

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ / CHEMISTRY

УДК: 543.544

**БЫСТРЫЙ МЕТОД ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ В ПОЛЫНИ**

О. В. Старцева^{а,б}, И. Н. Палий^а, Н. О. Симагина^б, А. А. Макаричева^б

*а — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад
— Национальный научный центр» Российской академии наук
Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита*

*б — Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет
имени В. И. Вернадского, Таврическая академия
Республика Крым, г. Симферополь*

Разработана методика быстрого полуколичественного определения хлорогеновой кислоты и ее производных в полыни. Проанализированы два вида полыни, произрастающей в дикой природе Крыма. Показана эффективность данной методики для оценки содержания этих биологически активных соединений с целью их последующего выделения из растительного сырья.

Ключевые слова: хроматография, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, дикофеилхинные кислоты, растительное сырье.

Введение

Хлорогеновая кислота и её производные обладают выраженной биологической активностью, в частности, проявляют противогепатитную активность, ингибируют активность ряда ферментов, являются сильными антиоксидантами [1, 2]. Поэтому разработка методик определения этих веществ является актуальной задачей.

Хроматографические методы широко используются для анализа биологически активных веществ (далее БАВ), в том числе содержащихся в растительном сырье [3, 4]. Для изучения состава БАВ на разных стадиях онтогенеза растений удобны методики анализа, не требующие больших затрат времени. В современной фармакопейной статье «Полыни горькой трава ФС.2.5.0033.15» приведено только качественное определение хлорогеновой кислоты. Целью данной работы является разработка мобильного метода полуколичественного определения хлорогеновой кислоты и её производных в полыни, который можно было бы использовать для изучения принципиальных различий состава растения на разных стадиях онтогенеза, сравнения разных видов полыни по содержанию БАВ, а также выбора подходящих условий для полупрепаративного выделения кофеилхинных кислот.

Исследования проводили на примере дикорастущих полыней Крыма *Artemisia santonica* L. и *Artemisia taurica* Willd. Полынь сантонийская (*Artemisia santonica* L.) является характерным компонентом галофильно-луговостепной растительности на солонцеватых и солончаковатых почвах в долинах рек, по окраинам озер, лиманов, приморских лугов юга Восточной Европы [5]. Полынь таврическая *Artemisia taurica* Willd произрастает на

территории Ростовской и Волгоградской областей, Таманского полуострова, Северного Кавказа, прикаспийских степях, а также широко распространена в степной части Крыма.

Оборудование и материалы

Для работы использовали ацетонитрил чистоты для ВЭЖХ (Pancreas), муравьиную кислоту чистоты для ВЭЖХ (Merk), стандартные образцы хлорогеновой и 1,5-ди-О-кофеилхиновой кислот (Sigma-Aldrich). Деионизированную воду получали с помощью системы очистки воды MilliQ (Millipore).

Для подготовки проб применяли ультразвуковую баню SW 12 Н, использовали фильтры-насадки на шприц Syringe Filter 25 мм 0,45 мкм PTFE (Restek).

Разделение фенольных веществ проводили на хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), укомплектованном поддоном для растворителей, четырёхканальным насосом с дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и диодноматричным детектором. Для проведения анализа использовали аналитические хроматографические колонки Eclipse Plus C18 (4,6 мм, 250 мм, 5 мкм, Agilent Technologies) и Poroshell 120, EC-C18 (2,1 мм, 100 мм, 2,7 мкм, Agilent Technologies).

Статистические данные обрабатывали при помощи лицензированного программного обеспечения СПЛАЙН.

Результаты и обсуждение

В ходе изучения состава фенольных веществ полыни нами было обнаружено наличие в её надземной части хлорогеновой кислоты и ее производных. Аналитические измерения проводили по методике, детально изложенной в работе [6]. В процессе изучения ряда особенностей состава растения, например, поиска принципиальных различий растения-донора с растением-акцептором, оказывающих влияние друг на друга, требуется работа со свежесобраным растительным материалом. Транспортировка растений от разных площадок сбора времязатратна. Поэтому мы изучали стабильность проб растений при хранении в холодильнике. При исследовании нелетучих фенольных соединений полыни оказалось, что хранение при +4°C приводит как к увеличению содержания этих веществ в пробе, так и к изменению соотношения основных компонентов пробы.

На рисунке 1 представлена хроматограмма надземной части свежесобранной полыни *Artemisia santonica* L.. На рисунке 2 — хроматограмма этого же растения после недельного хранения в холодильнике при +4°C.

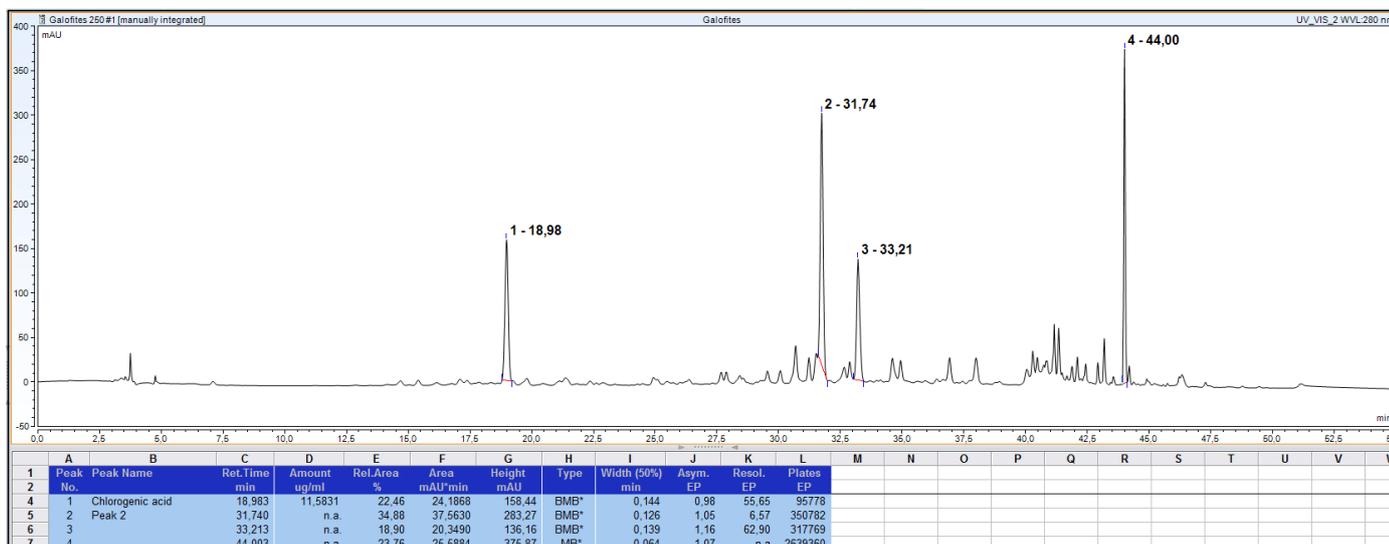


Рис. 1. — Хроматограмма надземной части свежесобранной полыни *Artemisia santonica* L. (280 нм).

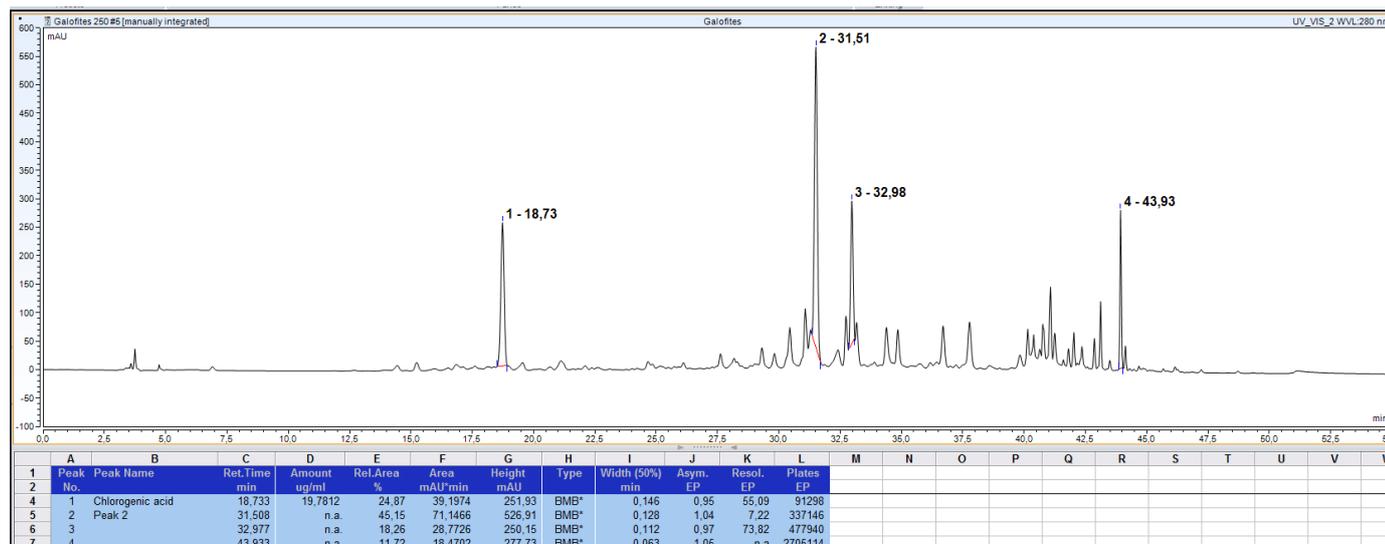


Рис. 2. — Хроматограмма надземной части полыни *Artemisia santonica* L. после хранения растения в течение 10 дней (280 нм).

В таблице 1 приведены данные количественного определения содержания хлорогеновой кислоты в растении, а также соотношение площадей пиков хлорогеновой кислоты и второго основного компонента пробы (исходя из площади хроматографического пика). В свежесобранном растении отношение площадей пиков 2 и 1 составляет 1,55 (рисунок 1), тогда как после хранения при охлаждении 1,82 (рисунок 2). Содержание этих двух веществ также меняется в сторону увеличения. Ультрафиолетовый спектр вещества 2 имеет фактор подобия спектров со стандартом 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты равный 99,1, но отличается по времени удерживания (рисунки 3–5).

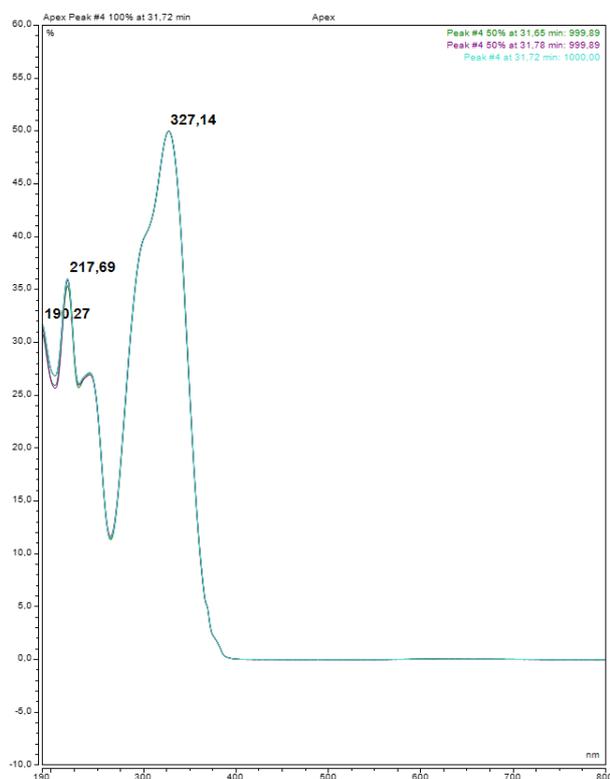


Рис. 3. — Спектр вещества 2 в диапазоне 190–800 нм.

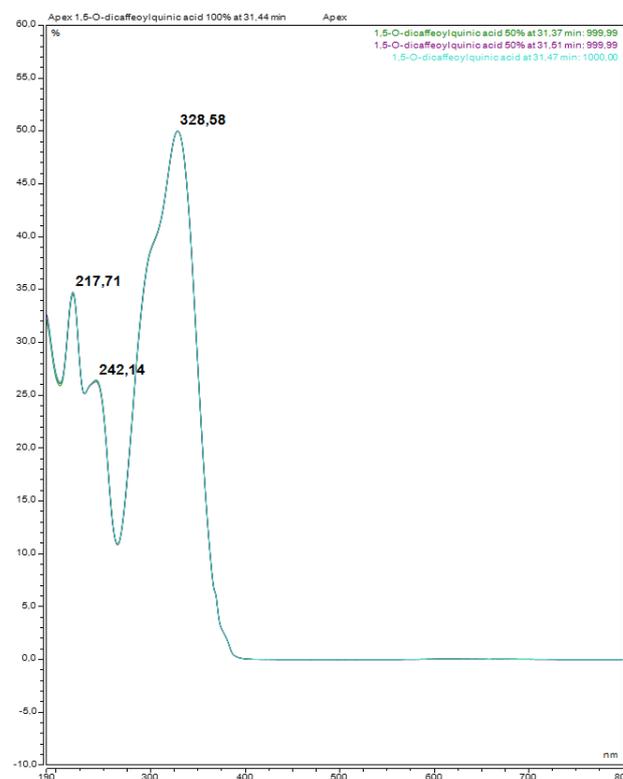


Рис. 4. — Спектр 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты в диапазоне 190–800 нм.

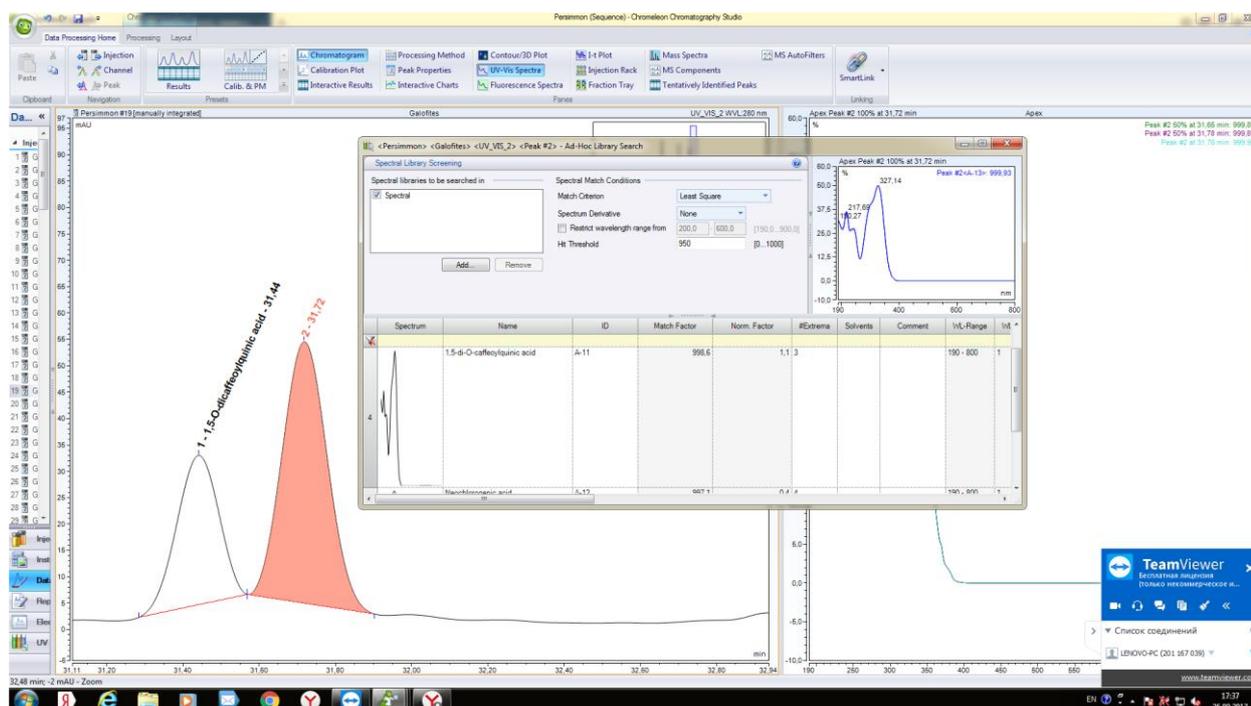


Рис. 5. — Разрешение пиков 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты и вещества 2 и подобие их спектров для сигналов сравнимой интенсивности.

Это позволяет предположить, что данное вещество является также ди-О-кофеилхинной кислотой, но другим изомером (по результатам эксперимента и литературным данным [7]). Полученные данные показывают нестабильность проб при хранении, наблюдается тенденция к изменению соотношения основных компонентов, а также изменения их концентрации в сторону увеличения.

Таким образом, нужно проводить пробоподготовку и анализ растения в день сбора, так как за время хранения данные по содержанию изучаемых веществ могут быть искажены. Следовательно, необходим мобильный метод анализа и быстрая пробоподготовка, что позволит выполнять большее число анализов в день, а значит и сравнивать больше растений.

Таблица 1

Содержание хлорогеновой кислоты в надземной части *Artemisia santonica* L.

№	Образец растительного сырья	Содержание хлорогеновой кислоты, мг/100 г	Отношение площади пика с временем удерживания 31,5 мин к площади пика хлорогеновой кислоты
1	<i>Artemisia santonica</i> L. (свежесобранная)	21,1±0,4	1,55
2	<i>Artemisia santonica</i> L. (хранение 10 дней)	33,6±0,5	1,82

На разных стадиях онтогенеза в растении происходит существенное изменение концентрации основных компонентов. Для оценки содержания биологически активных веществ с целью оценки возможности их препаративного выделения, а также выбора сезона для сбора сырья удобны методы полуколичественного определения, не требующие значительных затрат времени. С целью создания такого метода нами была выбрана

аналитическая колонка Poroshell 120, EC-C18 (2,1 мм, 100 мм, 2,7 мкм, Agilent Technologies). Отбирали пробу надземной части растения массой 5 г, измельчали ножницами до размера частиц 3–5 мм, перемешивали и отбирали образцы для анализа массой 500 мг. Такой образец перетирали в ступке с битым стеклом до измельчения в муку. Экстрагировали двумя порциями смеси вода — ацетонитрил (50/50 по объему), выдерживая в ультразвуке по 7 минут. Объединенный экстракт фильтровали через фильтр — насадку на шприц с диаметром пор 0,45 мкм.

Градиентное элюирование осуществляли по схеме, приведенной в таблице 2.

Таблица 2

Профиль градиента подвижной фазы для колонки Poroshell C18

Подвижная фаза	Время анализа, мин						
	0	1	6	9	10	10,5	12
А- ацетонитрил, %	5	5	30	90	100	100	95
В- раствор муравьиной кислоты (0,1 об. %) в деионизированной воде, %	95	95	70	10	0	0	95

Скорость потока элюента составила 1,3 мл/мин, объём дозируемой пробы 10 мкл, температура термостата колонок — 40 °С. Детектирование проводили на длинах волн 280 и 325 нм, так как длина волны 280 нм часто используется для изучения профиля всех нелетучих фенольных соединений, а 325 нм — это наиболее близкое значение к максимуму поглощения кофеилхиновых кислот. Время аналитического измерения в данных условиях удалось сократить до 12 минут, для уравнивания системы перед следующим анализом дополнительно насыщали колонку стартовой системой в течение 2 минут. Суммарные затраты времени с учётом подготовки пробы составили 33 минуты.

На рисунке 6 представлена хроматограмма надземной части *Artemisia taurica Willd.*, проанализированной в данных условиях.

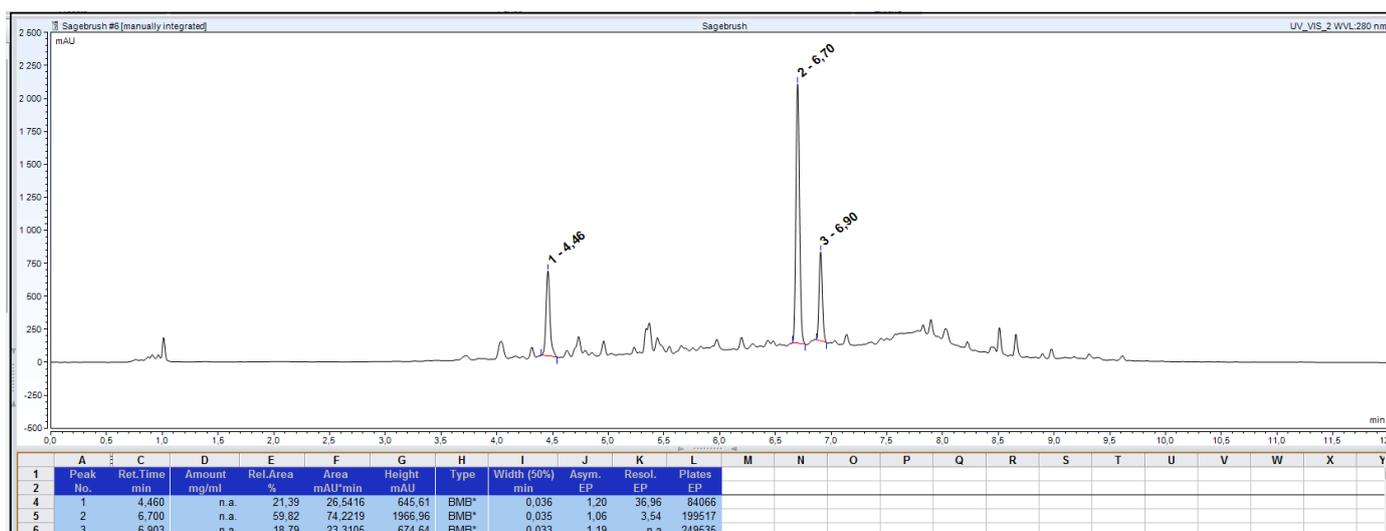


Рис. 6. — Хроматограмма надземной части полыни *Artemisia taurica Willd.* после хранения растения в течение 14 дней (280 нм).

Несмотря на сокращение времени эксперимента, удалось сохранить достаточное разрешение пиков основных компонентов пробы — 1, 2 и 3. Вещество 1 — хлорогеновая кислота, вещество 2 — не идентифицировано, вещество 3 соответствует веществу 2 с временем удерживая 31,5 мин в предыдущем эксперименте (фактор подобия спектров 99,98).

Для дополнительного сокращения времени анализа мы исследовали возможность оценки содержания хлорогеновой кислоты и дикофеилхинных кислот, используя простую пропорцию по данным площадей пиков вещества в пробе и стандартного образца, площадь пика которого находилась в диапазоне 50–200 % от площади пика исследуемого вещества в пробе. Результаты эксперимента приведены в таблице 3.

Таблица 3

Относительная погрешность аналитического измерения содержания кофеилхинных кислот в пробах наземной части *Artemisia taurica* Willd. в разных условиях

№	Условия	Хлорогеновая кислота	1,5-ди-О-кофеилхинная кислота
1	Количественное определение компонента по пяти калибровочным точкам	1,5%	1,6%
2	Полуколичественное определение методом простой пропорции, площадь пика стандартного образца 50–100% от площади пика вещества в пробе	4 %	5%
3	Полуколичественное определение методом простой пропорции, площадь пика стандартного образца 120–200% от площади пика вещества в пробе	>50%	>50%

Согласно полученным данным приемлемым условием для полуколичественного анализа является использование калибровочного стандарта, площадь пика которого находится в диапазоне 50–100 % от площади пика исследуемого вещества в пробе. Нами также изучена степень извлечения хлорогеновой и 1,5 — ди-О-кофеилхинной кислоты из сырья. Вносили добавку хлорогеновой и 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты (100 мкл раствора концентрацией 250 мкг/мл) в пробу полыни и определяли отношение внесено — найдено в условиях количественного анализа. Степень извлечения хлорогеновой кислоты составила 91%, дикофеилхинной — 83%. Предел обнаружения метода рассчитывали при помощи программного обеспечения СПЛАЙН.

Таблица 4

Некоторые метрологические характеристики методики

№	Параметр	Хлорогеновая кислота	1,5-ди-О-кофеилхинная кислота
1	Внесено/найденно, мкг в пробе	50,0/45,5	25,0/20,8
2	Предел обнаружения методики при детектировании на 280 нм, мг в 100 г сырой массы	1,0	1,5
3	Предел обнаружения методики при детектировании на 325 нм, мг в 100 г сырой массы	0,48	0,83

Таким образом, данная методика может быть использована для полуколичественной оценки содержания хлорогеновой кислоты и ее производных в полыни, например, для

мониторинга состава БАВ в растении на разных стадиях онтогенеза и определения наиболее благоприятного времени для сбора этого растительного сырья.

Выводы

В результате исследования нелетучих фенольных соединений полыни установлена нестабильность проб растения при хранении в холодильнике при +4°C. Показано, что содержание фенольных веществ увеличивается в процессе такого хранения, что по-видимому, связано с протеканием ферментативных процессов. Разработана методика быстрого полуколичественного определения гидроксикоричных кислот как основных компонентов в надземной части полыни. Данная методика удобна для мониторинга содержания хлорогеновой кислоты и её производных в полыни на разных стадиях онтогенеза растения, а также для контроля содержания этих веществ с целью последующего препаративного выделения.

Благодарность

Авторы выражают благодарность компании ООО «Спектроника» за своевременную техническую и методическую поддержку.

Литература

1. McDougall B. Dicafeoylquinic and Dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase // B. McDougal, P.J. King, B. Wen Wu, Z. Hostomsky [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1998 – V. 42, №1 – P. 140–146.
2. Yong Zhao. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis / Zhao Yong, Chang-An Geng, Yun-Bao Ma, Xiao-Yan Huang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014 – V. 156. – P. 147-154.
3. Яшин Я. И. Газовая хроматография / Я. И. Яшин, Е. Я. Яшин, А. Я. Яшин. – Москва: ТрансЛит, 2009. – 528 с.
4. Сычев К. С. Практический курс жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – М: КОКОРО. – 2013. – 261 с.
5. Лавренко Е. М. Степи / Е. М. Лавренко, Г. И. Билык // *Растительность европейской части СССР* / С. А. Грибова, Т. И. Исаченко, Е. М. Лавренко. – Ленинград : Наука, 1980. – С. 203-272.
6. Старцева О. В. Фенольные соединения плодов хурмы сортов коллекции Никитского ботанического сада / О. В. Старцева, И. Н. Палий, С. Ю. Хохлов, В. А. Мельников // *Таврический научный обозреватель*. – 2017. – № 4 (21), ч.1. – С. 179-183.
7. Zhang Lu. Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz / Zong-cai Tu, Tao Yuan, Hui Wang, Zhi-feng Fu [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2014 – V. 56 – P. 223-230.

FAST SEMI-QUANTITATIVE METHOD OF DETERMINATION OF CHLOROGENIC ACID AND ITS DERIVATIVES IN SAGEBRUSH

Startseva O.^{a,b}, Paliy I.^a, Simagina N.^b, Makaricheva A.^b

a — *Federal State Budgetary Institution of Science "Order of the Red Banner of Labor Nikitsky Botanical Garden — National Science Center" of the Russian Academy of Sciences Russia, Republic of Crimea, Yalta, Nikita.*

b — *Tavrida Academy of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University*

Abstract. Fast semi-quantitative method of determination of chlorogenic acid and its derivatives in sagebrush has been developed. Two wild-growing Crimean sagebrush species have been analyzed. The efficiency of this method to estimate the content of these biologically active compounds aiming to their further separation from herbal raw material has been shown.

Keywords: chromatography, phenolics, chlorogenic acid, di-O-caffeoylquinic acids, herbal raw material.

References

1. McDougall B. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase // B. McDougal, P.J. King, B. Wen Wu, Z. Hostomsky, M G. Reinecke, W. Edward Robinson Jr // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, V. 42, №1, pp. 140–146.
2. Yong Zhao. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis / Zhao Yong, Chang-An Geng, Yun-Bao Ma, Xiao-Yan Huang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, V. 156, pp. 147-154.
3. Jashin Ja.I. Gazovaja hromatografija / Ja.I. Jashin, E. Ja. Jashin, A. Ja. Jashin. Moskva: TransLit, 2009, 528 p.
4. Sychev K.S. Prakticheskij kurs zhidkostnoj hromatografii / K.S. Sychev // M: KOKORO, 2013, 261 p.
5. Lavrenko E.M. Stepi / E. M. Lavrenko, G. I. Bilyk // *Rastitel'nost' evropejskoj chasti SSSR / S. A.Gribova, T. I. Isachenko, E. M.Lavrenko–Leningrad : Nauka*, 1980, pp. 203-272.
6. Starceva O. V. Fenol'nye soedinenija plodov hurmy sortov kollekcii Nikitskogo botanicheskogo sada // O. V. Starceva, I. N.Palij, S. Ju Hohlov., V. A. Mel'nikov // *Tavriceskij nauchnyj obozrevatel'*, 2017, № 4 (21), part 1, pp. 179-183.
7. Zhang Lu. Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz / Zong-cai Tu, Tao Yuan, Hui Wang, Zhi-feng Fu, Qing-hui Wen, Xiao-qin Wang // *Industrial Crops and Products*, 2014, V. 56 , pp. 223-230.