

**ОБНАРУЖЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ
КВЕРЦИТИН В НАСТОЙКЕ ПРОПОЛИСА МЕТОДОМ МАТРИЧНО-
АТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИИ/ИОНИЗАЦИИ**

Ситникова Елена Анатольевна, магистр химии, начальник НПО МФ «ЭКОлаб», 142530, Россия, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1, e-mail: lalobai@yandex.ru.

Марданлы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, директор ЗАО «ЭКОлаб» по науке, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин Государственного гуманитарно-технологического университета «ГГТУ», 142611, Россия, Московская обл., г. Орехово-Зуево, ул. Зеленая, д.22, e-mail: ekolab-president@mail.ru.

Багателия Саида Амирановна, технолог НПО МФ «ЭКОлаб», 142530, Россия, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1, e-mail: ekolab-bagateliya@mail.ru.

В настоящей статье представлены результаты обнаружения полифенольного соединения кверцитин в продуктах пчеловодства на примере настойки прополиса методом метод матрично-ативированной лазерной десорбции/ионизации в сочетании с тонкослойной хроматографией (МАЛДИ/ТСХ). Масс-спектры МАЛДИ регистрировали с металлических мишеней и пластин ТСХ на масс-спектрометре оснащенный твердотельным УФ-лазером и рефлектроном. Масс-спектры получали в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Максимальная энергия лазера составила 8 КДж/м². Для визуализации пятен на тонкослойных хроматограммах использовали освещение УФ-лампой в УФ-кабинете. В целом, данные

МАЛДИ/ТСХ позволили сделать вывод о наличии полифенольных соединений кверцетин и дигидрокверцетин в настойке прополиса.

Ключевые слова: кверцетин, дигидрокверцетин, МАЛДИ, ТСХ, полифенольные соединения, настойка прополиса

УДК 615.322

**DETECTION OF THE POLYPHENOLIC COMPOUND
QUERCETIN IN PROPOLIS TINCTURE BY THE METHOD OF
MATRIX-ACTIVATED LASER DESORPTION / IONIZATION**

Sitnikova Elena Anatolyevna, Master of Chemistry, Head of the Scientific Production Department of Soft Forms in CJSC «EKOlab», 142530, Russia, Moscow Region, Elektrogorsk, 1, Budennogo str., e-mail: lalobai@yandex.ru.

Seifaddin Gashimovich Mardanly, Doctor of Medical Sciences, R&D Director in CJSC «EKOlab», Professor at the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, State University of Humanities and Technology, 142611, Russia, Moscow Region, Orekhovo-Zuyevo, 22, Zelenaya str., e-mail: ekolab-president@mail.ru

Bagatelia Saida Amiranovna, technologist of the NPO MF ECOlab, 142530, Russia, Moscow Region, Elektrogorsk, ul. Budyonny, 1, e-mail: ekolab-bagateliya@mail.ru.

This article presents the results of the detection of polyphenolic compound quercetin in bee products using the example of propolis tincture using the method of matrix-activated laser desorption / ionization in combination with thin-layer chromatography (MALDI / TLC). The MALDI mass spectra were recorded from metal targets and TLC plates on a speed mass spectrometer equipped with a solid-state UV laser and a reflector. Mass spectra were obtained in the registration mode of positively charged ions. The maximum laser energy was 8 KJ/m². To visualize

the spots on thin-layer chromatograms, we used UV-lamp illumination in the UV-cabinet. In general, the MALDI / TLC data made it possible to conclude that quercetin and dihydroquercetin are present in the propolis tincture of polyphenolic compounds.

Key words: quercetin, dihydroquercetin, MALDI, TLC, polyphenolic compounds, propolis tincture

Во всем мире проводятся научные исследования прополиса, его состава и свойств. Многие исследователи отмечают заметные различия в его составе в зависимости от места происхождения и времени сбора. Возможной причиной таких различий являются источники клейких веществ и пыльцы: деревья и цветы, с которых пчелы проводят сбор. Так, в статье [1] показано, что имеют место значительные различия в содержании флавоноидов в образцах прополиса из Бразилии и Южной Африки. В статье [2] в качестве мажорных компонентов бразильского прополиса указаны дитерпеновые кислоты, тритерпеновые спирты и кетоны. В работе [3] при исследовании фенольных соединений в пробах прополиса из Венесуэлы был обнаружен пренилированный бензофенон. По результатам многочисленных исследований в работе [4] выделено несколько типов прополиса, для которых типичными компонентами являются пиносембрин, ринобаскин, ринобаскин-3-О-ацетат, хризин, галангин и производные кофейной кислоты (бензил, пренил и фенилэтил).

Из литературных источников, известно, что в образцах прополиса, независимо от региона происхождения, присутствуют феноловые кислоты и флавоноиды [5].

Известны следующие методы качественного и количественного определения веществ указанного строения: УФ-спектрофотометрический, ГХ и ВЭЖХ с масс-детектированием, гальваностатическая кулонометрия [6,7,8,9,10,11,12].

Один из представителей класса флавоноидов, имеющий полифенольную структуру – кверцитин, повсеместно встречающийся в растительных препаратах и препаратах апитерапии (рис.1).

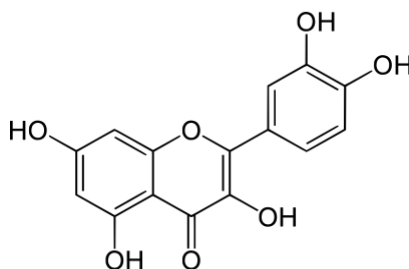


Рис.1. Структурная формула 3,3',4',5,7–пентагидроксифлавона (кверцитин)

Вышеуказанные методы определения полифенолов достаточно дорогостоящие и трудоемкие, поэтому разработка новых способов определения, несомненно, интересна. Работы по прямому сочетанию методов МАЛДИ/ТСХ для проведения контроля качества продуктов пчеловодства отсутствуют.

Целью настоящего исследования явился контроль качества по показателю подлинность продуктов пчеловодства на примере настойки прополиса, изучение возможности определения кверцитина в продуктах пчеловодства методом МАЛДИ/ТСХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследована настойка прополиса серия 70715, годен до 07.18 г. ООО «Тульская фармфабрика».

Масс-спектры МАЛДИ регистрировали с металлических мишеней и пластин ТСХ на масс-спектрометре Bruker autoflex speed, оснащенном твердотельным УФ-лазером с $\lambda=355$ нм и рефлектроном. Масс-спектры получали в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Максимальная энергия лазера составила 8 КДж/м². Для визуализации пятен на тонкослойных хроматограммах использовали освещение УФ-лампой в УФ-кабинете SAMAG (Швейцария). Для разделения компонентов

анализируемых проб использовали смесь растворителей хлороформ-метилловый спирт-вода. Далее пятна на пластинах ТСХ визуализировались, покрывались матричной композицией глицерин-графит-дитранол и облучались лазером зоны элюирования, соответствующие Rf кверцитина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие нескольких слабокислых фенольных гидроксильных групп у кверцитина и дигидрокверцитина дает основание предполагать, что соединения должны обладать сравнительно высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях МАЛДИ.

Для дериватизации кверцитина в 200 мкл тетрагидрофурана растворяли 15 мкл спирта и 20 мкл триэтиламина. К полученной смеси добавляли 15 мкл бромацетилхлорида (или другого галоацилхлорида: хлорацетил хлорида, 3-бромпропионил хлорида, 4-хлорбутирил хлорида), после чего смесь интенсивно перемешивали в шейкере при комнатной температуре в течении 30 секунд. Полученную реакционную смесь без дополнительной очистки смешивали с раствором матрицы.

Для дериватизации на контур визуализированных пятен (после проведения метода ТСХ) наносили каждое пятно аналита с использованием микролитровой пипетки и киста наносили последовательно по 2 мкл 3-бромпропионилхлорида и пиридина. После высушивания на пластины ТСХ мягкой кистью наносили комбинированные матрицы и регистрировали масс-спектры.

Матричная композиция была выбрана, основываясь на результатах оптимизации пробоподготовки стандартного вещества.

Так как на первом этапе работы было установлено, что использование дитранола позволяет регистрировать масс-спектры МАЛДИ соединения кверцитин, дигидрокверцитин для получения их масс-спектров с пластин ТСХ была использована композитная матрица с добавлением дитранола. Применение этого подхода позволило получить масс-спектры указанных

целевых аналитов (Рис.2-3). Снижение соотношения сигнал/шум в случае целевых соединений при этом объясняется снижением концентрации аналита в приповерхностном слое сорбента.

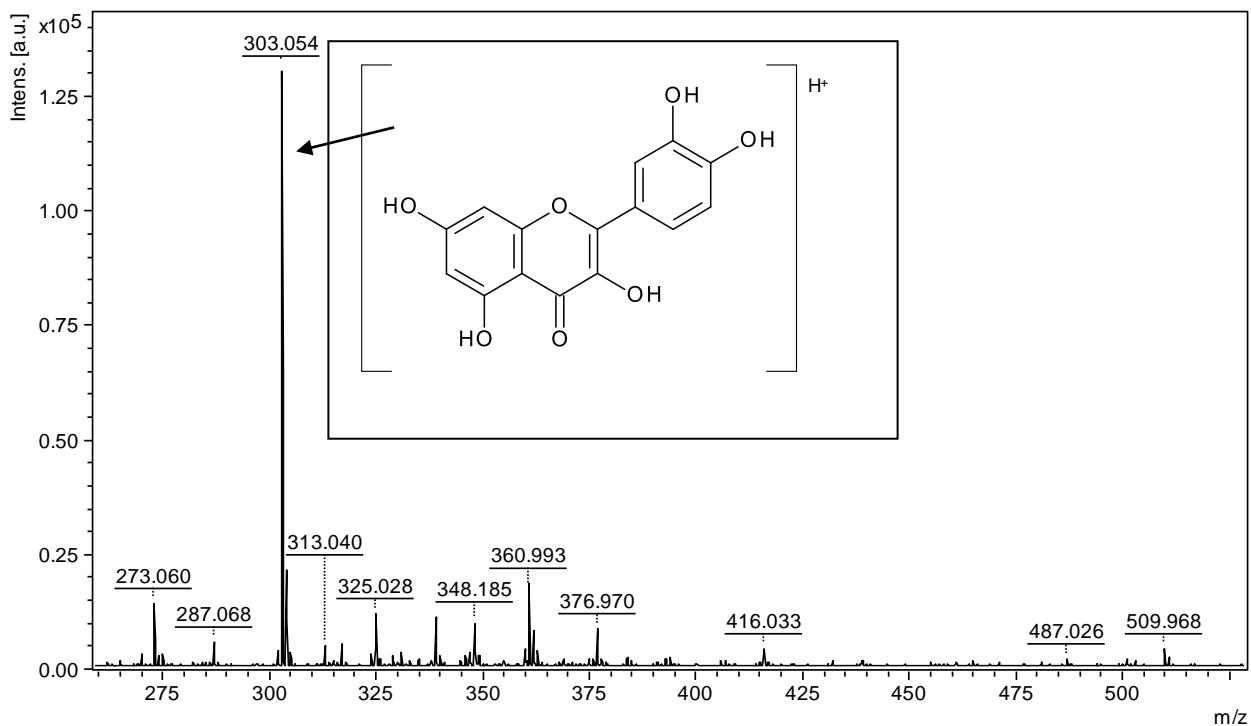


Рис.2. Масс-спектр МАЛДИ кверцетина, полученный с пластины ТСХ с использованием композитной матрицы глицерин-графит-дитранол.

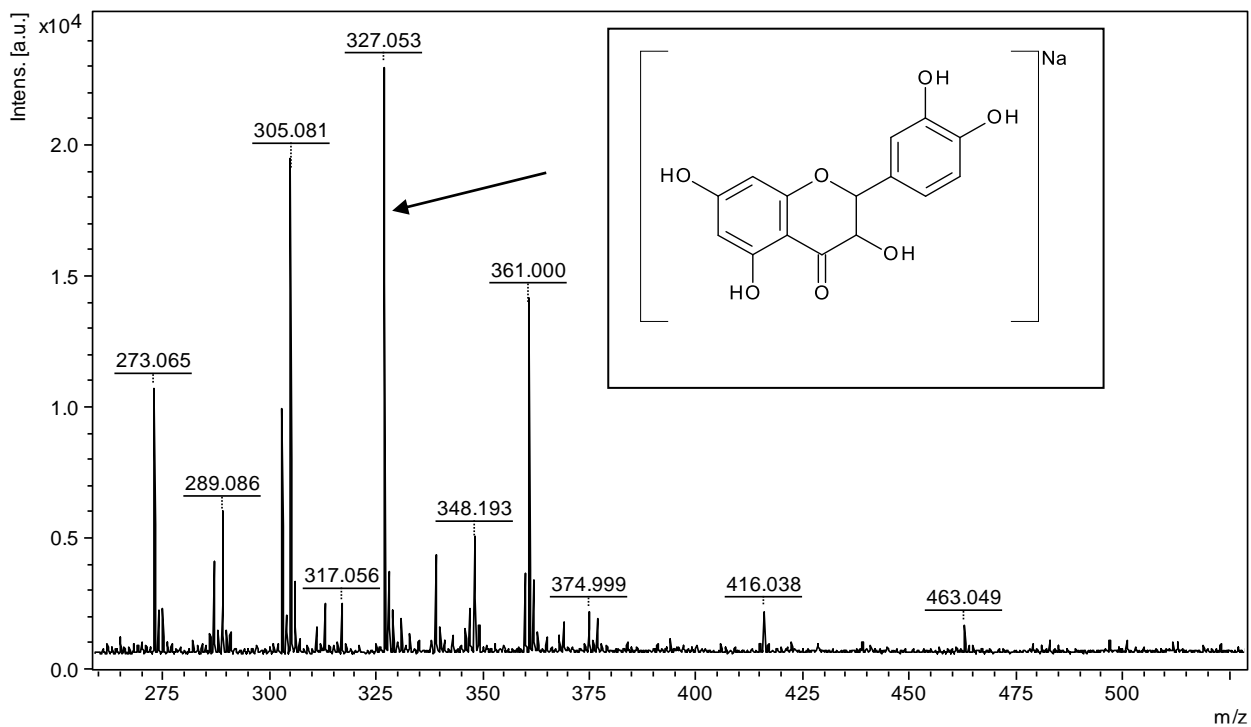


Рис.3. Масс-спектр МАЛДИ дигидрокверцетина, полученный с пластины ТСХ с использованием композитной матрицы глицерин-графит-дитранол.

Полученные масс-спектральные данные исследования настойки прополиса показали, что зоны элюирования соединений кверцетина и дигидрокверцетина перекрываются и регистрируемые масс-спектры одновременно содержат соответствующие им пики ионов, что подтверждает их присутствие в образце (рис. 4).

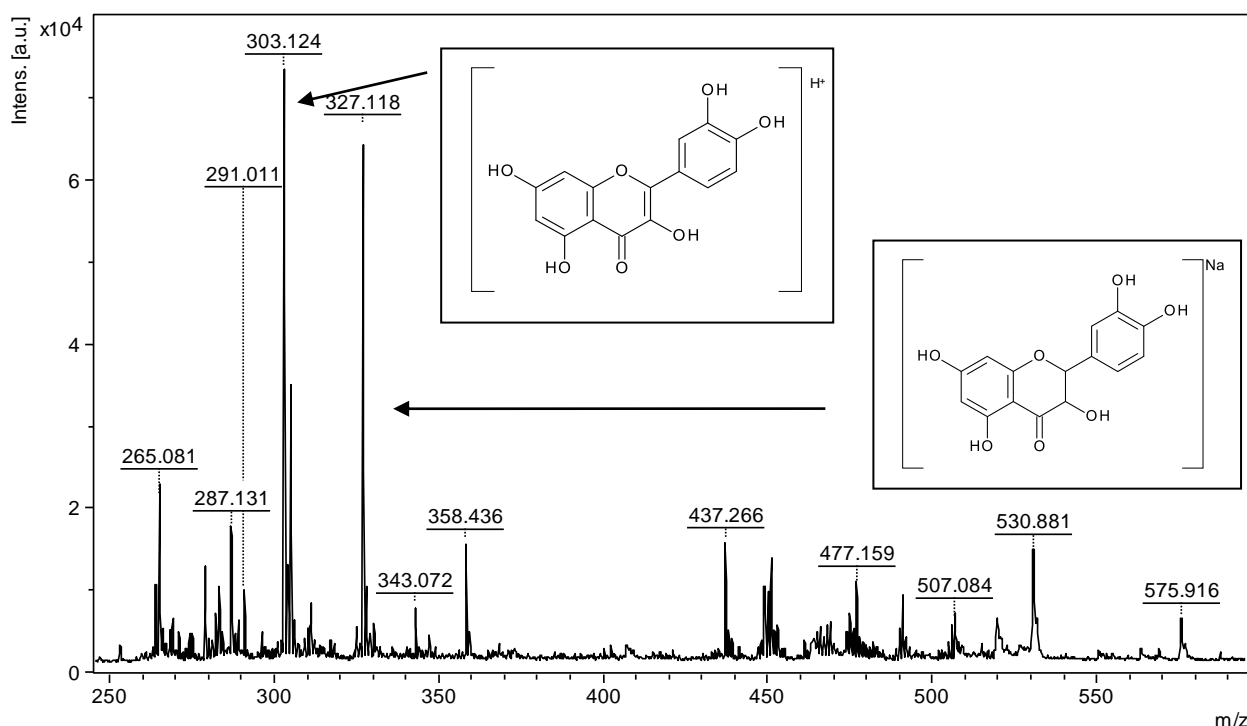


Рис.4. Масс-спектр МАЛДИ, полученный с поверхности пластины ТСХ с разделенными компонентами экстракта прополиса.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования:

1. Разработана инновационная методика качественного подтверждения присутствия кверцетина в настойке прополиса методом МАЛДИ/ТСХ.
2. Проведен контроль качества настойки прополиса по показателю подлинность методом МАЛДИ/ТСХ.

3. Подтверждено присутствие в настойке прополиса кверцетина и дигидрокверцетина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. D.Rasote, N.Suleman, W.Chen, M.Sandasi, A. Viljoen , S.van Vuuren
Chemical profiling and chemometric analysis of South African, Propolis // *Biochemical Systematics and Ecology*, 55(2014).p156-163
2. Bankova V., Christov R., Marcucci C., Popov S. Constituents of Brazilian geopropolis, *Z.Naturforsch.* (1998) 402–406.p.53
3. Tomas-Barberan F.A., Garcia-Viguera C., Vit-Olivier P., Ferreres F., Tomas-Lorente F.,Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela,*Phytochem.* 34(1993).p.191–196
4. V S. Bankova, S. L. de Castro,M. C. Marcucci Propolis: recent advances in chemistry and plant origin/*Apidologie.* 2000.31. p.10-11
5. D. G. Orlandini, D.Pinetti, S.Benvenuti, HPLC-DAD and HPLC-ESI-MC/MC methods for metabolite profiling of propolis extracts//*J. Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 55 920110.p.934-348
6. H.Cheng, Z.H. Qinc, X.F. Guo, X.S. Huc, J.H. Wu Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis// *Food Research International* 51 (2013) 813–822
7. Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193,no. 1, p. 265–275.
8. Лупина Е.В., Писарев Д.И., Новиков О.О., Малютина А.Ю., Васильев Г.В., Васильева Ю.Г. Химическое изучение состава флавонов и флавонолов в прополисе, *Фармация и фармакология.* 2018;6(3):241-254.
9. ГОСТ Р 55488-2013 Прополис. Метод определения полифенолов.
10. Xiao P., Zhao F., Zeng B. // *Microchem. J.* 2007. V. 85. № 2. P. 244.
11. J.M. Halket, V.G.Zaikin, Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation // *Eur. J. Mass Spectrom.* 9. 1, 2003

12. V.G. Zaikin, J.M. Halket, Derivatization in mass spectrometry - 2. Acylation // *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 42, 2003

REFERENCE

1. D.Rasote, N.Suleman, W.Chen, M.Sandasi, A. Viljoen , S.van Vuuren
Chemical profiling and chemometric analysis of South African, Propolis // *Biochemical Systematics and Ecology*, 55(2014).p156-163
2. Bankova V., Christov R., Marcucci C., Popov S. Constituents of Brazilian geopropolis, *Z.Naturforsch.* (1998) 402–406.p.53
3. Tomas-Barberan F.A., Garcia-Viguera C., Vit-Olivier P., Ferreres F., Tomas-Lorente F.,Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela,*Phytochem.* 34(1993).p.191–196
4. V S. Bankova, S. L. de Castro,M. C. Marcucci Propolis: recent advances in chemistry and plant origin/*Apidologie.* 2000.31. p.10-11
5. D. G. Orlandini, D.Pinetti, S.Benvenuti, HPLC-DAD and HPLC-ESI-MC/MC methods for metabolite profiling of propolis extracts//*J. Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 55 920110.p.934-348
6. H.Cheng, Z.H. Qinc, X.F. Guo, X.S. Huc, J.H. Wu Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis// *Food Research International* 51 (2013) 813–822
7. Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193,no. 1, p. 265–275.
8. Lupina E.V., Pisarev D.I., Novikov O.O., Malyutina A.Yu., Vasiliev G.V., Vasilieva Yu.G. Chemical study of the composition of flavones and flavonols in propolis, *Pharmacy and pharmacology.* 2,018; 6 (3): 241-254 (in Russian).
9. GOST R 55488-2013 Propolis. Method for determination of polyphenols (in Russian).
10. Xiao P., Zhao F., Zeng B. // *Microchem. J.* 2007. V. 85. № 2. P. 244.

11. J.M. Halket, V.G.Zaikin, Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation // Eur. J. Mass Spectrom. 9, 1, 2003
12. V.G. Zaikin, J.M. Halket, Derivatization in mass spectrometry - 2. Acylation // Eur. J. Mass Spectrom.9, 42, 2003