

УДК 615.322:547.586.2

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ПЛОДАХ *VACCINIUM OXYCOCCUS* L. И *VACCINIUM MACROCARPON* AIT.

В.Ю. Ермакова, О.В. Нестерова, С.В. Кондрашев, В.Н. Матвеевко*

(¹ ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; *e-mail: 13121946VNM@gmail.com)

Методами ТСХ и ВЭЖХ выявлено наличие гидрохикоричных кислот в плодах клюквы обыкновенной (*Vaccinium Oxycoccus* L.) и крупноплодной (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). Установлено, что преобладает хлорогеновая кислота. Количественное определение гидрохикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую осуществляли методом спектрофотометрического анализа.

Ключевые слова: клюква обыкновенная, клюква крупноплодная, гидрохикоричные кислоты, ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрия.

Плоды клюквы обыкновенной (болотной) издавна применяют в народной медицине. В Российской Фармакопею 4-го издания (1891) была включена частная статья «*Sirupus Oxycocci*», в которой приведен рецепт (R.: *Succi Oxycocci filtrati et limpidi partes quinque...5, Saccari partes novem ...9*), а также технология приготовления сиропа клюквенного. Плоды клюквы привлекают внимание исследователей как растительное сырье, содержащее широкий комплекс биологически активных веществ, вызывающих многообразные фармакологические эффекты [1–4].

Выявлено, что экстракты плодов клюквы обладают антимикробным, антиоксидантным, противовоспалительным и противоопухолевым действием [5–7]. Однако, несмотря на результаты многочисленных исследований фармакологического действия плодов клюквы, в РФ данный вид сырья по-прежнему используется в качестве пищевого и его стандартизация осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТ 33309-2015 «Клюква свежая», что не позволяет оценить содержание в исследуемом сырье ценных питательных и биологически активных веществ. Интерес исследователей в последние годы все чаще привлекают производные гидрохикоричных кислот [8], для которых характерны выраженные иммуностимулирующие, противовоспалительные, противовирусные, антиоксидантные и антирадикальные свойства [9].

На территории РФ широко культивируются различные сорта клюквы крупноплодной, поэтому представляется актуальным проведение ком-

плекса исследований, позволяющих определить в промышленных видах клюквы содержание основных групп биологически активных веществ, разработать методы их идентификации и провести сравнительный анализ состава и количественного содержания гидрохикоричных кислот в плодах клюквы крупноплодной и обыкновенной.

Цель работы – изучение состава плодов клюквы обыкновенной и крупноплодной, а также количественное определение в них гидрохикоричных кислот.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили плоды клюквы обыкновенной, заготовленные в соответствии с рекомендациями сборника инструкций «Правила сбора и сушки лекарственных растений» и ГОСТ 19215-73 «Клюква свежая». Требования при заготовках, поставках и реализации от растений дикорастущих популяций, произрастающих в подлеске смешанного леса Клинского района Подмосковья и Тверской области, а также плоды клюквы крупноплодной сортов зарубежной селекции Мак-Фарлин и отечественной селекции Северянка, заготовленные в фазу плодоношения.

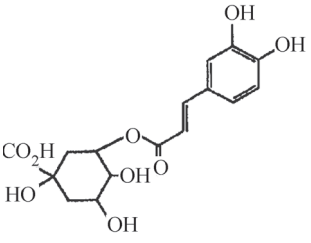
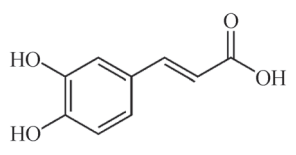
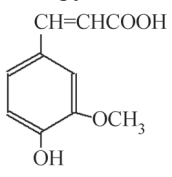
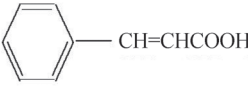
Все использованные в исследовании реактивы имели степень чистоты «ч.д.а.». Для идентификации гидрохикоричных кислот мы использовали методы ТСХ и ВЭЖХ, широко применяемые для анализа пищевого и лекарственного растительного сырья [10].

Навески (по 5 г) измельченного гомогенизата, получаемые из свежих плодов клюквы обыкновенной и клюквы крупноплодной помещали в плоскодонную колбу и нагревали с 25 мл метанола на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Надсадочную жидкость сливали в мерную колбу объемом 100 мл и дважды осуществляли повторную экстракцию. Объединенную смесь упаривали. Полученный остаток растворяли в 2 мл воды дистиллированной и подвергали пятикратной обработке этилацетатом, добавляемым порциями по 2 мл. Этилацетатные извлечения объединяли, проводили упаривание, полученный сухой остаток растворяли в 1 мл 95%-го

этанола. Полученный спиртовой раствор (10 мкл) микрошприцем наносили на стартовую линию, отстоящую от края хроматографической пластины на 20 мм. На эту же линию наносили контрольные 0,05%-е растворы ГСО кофейной (3,4-диоксикоричной), хлорогеновой (3-кофеилхинной) и феруловой (3-метокси-4-гидроксикоричной) кислот. Пластины помещали в хроматографическую камеру и проводили разделение методом восходящей хроматографии в системе: *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (40:12:28). Полученные хроматограммы высушивали, после чего рассматривали в УФ-свете до и после обработки 1%-м раствором хлорида железа(III) в спирте метиловом.

Т а б л и ц а 1

Количественное содержание биологически активных веществ в свежих плодах клюквы болотной

Гидроксикоричные кислоты	Количественное содержание, мг/100г	
	плоды клюквы крупноплодной (сортовая смесь)	плоды клюквы обыкновенной
<p align="center">Хлорогеновая</p> 	337,05	289,09
<p align="center">Кофейная</p> 	0,809	0,815
<p align="center">Феруловая</p> 	7,740	6,310
<p align="center">Коричная</p> 	0,670	0,560
Σ	346,27 (0,35%)	296,78 (0,30%)

Для оценки содержания гидроксикоричных кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе с УФ-детектором «Agilent 1100» (США) с компьютерной обработкой результатов анализа. Инжектор ввода пробы ручной; рабочий объемом петли 5 и 20 мкл. Спектрофотометрический детектор для ВЭЖХ фирмы «Agilent» с проточной кварцевой кюветой и возможностью выбора длины волны в спектральном рабочем диапазоне от 190 до 700 нм. В качестве неподвижной фазы в этом исследовании мы применяли хроматографические колонки «Кромасил C18», «Wakosil C18 RS», «Thermo ODS-2 HYPERSIL» или «Phenomenex Luna 5 мкм C18(2)» размером 4,6×250 мм, размер частиц носителя 5 мкм. Анализ ВЭЖХ проводили на базе исследовательской лаборатории НИИ Питания РАМН. Для калибровки прибора применяли внешний стандарт с введением полученных результатов в базу данных обрабатывающей программы.

Все анализы осуществляли при комнатной температуре. При анализе хроматограмм и для идентификации обнаруженных соединений использовали аппаратно-программный комплекс, включающий компьютерные программы обработки данных, разработанный для используемого хроматографа. Для каждой группы биологически активных веществ применяли рекомендованный методикой тип носителя, подвижную фазу, дли-

ну волны детектирования, а также скорость и вид (градиентное или изократическое) элюирования.

Пробоподготовка плодов клюквы обыкновенной и крупноплодной включала предварительное измельчение свежих плодов до гомогенного состояния. Гомогенизат массой 2 г (точная навеска) помещали в мерную колбу на 100 мл и вновь взвешивали с точностью до 0,01 г, а затем осуществляли экстракцию 20%-м этиловым спиртом. Полученный экстракт фильтровали либо через нейлоновые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, либо через бумажные фильтры «синяя лента».

Разделенные вещества идентифицировали хроматографически, сопоставляя время удерживания пиков, характерных для исследуемого раствора со временем удерживания растворов сравнения.

Приготовление подвижной фазы. В мерную колбу объемом 1000 мл, до половины заполненную дистиллированной водой, вносили 27,2 г калия дигидрофосфата. Перемешивали до полного растворения калия дигидрофосфата, доводили содержимое колбы до метки дистиллированной водой и вновь перемешивали. Полученный раствор переносили в стеклянный стакан объемом 1000 мл, затем с использованием рН-метра на магнитной мешалке доводили рН раствора до значения 2,2 постепенным добавлением о-фосфорной кислоты. Полученную подвижную фазу фильтровали через мембранный фильтр и дегазировали.

Условия хроматографического анализа. Колонка: октадецилсиликагель, 5 мкм, 250×4,6 мм

Т а б л и ц а 2

Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в плодах клюквы обыкновенной и крупноплодной в пересчете на кислоту хлорогеновую

Номер исследуемого образца	Исследуемый образец	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую, %
1	Плоды клюквы обыкновенной (болотной), заготовленные в Клинском районе Подмосковья	0,48
2	Плоды клюквы обыкновенной (болотной), заготовленные в Тверской области	0,52
3	Плоды клюквы крупноплодной сорта Мак-Фарлин	0,76
4	Плоды клюквы крупноплодной сорта Северянка	0,71
5	Сортовая смесь клюквы крупноплодной	0,72

(Wakosil C18 RS); подвижная фаза – 0,2 М фосфатный буфер (рН 2,2); скорость подачи подвижной фазы 1,0 мл/мин; детектирование фотометрическое ($\lambda = 210$ нм); объем вводимой пробы 10 мкл; температура 20 °С.

Определение количественного содержания гидроксикоричных кислот в плодах клюквы обыкновенной и крупноплодной проводили методом спектрофотометрии в пересчете на кофейную кислоту. Предварительно полученный гомогенизат свежих плодов исследуемых видов клюквы массой 2 г (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 200 мл и приливали 70 мл воды дистиллированной. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 15 мин. Экстракцию осуществляли дважды. Полученные экстракты охлаждали при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр. Извлечения количественно переносили в мерную колбу объемом 200 мл и доводили объем раствора дистиллированной водой до метки. Затем в мерную колбу объемом 50 мл переносили 1 мл полученного ранее экстракта и доводили объем раствора до метки с использованием 20%-го этилового спирта. Измерение оптической плотности полученного раствора проводили в УФ-области при длине волны 325 нм, поскольку данное значение является аналитическим для кислоты хлорогеновой. В качестве раствора сравнения использовали 20%-й этиловый спирт.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот (X , %) в плодах клюквы обыкновенной и крупноплодной в пересчете на кислоту хлорогеновую вычисляли по формуле:

$$A_x = \frac{(A_x \times 200 \times 50 \times 100)}{E \times m \times V_a \times (100 - W)},$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора, E – удельный показатель поглощения кислоты хлорогеновой при 325 нм, m – масса навески измельченных листьев яблони лесной, V_a – объем аликвоты (мл), W – влажность (%).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли в соответствии с требованиями ОФС 42-0111-09 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Результаты и обсуждение

В результате изучения плодов клюквы обыкновенной и крупноплодной на присутствие гидроксикоричных кислот методом ТСХ в системе: *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2) для каждого исследуемого вида сырья были об-

наружены несколько зон адсорбции с R_f , равным 0,82; 0,74; 0,70; 0,62; 0,38; 0,30; 0,18, которые после высушивания проявляли окраску от голубой до фиолетово-голубой при просмотре в УФ-свете ($\lambda = 336$ нм). После обработки хроматограммы 1%-м раствором хлорида железа(III) в метаноле зоны, соответствующие кофейной, хлорогеновой и феруловой кислотам, приобрели соответственно серо-зеленую, зеленую и коричневатую окраску. По величине R_f стандартных образцов в растительном сырье были идентифицированы хлорогеновая, феруловая и кофейная кислоты (значение R_f составляло 0,30; 0,38 и 0,82 соответственно). Полученные результаты были идентичны для всех исследуемых образцов.

Хроматографический анализ этанольного извлечения из плодов клюквы обыкновенной и крупноплодной, осуществленный методом ВЭЖХ, показал идентичность биологически активных веществ, состав которых представлен в табл. 1.

Как следует из данных табл. 1, 2 количественная оценка содержания гидроксикоричных кислот методом спектрофотометрического анализа дает несколько более высокие данные количественного содержания по сравнению с методом ВЭЖХ, что может быть связано с влиянием других фенольных производных в исследуемом сырье.

Выводы

На основании анализа результатов, полученных методами ТСХ и ВЭЖХ для фенольных производных, установлено наличие класса гидроксикоричных кислот в плодах клюквы обыкновенной и крупноплодной. Методом спектрофотометрического анализа установлено содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в свежих плодах клюквы обыкновенной, заготовленных от дикорастущих растений в Московской и Тверской областях, а также сортовых образцах клюквы крупноплодной, заготовленных от культивируемых растений. Установлено, что доминирующей гидроксикоричной кислотой в плодах клюквы исследуемых видов является кислота хлорогеновая, а суммарное содержание гидроксикоричных кислот составляет от 0,48 до 0,76%.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лютикова М.Н., Ботиров Э.Х. // Химия растительного сырья. 2015. № 2. С. 5.
2. Горбунов А.Б., Кукушкина Т.А. // Химия растительного сырья. 2019. № 2. С. 153.
3. Курлович Т.В. // Вестн. Нижегородского университета им. Н.И. Лобочевского. 2014. № 3. С. 58.
4. Скаковский Е.Д., Тычинская Л.Ю., Латышев Д.Н., Шиш С.Н. // Тр. БГТУ. 2018. Сер. 2. № 2. С. 176.
5. Heinonen M. // Molecular Nutrition and Food Research. 2007. Vol. 51. N 6. P. 684.
6. Shivraj H., Se Won P. // Nutrition. 2014. Vol. 30. N 2. P. 134.
7. Skrovankova S., Sumczynski D., Micek J., Jurcova T., Sochor J. // International Journal of Molecular Sciences. 2015. Vol. 16. N 10. P. 24673.
8. Ермакова В.Ю., Решетняк В.Ю., Кузьменко А.Н., Дунин А.С. // Сб. тез. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» М., 2009. С. 657.
9. Прокофьева В.И., Арзамасцев А.П., Медведев Ю.В., Эллер К.И., Передеряев О.И. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 3. С. 25.
10. Нестерова Н.В., Самылина И.А., Бобкова Н.В., Кузьменко А.Н., Краснюк И.И. (мл.). // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2019. Т. 60. № 1. С. 60.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

DEVELOPMENT OF METHODS FOR IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROXY ACIDS IN THE FRUITS OF VACCINIUM OXYCOCCUS L. AND VACCINIUM MACROCARPON AIT

V.Yu. Ermakova, O.V. Nesterova, S.V. Kondrashov, V.N. Matveenko*

(¹Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); ²Lomonosov Moscow State University; *e-mail: 13121946VNM@gmail.com)

Using TLC and HPLC analysis, the presence of hydroxycoric acids in the fruits of common cranberries (*Vaccinium Oxycoccus* L.) and large-fruited cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), the predominant of which is chlorogenic acid. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in terms of chlorogenic acid was performed by the method of spectrophotometric analysis.

Key words: common cranberry, large-fruited cranberry, hydroxy acids, TLC, HPLC, spectrophotometry.

Сведения об авторах: Ермакова Виктория Юрьевна – доцент кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук (ermakova.viktoriya.yurievna@mail.ru); Нестерова Ольга Владимировна – зав. кафедрой химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), докт. фарм. наук, профессор (olganesterova9297@mail.ru); Кондрашев Сергей Владимирович – доцент кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук (Sk9262718531); Матвеев Владимир Николаевич – профессор кафедры коллоидной химии МГУ им. М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (13121946VNM@gmail.com).