ИЗУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ЭКСТРАКТА ЖМЫХА МАЛИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ МЕТОДОМ ГХ-МС

Полищук И.Н., Комиссаренко А.Н., Ильина Т.В., Комиссаренко Н.А.
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Известно, что природные биологически активные соединения, как исходные субстанции в производстве лекарств, имеют целый ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с субстанциями химического происхождения. В этой связи особый интерес представляет изучение отдельных комплексов природных БАВ. Одним из представителей таких комплексов являються органические кислоты. Органические кислоты - это большая и разнообразная по своим свойствам группа биологически активных соединений, которая содержится в большинстве пищевых и лекарственных растений. Органические кислоты наряду с углеводами и белками - самые распространенные вещества в растениях. В некоторых видах их общее содержание превосходит количество белков и углеводов. Содержание органических кислот в различных органах растений неодинаково. Меньше всего их содержится в семенах (около 0,5%). В листьях злаков (пшеница, кукуруза, рожь, овес, ячмень), а также бобовых (горох, бобы, клевер, вика), тыквенных, сахарной свеклы, топинамбура органические кислоты составляют 8-12%. Особенно много кислот в плодах различных фруктов, например в плодах лимона (до 40%).Уже сам факт столь широкого распространения органических кислот в растениях достаточно убедительно указывает на их существенное значение в жизни представителей растительного мира. Они принимают активное участие во многих важнейших жизненных процессах растений: в дыхании, в биосинтезе жиров, пигментов (хлорофилла), пектинов, лигнина, камедей, ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана. Кроме того обладают антиоксидантной, противовоспалительной, иммуномодулирующей активностью, принимают участие в обмене веществ, положительно влияют на усвоение пищи, создают благоприятные условия для жизнедеятельности полезных микроорганизмов кишечника.Установлено, что они способствуют уменьшению процессов нитрозирования организме и снижению химического канцерогенеза. Некоторые кислоты обладают антиоксидантными, противоаллергические и противовоспалительные свойства, а так же утоляют жажду, берут участие в обмене веществ, повышают защитные силы и жизненный тонус организма. Яблочная кислота влияет на усвоение железа и синтез гемоглобина. Кроме этого, органические кислоты широко используют в косметологии как кератолитическое средства. Расположены они во всех органах растений в свободном состоянии в виде солей, эфиров, димеров и соединений с другими веществами [1,2].

Поэтому поиск новых растительных источников, богатых органическими кислотами, а также разработка методик их количественного определения в

лекарственном растительном сырье (ЛРС) является весьма актуальным направлением исследований

В этой связи особый интерес представляет изучение лекарственных растений, содержащих богатейший комплекс природных органических кислот. Одним из таких растений является малина обыкновенная использующаяся в медицинских целях в виде свежесобранных и высушенных плодов малины.

Продолжая фитохимические исследования малины обыкновенной[3-7], нами была поставлена задача исследовать органические кислоты с использованием метода ГХ-МС. Известно, что органические кислоты играют важную роль в обмене веществ растений.

Материалы и методы. Объектом исследования был экстракт, полученный из жмыха плодов R. idaeus собранной в местах ее культивированния. Сбор материала проводился в 2017 году в период плодоношения в окрестностях поселка Терновая, Харьковской области. Из плодов выдавливали сок, после чего полученный жмых высушивали и заливали 80% спиртом в соотношении 1: 5 с учетом коэффициента поглощения.

Исследования проводили следующим образом: к 0,50 мг экстракта в виале на 2 мл добавляли Внутренний стандарт (50 мкг тридекана в гексане) и 1,0 мл метилирующего агента - 14% BCl3 в метаноле, Supelco №3-3033. Смесь выдерживали в герметически закрытых виалах 8 часов при 65 ° С В это время из экстракта полностью экстрагируется жирное масло и проходить переэтерификация жирных кислот. Реакционную смесь сливали с осадка и разбавляли 1 мл дистилированой воды. Для получения метиловых эфиров жирных кислот добавляли 0,2 мл хлористого метилена, встряхивали течение 1 час и подвергали хроматографии.

Введение пробы 2 мкл в хроматографическую колонку проводили в режими splitless (без распределения потока), что позволяет ввести пробу без потерь на разделение и существенно до 20 раз увеличить чувствительность метода хроматографии. Скорость введения пробы - 1 мл / мин, срок - 0,2 мин.

Анализ метилового эфиров жирных кислот проводили с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N / 6890N MSD / DS Agilent Technologies (США).

Детектор - масс-спектрометра - квадруполь, способ ионизации электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для распределения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX, (30м × 250 мкм). Неподвижная фаза - INNOWAX. Подвижная фаза - гелий, скорость потока газа 1 мл / мин. Температура нагревателя введения пробы - 250 ° С температура термостата программируется от 50 до 250 ° С

Идентификацию метилового эфиров кислот проводили на основе расчета эквивалентной длина алифатические цепи (ECL) с использованием данных библиотеки масс-спектров NIST 05 и Willey 2007 по общему количеству спектров более 470000 в сочетании с программами для идентификации AMDIS

и NIST; так же сравнивали время удержания со временем удержания стандартных Соединение (Sigma).

Для расчета количественного определения компонентов применяли формулу:

C = K1 * K2 * 1000 (мг / кг),

где: K1 = П1 / П2 (П1 площадь пика исследуемого вещества, П2 - площадь пика стандарта);

K2 = 50 / M, 50 - масса внутреннего стандарта, введенного в исследуемой образец, мкг

M - навеска исследуемого вещества, мг

C - содержание органических кислот в сырьё, мг / кг.

Результаты исследования приведены в таблице 1

Таблица 1

Содержаниние органических кислот спиртового экстракта жмыха малины обыкновенной

№	Время удерживания	Органическая кислота	Содержание %
1	5,056	капроновая	0,01515
2	8,959	щавелевая	0,01803
3	11,394	малоновая	0,02169
4	12,301	фумаровая	0,0228
5	12,689	левулиновая	2,43041
6	13,812	янтарная	0,25163
7	14,076	бензойная	0,25719
8	16,806	фенилуксусная	0,00561
9	17,154	салициловая	0,01271
10	17,634	лауриновая	0,01265
11	20,096	2-окси-3-метилглютаровая	0,01204
12	21,496	яблочная	0,35613
13	21,738	миристиновая	0,02032
14	24,099	пентадекановая	0,00798
15	24,764	азелаиновая	0,01323
16	25,433	пальмитиновая	0,12157
17	25,776	пальмитолеиновая	0,02577
18	26,41	гептадекановая	0,00506
19	28,736	лимонная	2,8288
20	30,061	стеариновая	0,00252
21	30,183	олеиновая	0,00896
22	30,294	линолевая	0,06369
23	31,034	изо-лимонная	0,17203
24	31,58	линоленовая	0,00926
25	31,664	ванилиновая	0,01107
26	32,043	2-оксипальмитиновая	0,01105
27	32,659	арахиновая	0,0137
28	34,236	хенейкозановая	0,00804
29	35,601	бегеновая	0,01058
30	36,935	р-оксибензойная	0,01202

31	37,173	трикозановая	0,00481
32	37,428	сиреневая	0,00557
33	37,803	гентизиновая	0,00515
34	38,494	тетракозановая	0,00659
35	39,815	феруловая	0,02836

Методом ГХ-МС было обнаружено и определенно количественное содержание 35 органических кислот. Общее содержание органических кислот составило 6,81 %

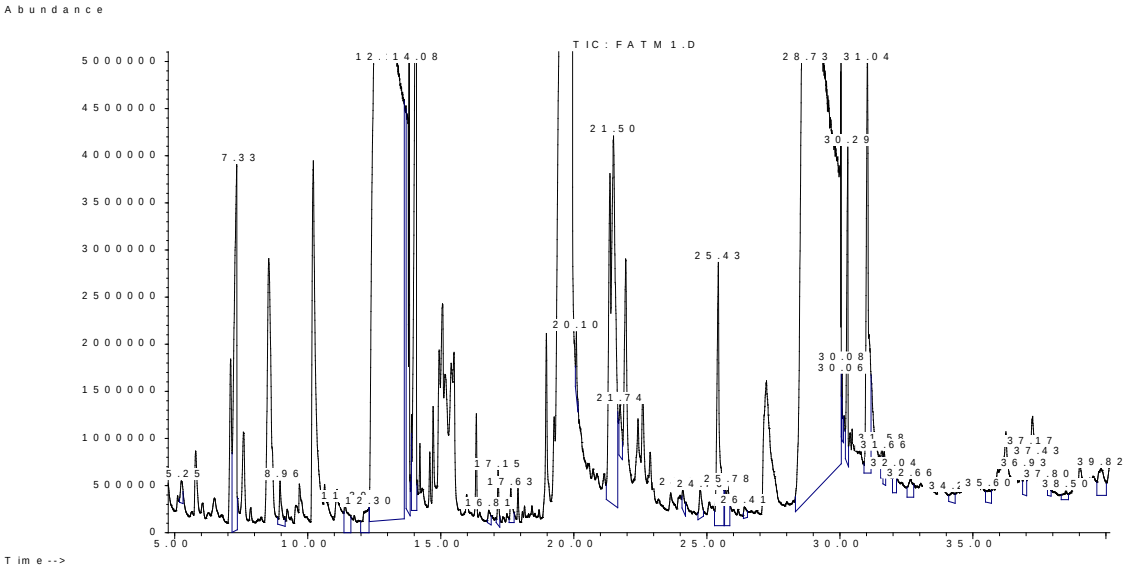

Рис.1 Хроматограмма органических кислот спиртового экстракта жмыха малины обыкновенной

Выводы

Среди органических кислот было обнаружено 19 жирных кислот, количественное содержание которых составило 0,37 г/100г экстракта, что составляет 5,48 % от всех органических кислот. Доминирующей является пальмитиновая (0,12%) и линолевая (0,06%) кислоты. Так же заслуживают внимание ароматические кислоты: бензойная, фенилуксусная, салициловая, ванилиновая, *p*-оксибензойная, сиреневая, гентизиновая, феруловая кислоты. которые обладают значительным антибактериальным действием, а так же противовоспалительными, антигрегантными, противовирусными, кардиопротекторными свойствами. Суммарное содержание ароматических кислот в экстракте составило 0,34г/100г что составляет 4,96% от всех органических кислот. Доминирующей среди ароматических кислот является бензойная кислота содержания которой достигает 76 % от всех ароматических кислот.

Низкомолекулярные алифатические кислоты являются доминирующей группой органических кислот 6,10 г/100г что составляет 89,57 % от всех органических кислот. Их представителями являются 8 кислот среди которых: 5 двухосновных (щавелевая, малоновая, фумаровая, янтарная, яблочная), 2 трехосновных (лимонная и изо-лимонная) и одна кетокислота (левулиновая). Доминирующими являются лимонная и левулиновая кислоты.

Литература

1. Федотова В. В., Охремчук А. В., Челомбитько В. А. Изучение органических кислот золотарника кавказского и черноголовника многобрачного // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2012. №16 (135).

2. Логвинова Е.Е., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. Определение органических кислот в плодах аронии черноплодной // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2015. №10 (207).

3. Polischuk, I. The study of phenolic compounds and the antimicrobial action of the alcoholic extract from the cake of the red raspberry fruit / I. Polischuk, O. Koshovyi, T. Osolodchenko, M. Komissarenko // Vìsnik farmacìї. – 2018. – N 3(95). - P. 30-33.

4. Polischuk, I. The study of saponins of the raspberry cake alcoholic extract by HPLC / I. M. Polischuk, M. A. Komisarenko, M. Yu. Golik, T. V. Upyr // Vìsnik farmacìї. – 2018. – N 4 (95). - P. 24-27

5. Polischuk, Ivan, et al. "Study of Rubus Idaeus Juice Ellagitannins and Its Antimicrobial Activity." *International Journal of Pharmacy and Chemistry* 5.6 (2019): P.68-71.

6. Перспективи створення нового антимікробного засобу зі жмиху плодів малини звичайної / Поліщук І.М., Комісаренко М.А, Ковальова А.М., Голік М.Ю. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю (27-28 вересня 2018 р.). – Тернопіль: ТДМУ, 2018. – С. 34-35

7. Перспектива створення противугривого засобу на основі водного екстракту плодів малини / Поліщук І.М., Комісаренко М.А., Ільїна Т.В., Ковальова А.М. // Міжнародна науково-практична конференція «сучасні методи корекції вугрової хвороби та інших проблем шкіри у практиці косметолога» (19 жовтня 2018 року). С. 149-150