

В. А. Сысоев, Д. А. Халитова

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНОГО СОСТАВА КОРЫ МУШМУЛЫ МЕТОДАМИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Ключевые слова: экстракт мушмулы, фенольный состав, хроматография, спектрофотометрия.

Проведено изучение фенольного состава коры мушмулы методами УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что доминирующей группой биологически активных веществ (БАВ) являются дубильные вещества и мономерные катехины.

Keywords: medlar bark, chromatography, UV-spectrophotometry.

The research of phenolic profile of medlar's bark using UV-spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) was done. It was established that dominating group of the biologically active agents (BAA) are tannins and monomeric catechins.

Создание высокоэкологических технологий в производстве кожи и меха, является существенной составляющей процесса инновационного развития отрасли. Указанные технологии могут быть основаны, как на применении химических добавок и модификаторов, позволяющих повысить степень использования компонентов рабочих растворов, так и на частичной или полной замене их аналогами растительного происхождения [1,2].

При изучении химического состава растительного сырья, в частности для количественного определения дубильных веществ традиционно используют известный перманганатометрический метод — метод Левенталья. Это фармакопейный титриметрический метод, основан на легкой окисляемости полифенолов перманганатом калия в кислой среде в присутствии индикатора и катализатора *индигосульфокислоты*, которая в точке эквивалентности раствора меняет его цвет от синего до золотисто-желтого. Однако перманганат калия является сильным окислителем в кислой среде, при титровании в реакцию вступают не только дубильные вещества, но и другие группы БАВ (витамины, фенолы, дигидрофлавоноиды и др.), что приводит к завышенным результатам.

Данная работа посвящена изучению состава фенольных соединений, экстрагированных из коры мушмулы и разработке селективной методики их количественного определения с использованием современных физико-химических методов исследования.

Экспериментальная часть

Для разработки метода количественного анализа по доминирующим группам БАВ необходимо детальное изучение химического состава коры мушмулы. Ранее сообщалось [3], что методами тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии удалось обнаружить в листьях мушмулы — кустарникового растения, широко распространенного на Северном Кавказе и в Дагестане, флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, эфирные масла,

каротиноиды, тритерпеновые сапонины. Кора мушмулы также может содержать широкий спектр дубящих и красящих соединений, которые могут быть использованы для создания «чистых» технологий выделки и крашения кожевно-мехового полуфабриката [2].

Для анализа фенольного состава коры мушмулы использовали метод ВЭЖХ, отличающийся высокой чувствительностью и точностью, позволяющий достоверно судить о качественном составе изучаемой группы БАВ. Исследование проводили на приборе «Gilson» с последующей компьютерной обработкой результатов (программа «Мультихром» для «Windows»). В работе применяли обращеннофазный вариант метода, в качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку «Alltima C-18» (4,61 250 мм); подвижная фаза: метанол—вода—концентрированная фосфорная кислота в соотношении 40:60:0,5. Анализ проводили при комнатной температуре (20°C) в изократическом режиме элюирования. Скорость подачи элюента 0,7 мл/мин. Для детектирования использовали УФ-детектор ($\lambda = 254$ нм). Продолжительность анализа составляла 42 мин.

Методика проведения анализа

10 г коры мушмулы измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (ГОСТ 214-83).

Навеску измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 70 мл 70%-го спирта и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания водно-спиртовой смеси; экстракцию повторяют дважды. Извлечения охлаждают, объединяют и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем тем же растворителем до метки (раствор А). Параллельно готовят 0,05%-е растворы сравнения в метаноле: рутина, кверцетина, кемпферола, гесперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, галловой, цикореовой, феруловой,

эллаговой, хлорогеновой, салициловой и коричной кислот, танина, пирогаллола, эпикатехина. По 20 мкл исследуемого раствора и растворов сравнения вводят в хроматограф и анализируют в условиях, описанных выше. Полученные результаты приведены на рис. 1 и в таблице 1.

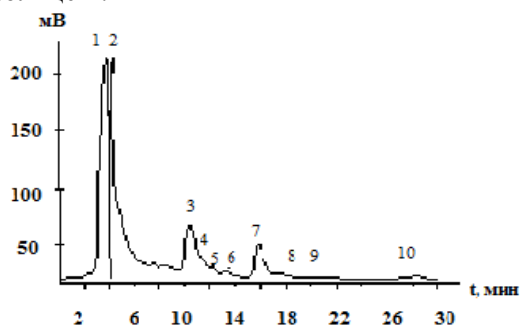


Рис. 1 - Хроматограмма 70% спиртового извлечения из коры мушмулы

Таблица 1 - Идентифицированные БАВ

Номер пика	Название	Время удерживания, мин
1	Хлорогеновой кислоты	4,67
2	Галловой кислоты	4,83
3	Цирконовая кислота	10,83
4	Гесперидин	12,25
5	Пирогаллол	12,75
6	Лютеолин-7-гликозид	14,17
7	Эллаговая кислота	16,42
8	Лютеолин	18,33
9	Салициловая кислота	20,58
10	Коричная кислота	28,67

Таким образом, извлечения, полученные из коры мушмулы, содержат следующие вещества фенольной природы, идентифицированные по времени удерживания стандартных растворов: гесперидин, лютеолин, лютеолин-7-гликозид, галловая, цикориевая, эллаговая, хлорогеновая, салициловая и коричная кислоты, а также танин, пирогаллол.

С помощью ВЭЖХ-анализа удалось подтвердить качественный фенольный состав веществ, идентифицированных ранее с помощью тонкослойной хроматографии, а также получить представление о том, какие фенольные соединения доминируют в изучаемом растительном сырье, что крайне необходимо для последующей разработки методики их количественного определения.

Разработке оптимальной методики количественного анализа предшествовала работа по изучению поглощений в УФ-области спектра водно-спиртовых извлечений, приготовленных по нижеприведенной методике.

Методика приготовления водно-спиртовых извлечений

Около 10 г навески коры мушмулы помещают в колбу объемом 200 мл, добавляют 70 мл 70%-го спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания водно-спиртовой смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, и доводят объем этим же растворителем до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,5 мл раствора А, доводят соответствующим растворителем до метки и перемешивают.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на саморегистрирующем спектрофотометре "Gelios" (США) в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали 70%-й спирт.

Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность РСО хлорогеновой кислоты в 70%-м спирте. Для этого 0,055 г (точная навеска) хлорогеновой кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл 70%-го спирта, перемешивали до растворения и доводили 70%-м спиртом до метки (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5 мл раствора Б и доводили до метки 70%-м спиртом. Расчет количественного содержания фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухую массу в сырье проводили по формуле: потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оптическую плотность растворов стандартных образцов: рутина, кверцетина, кемпферола, гесперидина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, галловой, цикориевой, феруловой, эллаговой, хлорогеновой, салициловой и коричной кислот, танина, пирогаллола, эпикатехина измеряли в 10%-м спирте. Результаты проведенных исследований приведены в табл.2.

Таблица 2 - Результаты спектрофотометрического определения 70%-го спиртового извлечения из коры мушмулы и растворов стандартных образцов

УФ-спектр поглощения	Максимум поглощения
Исследуемого извлечения	280
Арбутина	221, 285
Хлорогеновой кислоты	235, 244, 324
Галловой кислоты	267
Эпикатехин	279
Кверцетин	256, 291, 371
Рутин	257, 358

Обсуждение результатов

Полученные данные свидетельствуют о том, что спектры поглощения водно-спиртовых

извлечений из сырья имеют максимум поглощения при длине волны 280 нм. Поскольку наличие полос поглощения при 250—290 и 320—380 нм характерно для соединений фенольного ряда, можно сделать вывод о содержании в извлечениях флавоноидов, дубильных веществ и фенолкарбоновых кислот, что согласуется с результатами, полученными методом ВЭЖХ.

Фенольные соединения являются доминирующими в изучаемом сырье. Поскольку эти вещества поглощают в УФ-области спектра, при разработке методики количественного анализа за основу предложен метод УФ-спектрофотометрии.

При разработке методики количественного определения компонентов растительного сырья необходимо учитывать основные гидродинамические факторы экстракционного процесса.

Оптимальным экстрагентом оказался 70%-й этиловый спирт.

Экстрагирование биологически активных соединений из коры мушмулы целесообразно проводить однократно, так как при удлинении времени экстракции содержание фенольных веществ в сырье не увеличивается. Опытным путем установлено оптимальное соотношение сырье:экстрагент (1:10), время экстракции (1 час) и средний размер сырья — 2 мм.

При выборе аналитической длины волны опирались на данные, полученные в результате УФ-спектрофотометрического исследования водно-спиртового извлечения из сырья и рабочего стандартного образца (PCO) хлорогеновой кислоты. Максимумы спектров поглощения изучаемых объектов совпадают при 280-290 нм (рис. 2). Выбор хлорогеновой кислоты в качестве PCO обусловлен ее доминированием в количественном отношении и наличием плеча (280-300 нм) в УФ-области спектра.

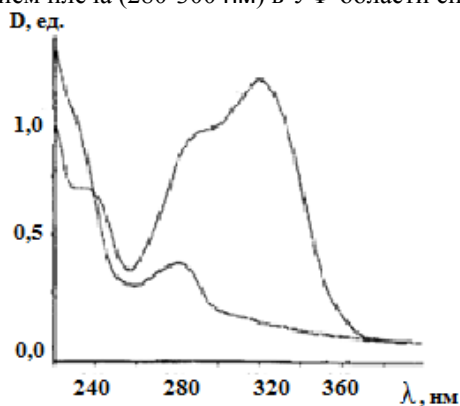


Рис. 2 - УФ-спектры поглощения 70%-го водно-спиртового извлечения из коры мушмулы (Г) и PCO хлорогеновой кислоты (2)

Результаты исследований и метрологические характеристики методики количественного определения фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту следующие: содержание фенольных соединений составляет 1,85% при относительной погрешности $\pm 4,35\%$ (для доверительной вероятности 95%). Отсутствие систематической ошибки методики доказано опытами с добавками PCO хлорогеновой кислоты в навеску сырья. При этом относительная ошибка эксперимента не превышает 0,5% и находится в пределах случайной погрешности предложенной методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при определении содержания фенольных соединений в коре мушмулы в пересчете на PCO хлорогеновой кислоты.

Таким образом, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию и УФ-спектрометрию, экспериментально установлены параметры для разработки методики количественного анализа фенольного состава растительных экстрактов, обладающих дубящими и красящими свойствами. При этом установлено, что доминирующей группой биологически активных веществ являются дубильные вещества и мономерные катехины.

Литература

1. В.А.Сысоев, А.Р.Гарифуллина, Вестник Казан. технол. ун-та, 11, 541-546 (2010).
2. В.А.Сысоев, И.Ш.Абдуллин, А.И.Салимова, Е.А.Панкова, КОП, 1, 48-50 (2004).
3. В.А. Сысоев, Д.А. Халитова, Вестник Казан. гос. технол. ун-та, 10, 140 – 144 (2012).