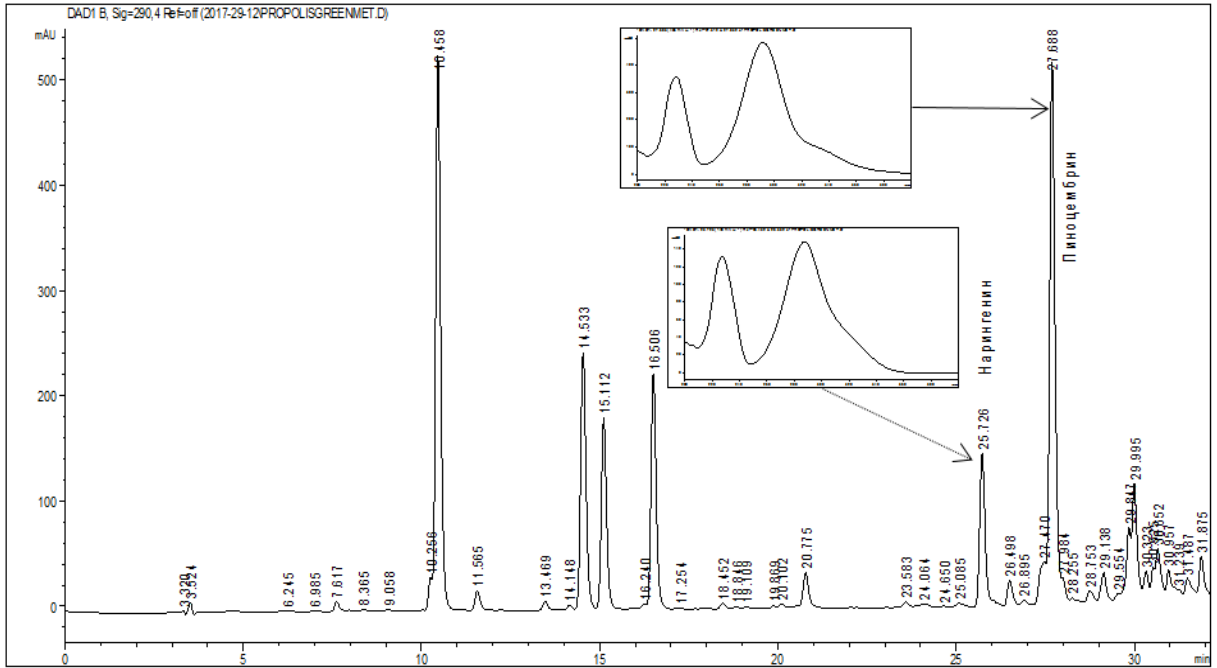


Рис. 3.26. Хроматограмма этанольного извлечения «зеленого» прополиса
(детекция диодно-матричная при λ_{\max} – 290 нм)

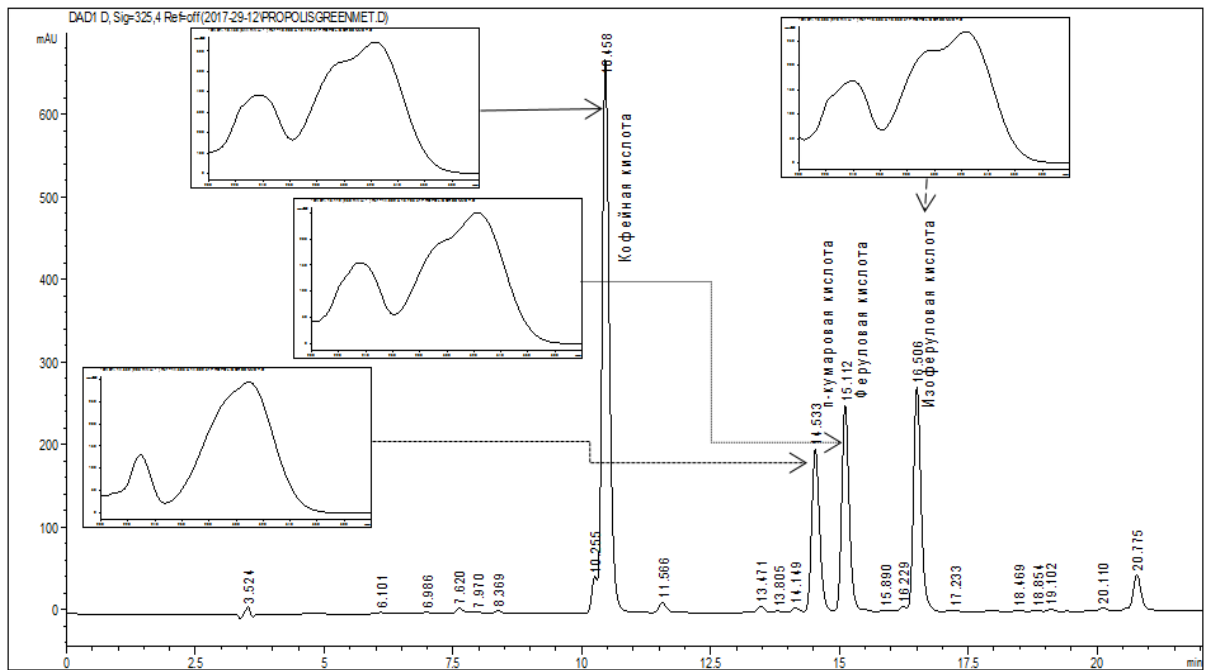


Рис. 3.27. Хроматограмма этанольного извлечения «зеленого» прополиса
(детекция диодно-матричная при λ_{\max} – 325 нм)

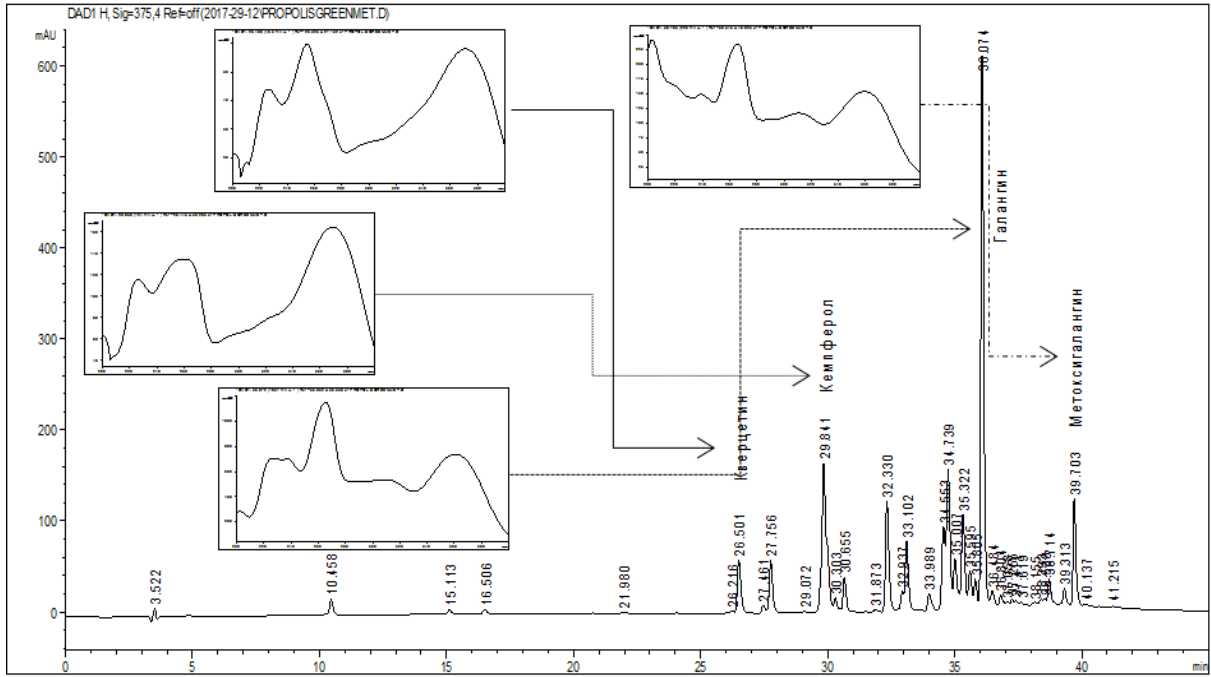


Рис. 3.28. Хроматограмма этанольного извлечения «зеленого» прополиса (детекция диодно-матричная при $\lambda_{max} - 375 \text{ nm}$)

Процентное распределение компонентов в зелёном прополисе представлено на рисунке 3.29.

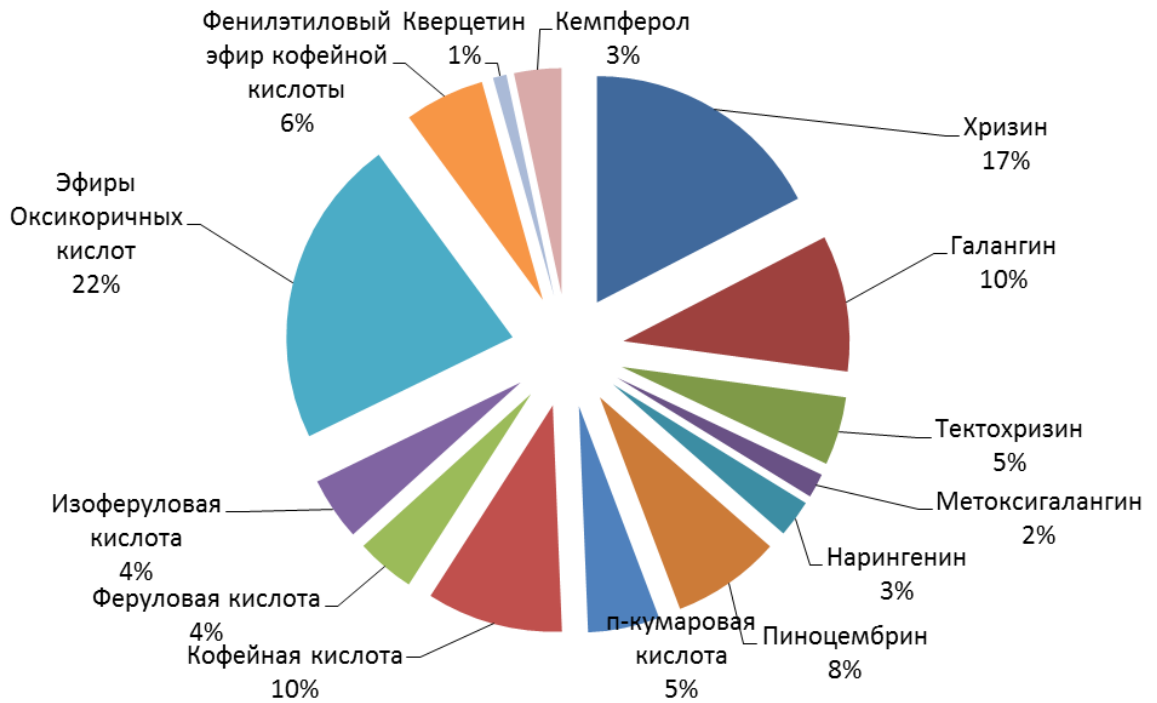


Рис. 3.29. Схема распределения полифенольных соединений в «зелёном» прополисе

Из представленной схемы видно, что доминирующими компонентами «зелёного» прополиса являются оксикоричные кислоты и их эфиры, содержание которых в сумме составляет 51,0%. Характерно высокое содержание флавона хризина – 17% и его метилового эфира – 5%, а также флавонола галангина – 10% и его метилового эфира – 2%. Содержание остальных флавонолов, представленных кемпферолом и кверцетином составляет 4,0%. Содержание флавононов нарингенина и пиноцембрина в сумме 11,0%.

Также проведён анализ «желтых» форм прополиса. Результаты хроматографирования представлены на рисунках 3.30 – 3.35.

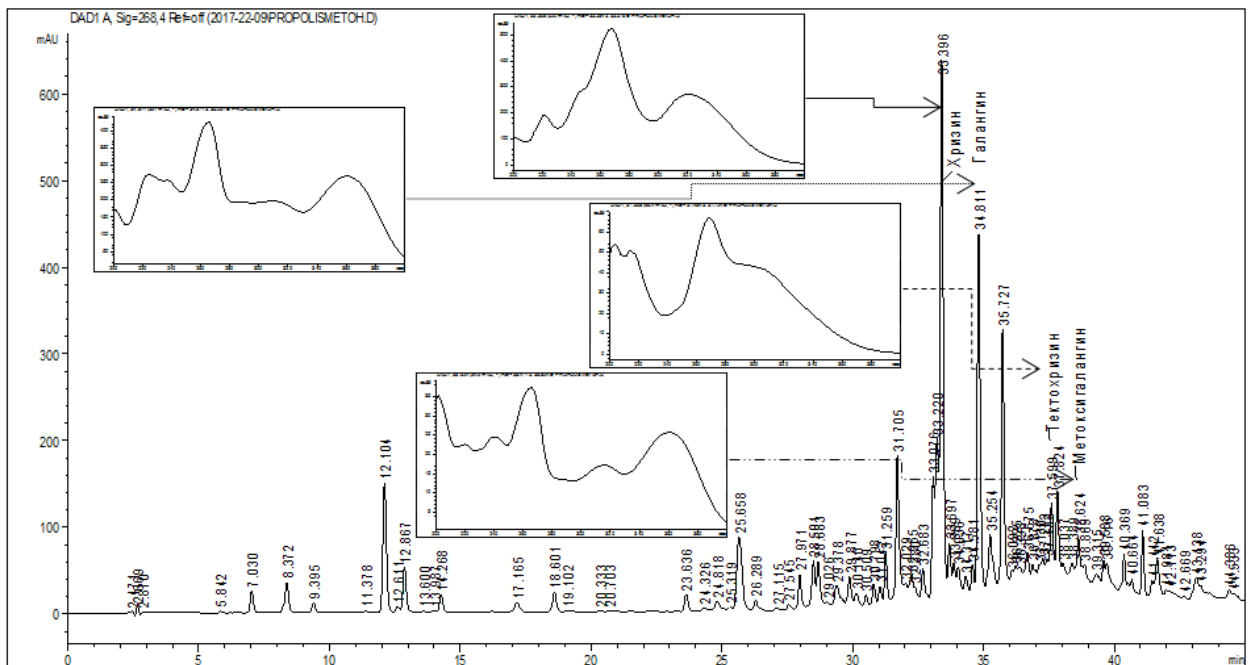


Рис. 3.30. Хроматограмма этанольного извлечения из «жёлтого» прополиса (детекция диодно-матричная при λ_{max} – 268 нм)

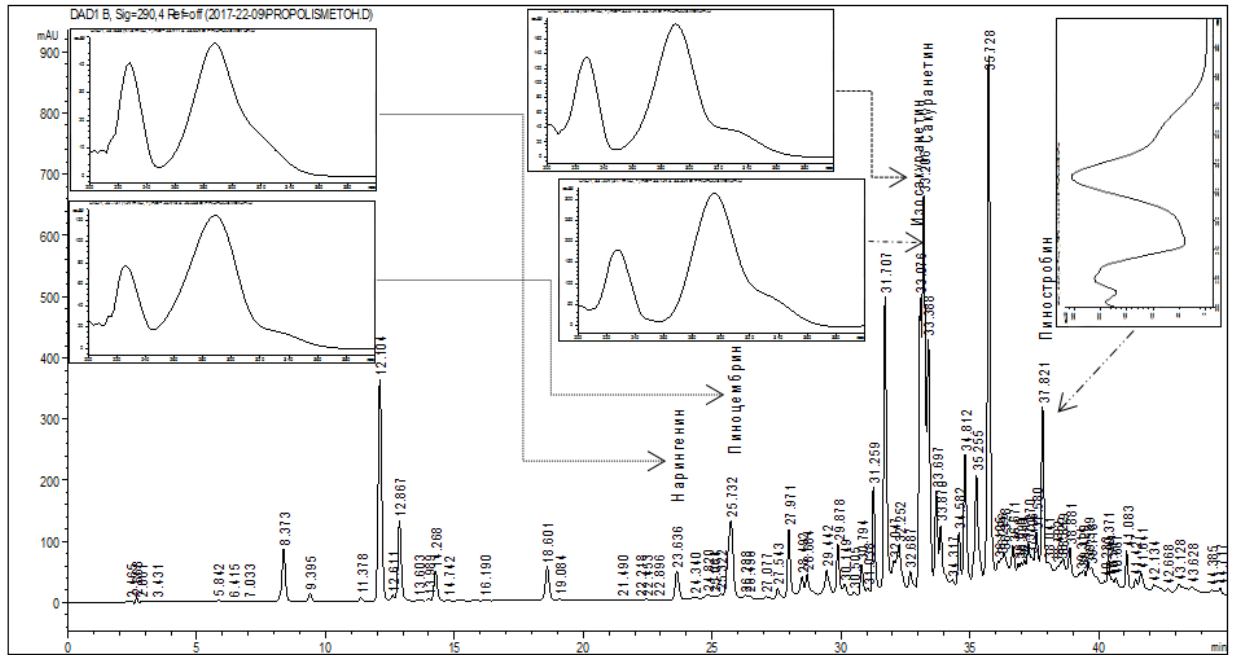


Рис. 3.31. Хроматограмма этанольного извлечения из «жёлтого» прополиса (детекция диодно-матричная при λ_{max} – 290 нм)

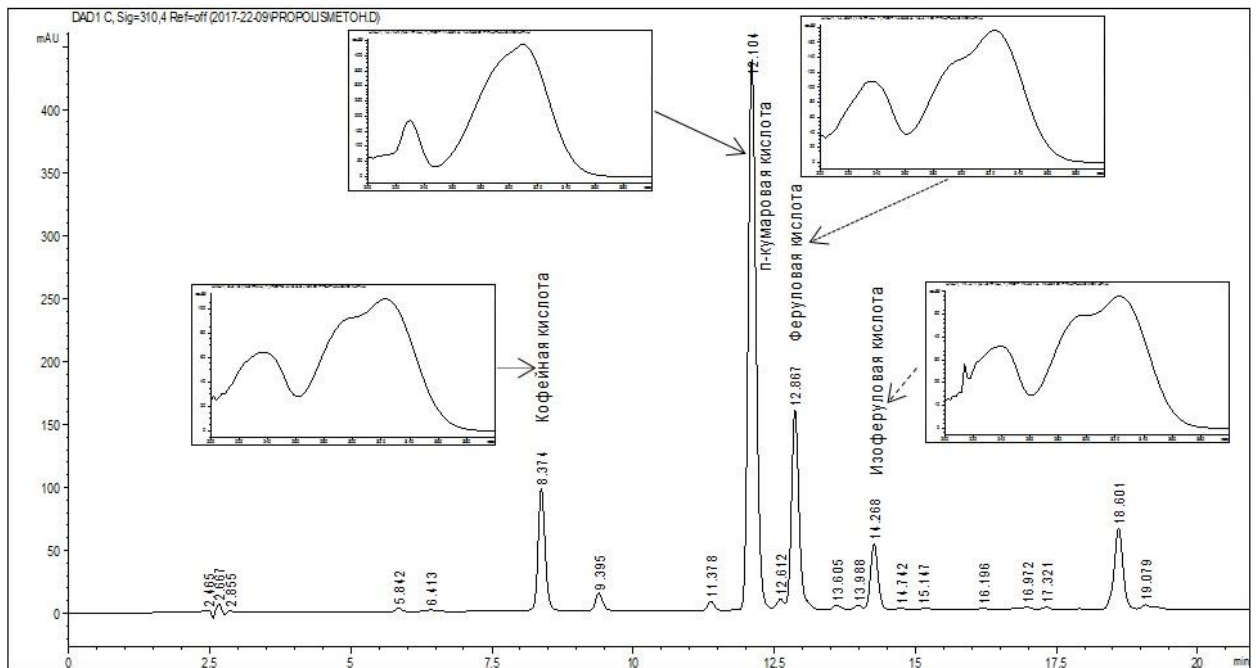


Рис. 3.32. Хроматограмма этанольного извлечения из «жёлтого» прополиса (детекция диодно-матричная при λ_{max} – 310 нм)

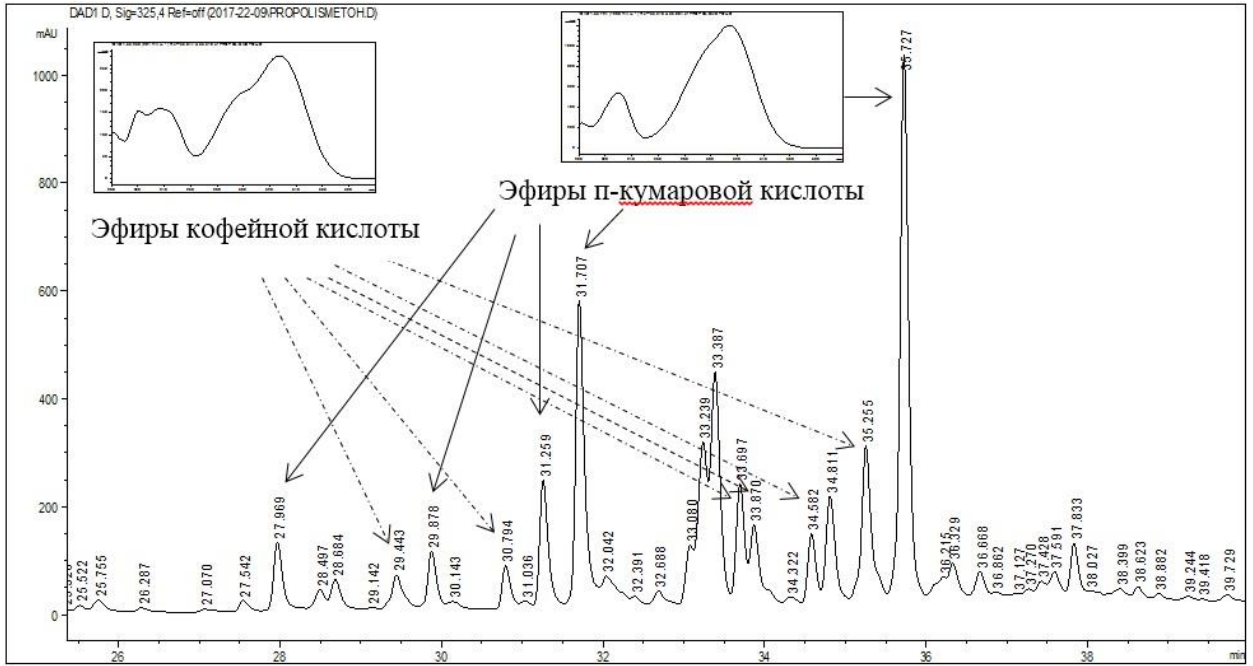


Рис. 3.33. Хроматограмма этанольного извлечения из «жёлтого» прополиса (детекция диодно-матричная при λ_{max} – 325 нм)

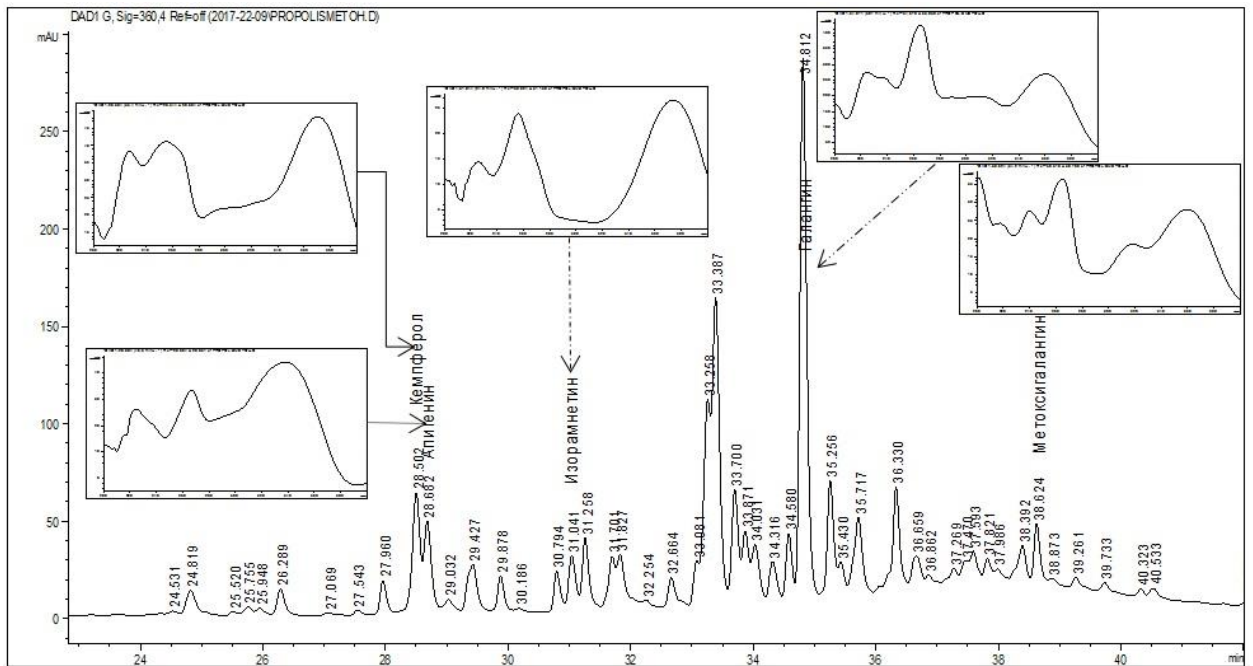


Рис. 3.34. Хроматограмма этанольного извлечения из «жёлтого» прополиса (детекция диодно-матричная при λ_{max} – 360 нм)

Схема процентного распределения полифенольных соединений в жёлтом прополисе представлено на рисунке 3.35.

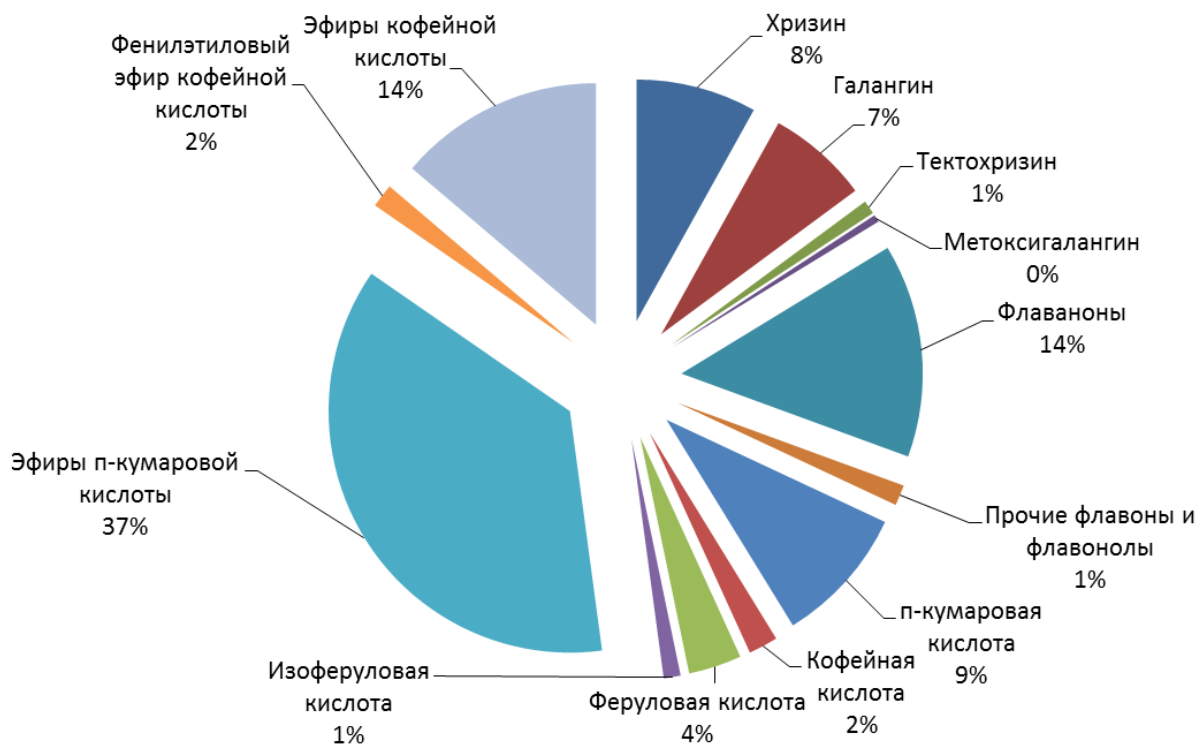


Рис. 3.35. Схема распределения полифенольных соединений в «жёлтом» прополисе

Из рисунка 3.35. видно, что преобладающими компонентами «жёлтого» прополиса являются эфиры оксикоричных кислот – 69,0% от общей суммы всех компонентов с явным преимуществом эфиров п-кумаровой кислоты. Процент содержания флавононов составил – 14,0%. Содержание хризина и галангина – 8,0% и 7,0% соответственно. Содержание остальных флавоноидов – 2,8%.

3.3 Оценка количественного содержания фенилэтилового эфира кофейной кислоты в прополисе

Идентификацию фенилэтилового эфира кофейной кислоты проводили по совпадению времени удерживания и идентичности УФ-профиля анализируемого образца со стандартным образцом вещества-свидетеля данного компонента. На хроматограмме рисунке 3.19. видно, что СО фенилэтилового эфира кофейной кислоты имеет время удерживания $t_R \sim 34,636$ мин.

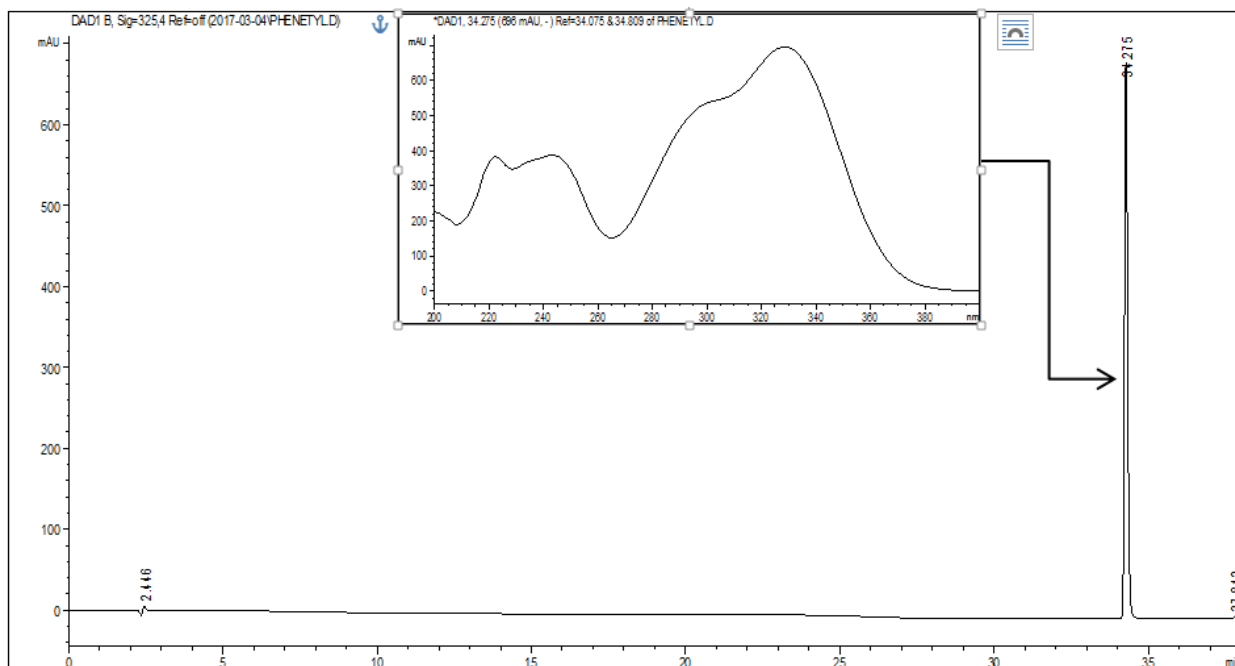


Рис. 3.36. Хроматограмма и УФ-профиль стандартного образца фенилэтилового эфира кофейной кислоты

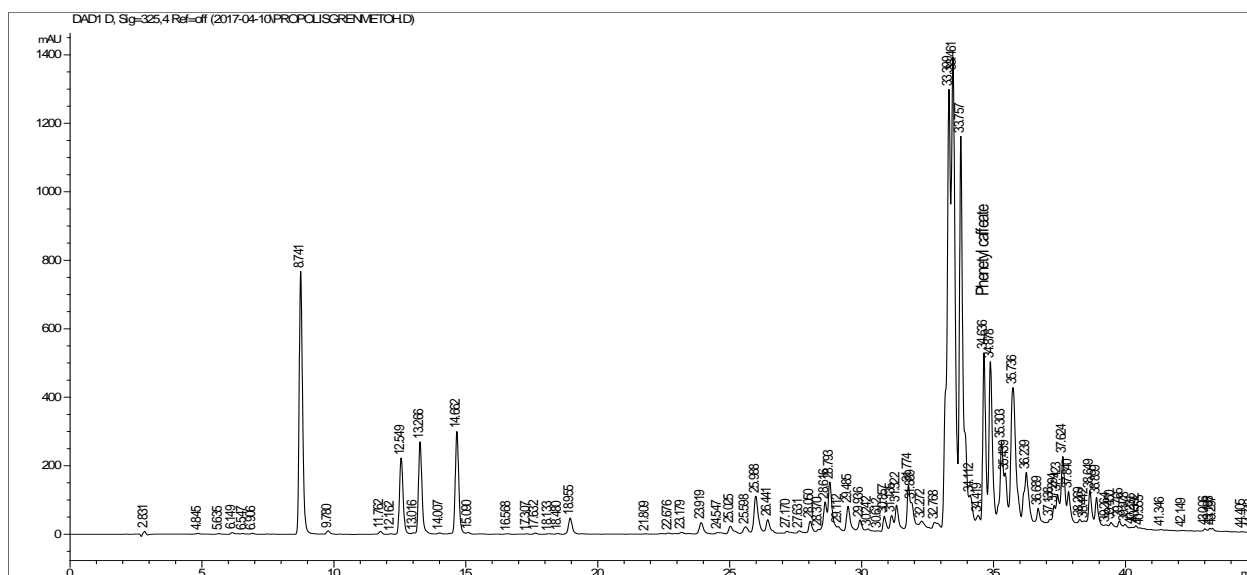


Рис. 3.37. Хроматограмма продуктов спиртового извлечения из «зеленого» прополиса

Для оценки пригодности использованной хроматографической системы были рассчитаны параметры пригодности, представленные в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Параметры пригодности хроматографической системы для определения фенэтилового эфира кофейной кислоты в прополисе

t_R	N	S, mAU средняя	R_s	T_f	W_b
34,636	555896	2998	1,16	0,84	0,1093

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

Данные расчёта критериев пригодности хроматографической системы для определения фенилэтилового эфира кофейной кислоты свидетельствуют о соответствии реферируемым значениям. Следовательно, данная хроматографическая система может быть признана эффективной для определения анализируемого компонента.

Нами изучено, какой вид прополиса по цветовой форме содержит наибольшее количество фенилэтилового эфира кофейной кислоты. Для этого также были изготовлены спиртовые извлечения из красного, жёлтого и зелёного прополисов, прохроматографированы и полученные площади пиков данного компонента на полученных хроматограммах сравнивались между собой. Данные приведены на рисунке 3.38.

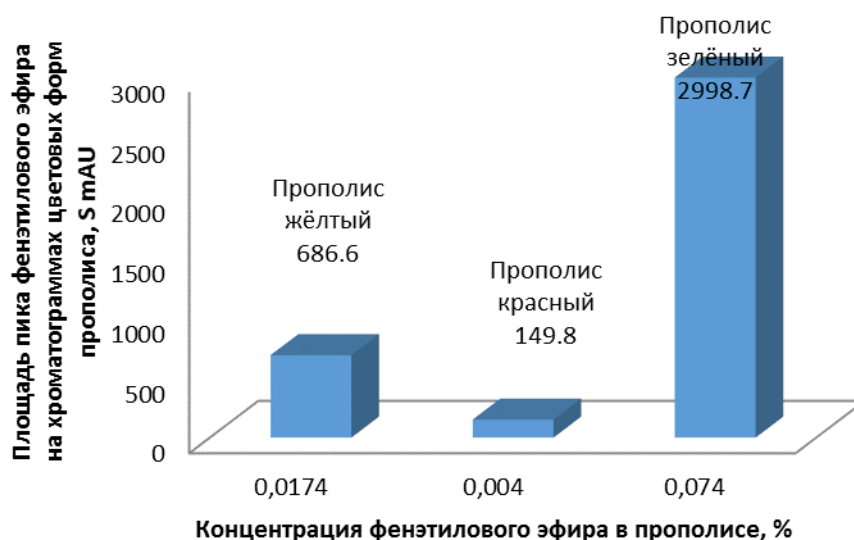


Рис. 3.38. Сравнительный анализ содержания фенилэтилового эфира кофейной кислоты в цветковых формах прополиса

На представленном рисунке видно, что лучшей цветовой формой прополиса, содержащей наибольшее количество фенилэтилового эфира кофейной кислоты, является прополис зелёный.

Для оценки количественного содержания фенилэтилового эфира кофейной кислоты в прополисе была разработана методика с использованием абсолютной градуировки. Для этого изготовлен ряд из 6 калибровочных растворов из стандартного образца фенилэтилового эфира кофейной кислоты, включающий диапазон концентраций 0,01 – 0,1% аналита.

Полученные калибровочные растворы хроматографировали в приведённых выше условиях, определяли площади пиков и по результатам строили градуировочный график зависимости площади пика фенилэтилового эфира кофейной кислоты, от концентрации .

На рисунке 3.39. видно, что в указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость была прямолинейной, о чём свидетельствует величина коэффициента корреляции, составившая $R^2 = 0.9998$, уравнение регрессии имело вид:

$$y = 40485x - 15.416$$

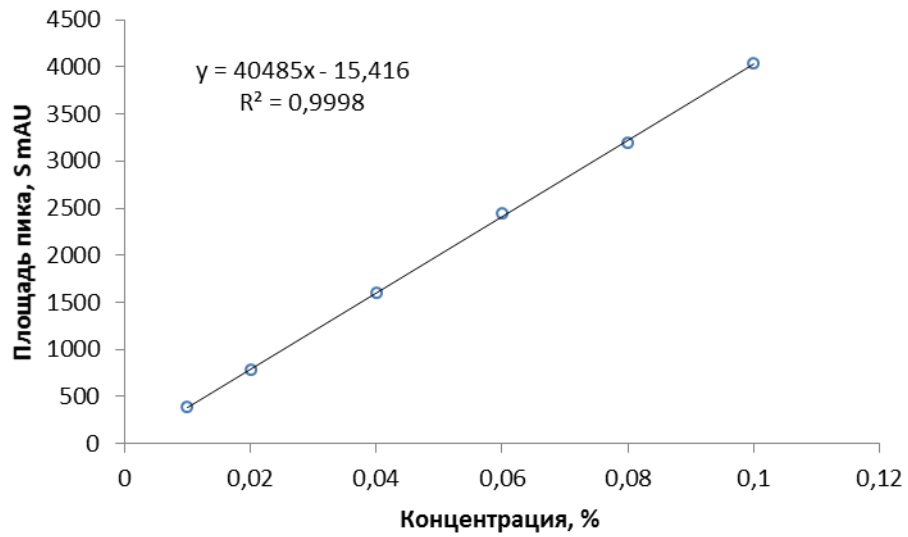


Рис. 3.39. Градуировочный график зависимости площади пика фенэтилового эфира кофейной кислоты от концентрации.

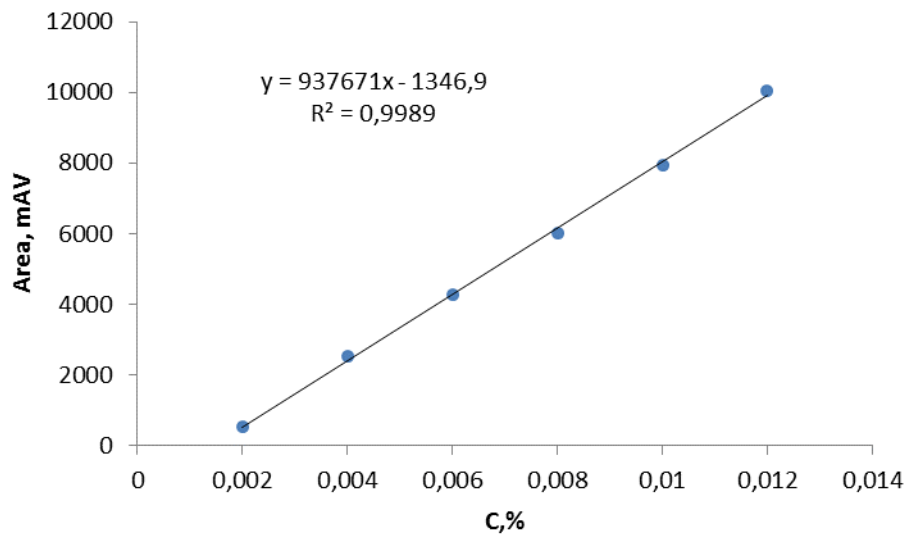


Рис. 3.40. Градуировочный график зависимости концентрации кислоты феруловой от площади пика

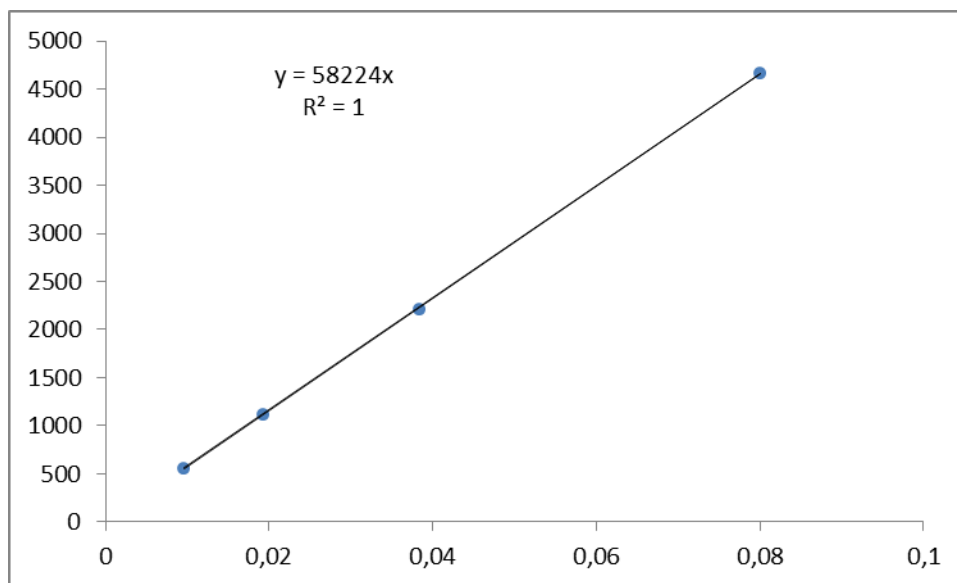


Рис. 3.41. Градуировочный график зависимости концентрации кислоты кофейной от площади пика

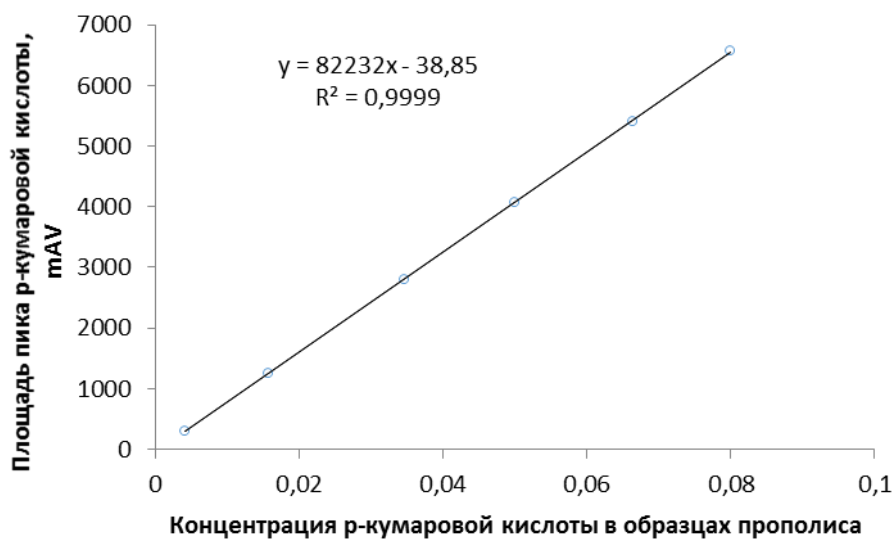


Рис. 3.42 Градуировочный график зависимости концентрации паракумаровой кислоты от площади пика

Метрологические характеристики методики количественного определения фенилэтилового эфира кофейной кислоты в 6 спиртовых извлечениях 1:10 образцов одной серии прополиса, вычисленные по градуировочному графику, представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2.

Метрологические характеристики методики количественного определения фенилэтилового эфира кофейной кислоты в прополисе методом ВЭЖХ

f	\bar{X}	S^2	S	P	t(P,f)	ΔX	ε
1	2	3	4	5	6	7	8
5	0,0422	$5,98 \times 10^{-7}$	0,00077	95%	2,6	0,00201	4,76%

В соответствии с данными, представленными в таблице 3.2, содержание фенилэтилового эфира кофейной кислоты в спиртовом извлечении прополиса составило $0,042 \pm 0,002\%$. Ошибка единичного определения не превышала 5,0% при относительной погрешности P,95%, что вмещается в диапазон, регламентируемый ГФ.

Таблица 3.3.

Количественное содержание фенилэтилового эфира кофейной кислоты в опытных образцах прополиса

№ опытного образца прополиса	1	2	3	4	5	6
Содержание фенилэтилового эфира кофейной кислоты, %	0.246	0.37	0.14	0.32	0.515	0.106

С помощью разработанной методики проанализировано 6 опытных образцов прополиса, собранных в разных регионах России в пересчёте на сухое вещество. Как показывают результаты, приведённые в таблице 3.3., содержание фенилэтилового эфира кофейной кислоты в разных образцах прополиса колебалось в диапазоне 0.106-0.515%.

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о возможности проведения оценки качества прополиса по одному из наиболее значимых его компонентов – фенилэтиловому эфиру кофейной кислоты.

3.4 Оценка количественного содержания доминирующих гидроксикоричных кислот в прополисе

По результатам диодно-матричного детектирования идентификацию гидроксикоричных кислот проводили путем сопоставления времён удерживания стандартных образцов и анализируемых компонентов, зафиксированных в аналогичных условиях эксперимента. О хорошей селективности использованных хроматографических условий свидетельствует то, что большинство компонентов, присутствующих на хроматограмме, разделяются по базовой линии.

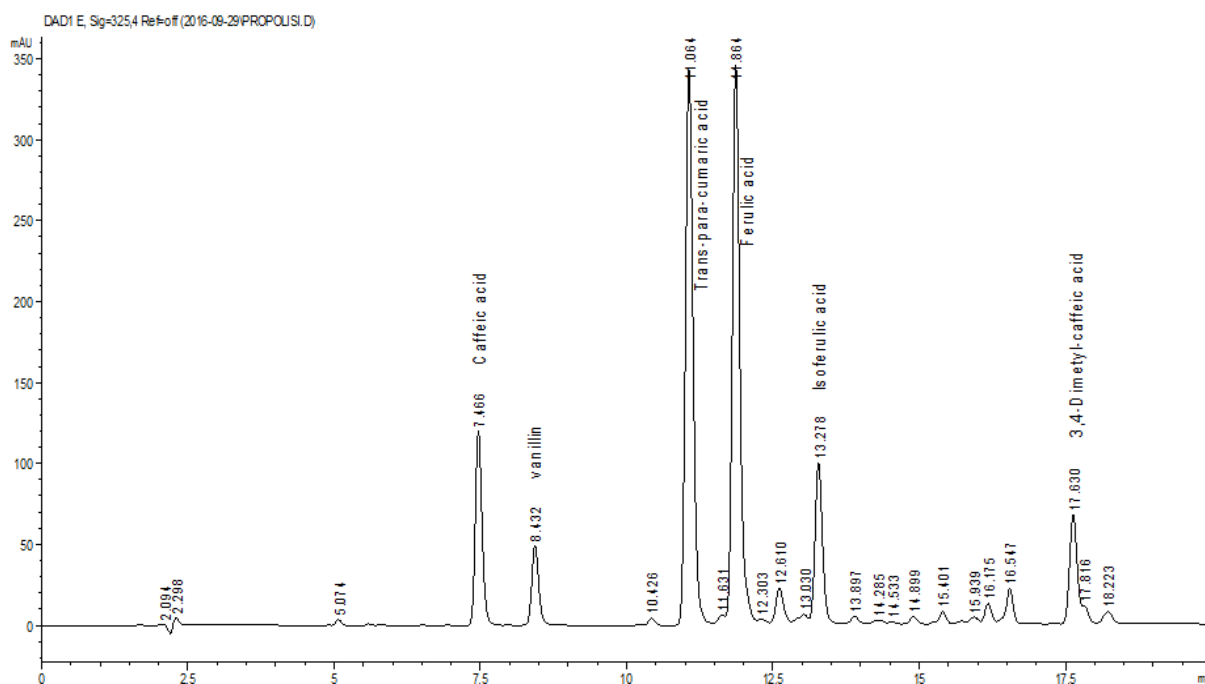


Рис. 3.43. Хроматограмма продуктов спиртового извлечения из прополиса (детектор диодно-матричный $\lambda_{\text{max}} - 325 \text{ nm}$)

Представлено соотношение гидроксикоричных кислот внутри группы. Таким образом, установлено наибольшее содержание транс-*para*-кумаровой,

феруловой и кофейной кислоты в группе гидроксикоричных кислоты анализируемого образца прополиса.

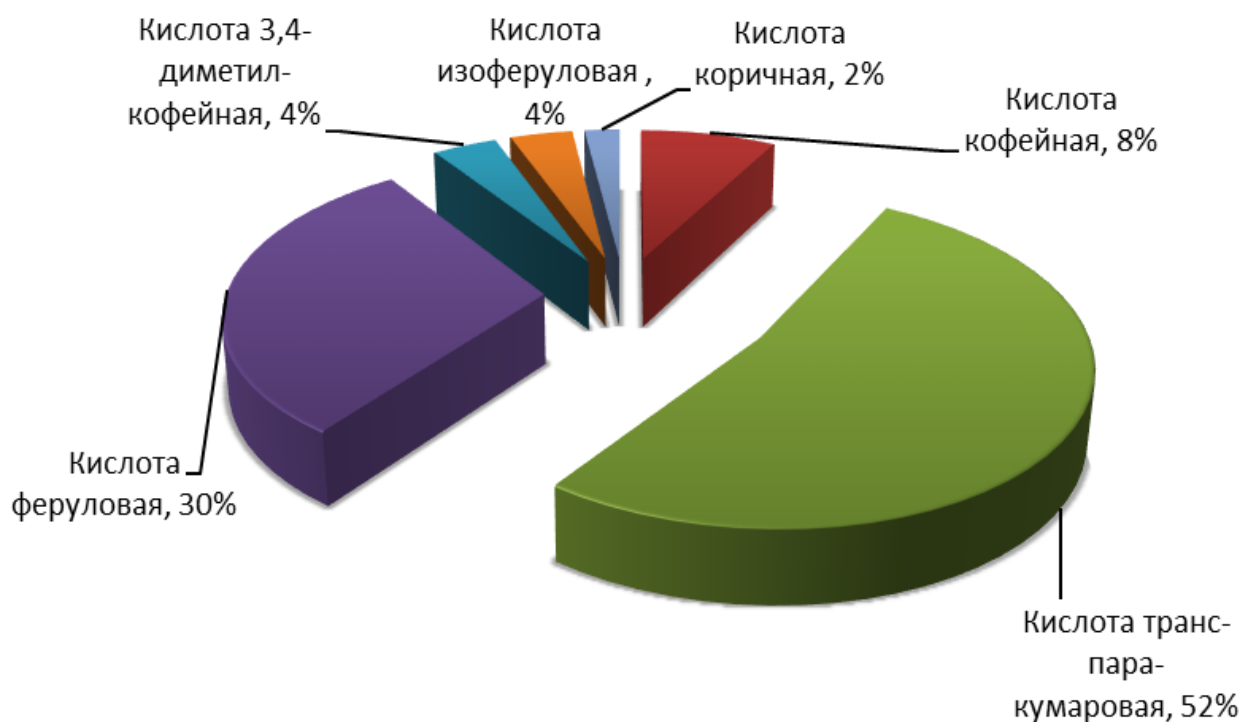


Рис. 3. 44. Процентное распределение гидроксикоричных кислот в прополисе внутри группы

Таблица 3.4.

Содержание гидроксикоричных кислот в лабораторных образцах прополиса

№ опытного образца прополиса	1	2	3	4	5	6
Содержание, масс. % кислоты транс-пара-кумаровой	1,60	1,43	1,55	2,10	1,81	1,76
Содержание, масс. % кислоты феруловой	1,16	0,93	1,08	1,60	1,30	1,30
Содержание, масс. % кислоты	0,35	0,19	0,40	0,44	0,36	0,41

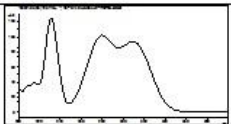
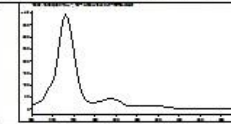
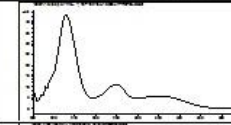
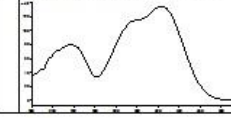

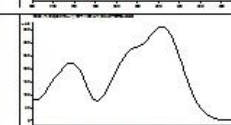
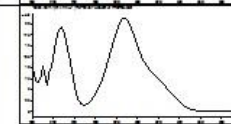
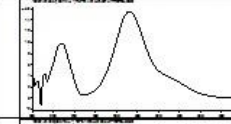
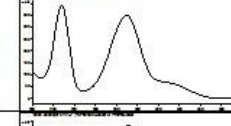
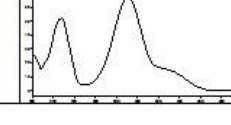
кофейной						
----------	--	--	--	--	--	--

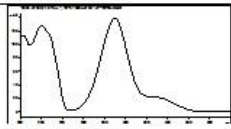
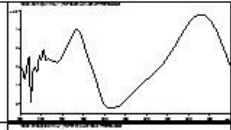
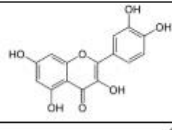
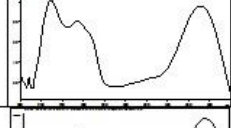
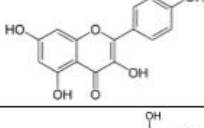

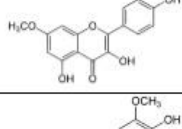
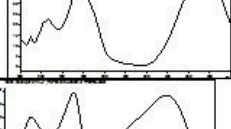
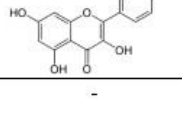


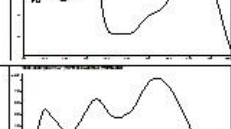
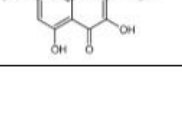
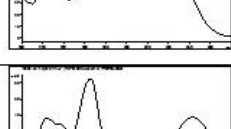
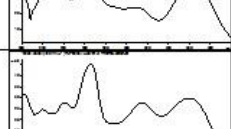
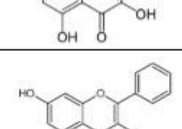
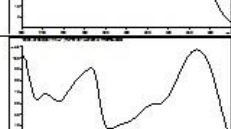
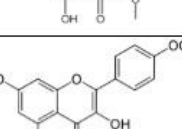
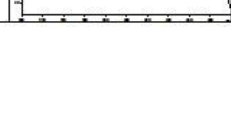
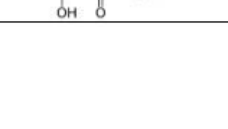
Метод абсолютной градуировки использовался для расчета количественного содержания доминирующих оксикоричных кислот в анализируемом образце прополиса, согласно калибровочным графикам, используя уравнения регрессии. Калибровочные растворы приготовлены в диапазоне концентраций от 0,002% до 0,1%. Калибровочные зависимости в вышеуказанном диапазоне концентраций имели прямолинейную зависимость. По результатам расчета содержание кислоты *транс-пара-кумаровой* в изученных образцах прополиса находилось в диапазоне 1,43 – 2,1%; кислоты феруловой – 0,93 – 1,6%; кислоты кофейной – 0,193 – 0,44%.


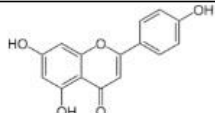
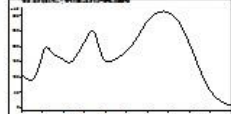
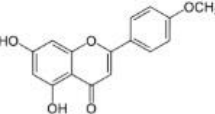
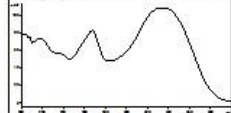
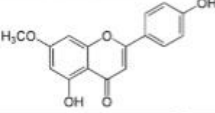
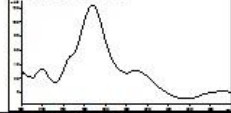
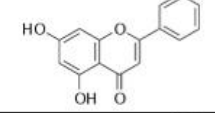
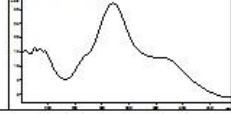
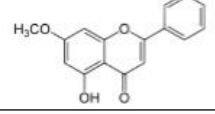

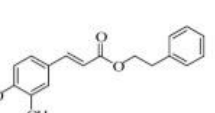

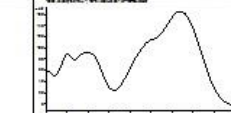
3.5 Компонентный состав изученных образцов прополиса

Таблица 3.5

Сводные данные компонентного состава фенольных соединений образцов прополиса, полученных из разных регионов России

№	Название компонента, брутто-формула	УФ-спектр	Структурная формула	Среднее время удерживания вещества на хроматограмме, мин.	Примечание
1.	Ванилин		<chem>O=Cc1ccc(OC)c(O)c1</chem>	8,718	Присутствует во всех исследованных образцах
2.	Бензойная кислота		<chem>O=C(O)c1ccccc1</chem>	16,271	
3.	<u>Бензилбензоат</u>		<chem>O=C(Oc1ccccc1)c2ccccc2</chem>	18,435	
4.	Кофейная кислота		<chem>O=C(O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1</chem>	7,582	Присутствует во всех исследованных образцах
5.	П-кумаровая кислота		<chem>O=C(O)/C=C/c1ccc(O)cc1</chem>	11,212	Присутствует во всех исследованных образцах
6.	Феруловая кислота		<chem>O=C(O)/C=C/c1ccc(O)c(OC)c1</chem>	12,007	Присутствует во всех исследованных образцах
7.	Пиноцембрин		<chem>O=C1OC(c2ccc(O)c(O)c2)C(=O)c3cc(O)c(O)cc31</chem>	22,741	
8.	Нарингенин		<chem>O=C1OC(c2ccc(O)cc2)C(=O)c3cc(O)c(O)cc31</chem>	25,538	
9.	Сакуранетин		<chem>O=C1OC(c2ccc(O)cc2)C(=O)c3cc(O)c(OC)cc31</chem>	33,206	
10.	Изосакуранетин		<chem>O=C1OC(c2ccc(OC)cc2)C(=O)c3cc(O)c(O)cc31</chem>	33,076	

11.	Пиностробин			37,209	
12.	Кверцетин			23,747	
13.	Кемпферол			27,668	Присутствует во всех исследованных образцах
14.	Рамнетин			33,488	
15.	Изорамнетин			30,724	
16.	Кемпферол-метилловый эфир		-	28,555	
17.	3,4'-диметоксикемпферол (эрманин)			33,648	
18.	Кемпферол-7-метилловый эфир (рамноцитрин)			33,322	
19.	Пендулетин (5,4'-Диокси-3,6,7-триметоксифлавоны)			32,078	
20.	Галангин			34,118	Присутствует во всех исследованных образцах
21.	Метоксигалангин			38,363	Присутствует во всех исследованных образцах
22.	Кемпферид (4'-метилловый эфир кемпферола)			37,669	

23.	Апигенин			27,834	
24.	Акацетин			33,019	
25.	Генкванин			36,821	
26.	Хризин			33,131	Присутствует во всех исследованных образцах
27.	Тектохризин			37,254	Присутствует во всех исследованных образцах
28.	Фенилэтиловый эфир кофейной кислоты и другие сложные эфиры кофейной кислоты			33,161	Присутствует во всех исследованных образцах
29.	Сложные эфиры п-кумаровой кислоты		-	27,204 – 42,939	
30.	Сложные эфиры кофейной кислоты		-	28,761 – 34,588	

Во всех исследованных образцах присутствуют следующие компоненты: ванилин, кофейная кислота, п-кумаровая кислота, феруловая кислота, кемпферол, галангин, метоксигалангин, хризин, тектохризин, фенилэтиловый эфир кофейной кислоты и другие сложные эфиры кофейной кислоты.

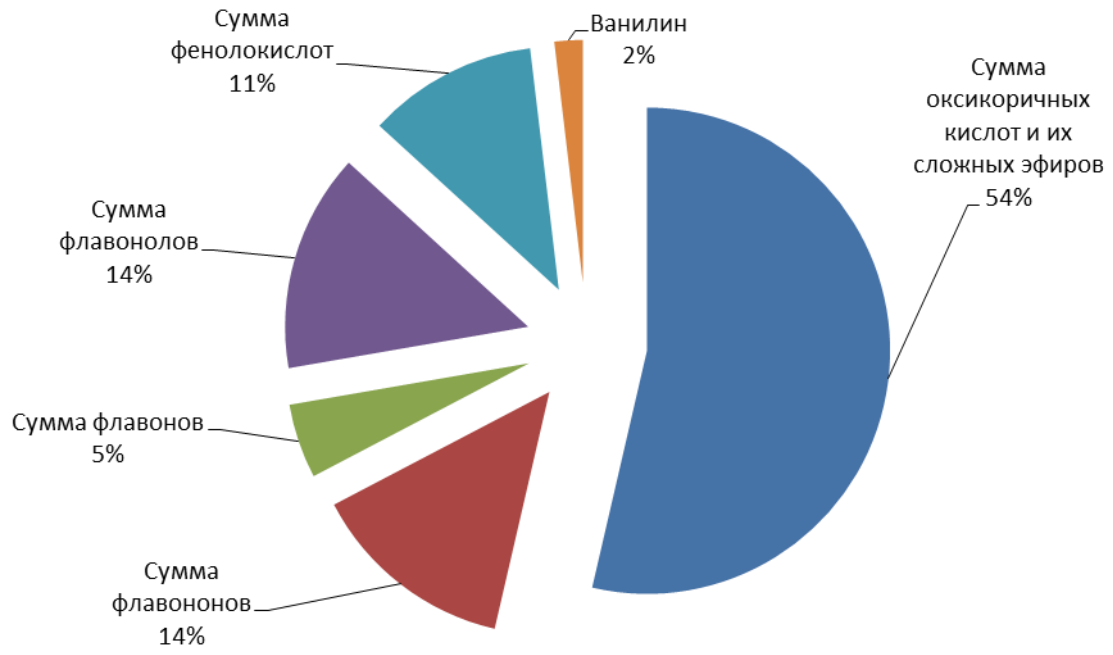


Рис.3.45. Среднее относительное содержание компонентов в образцах прополиса

ВЫВОДЫ

- 1) Разработана методика идентификации БАВ, входящих в состав прополиса методом ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием, используя градиентный режим;
- 2) Во всех исследованных образцах присутствуют следующие компоненты: ванилин, кофейная кислота, п-кумаровая кислота, феруловая кислота, кемпферол, галангин, метоксигалангин, хризин, тектохризин, фенилэтиловый эфир кофейной кислоты и другие сложные эфиры кофейной кислоты;
- 3) Определены вещества-маркеры для дальнейшей стандартизации прополиса: фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, транс-пара-кумаровая кислота, кофейная кислота, феруловая кислота;
- 4) Продемонстрирована возможность отделить фенилэтиловый эфир кофейной кислоты от близкородственных компонентов;
- 5) Установлено, что наиболее эффективным экстрагентом для фенилэтилового эфира кофейной кислоты из прополиса является спирт изопропиловый, а оптимальной цветовой формой прополиса, содержащей в наибольших количествах искомый компонент, является зелёный прополис;
- 6) Предложенная методика обладала линейностью в диапазоне концентраций аналита 0,01-0,1% (коэффициент корреляции $R^2 = 0.9998$) и правильностью (ошибка единичного определения 4,76%). Рассчитано количественное содержание фенилэтилового эфира кофейной кислоты в 6 образцах прополиса, взятых из разных регионов РФ, которое показало существенную вариабельность в и составило 0,106 – 0,515%.

