

УДК 615.074

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2024.56.24.004>

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЗМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ В БИОМАССЕ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ (LAVANDULA ANGUSTIFOLIA MILL)

М.О. Рудомётова, студентка 4-го курса ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
mariya.rudomyotova@spcspu.ru

А.Б. Зеленцова, старший преподаватель кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
anna.zelentsova@pharminnotech.com

Н.С. Пивоварова, канд. фарм. наук, доцент кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

Н.Ю. Сипкина, канд. фарм. наук, научный сотрудник центра контроля качества лекарственных средств ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
nadya.sipkina@pharminnotech.com

Т.С. Шебитченко, старший преподаватель кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
tatiana.shebitchenko@pharminnotech.com

Авторами статьи методом ВЭЖХ проведена количественная оценка содержания основного компонента полифенольного комплекса – розмариновой кислоты, в водно-спиртовом извлечении, полученном из биомассы лаванды узколистной. Исследования проведены на базе лаборатории культуры растительных клеток и ЦКП «Аналитический центр» Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета в 2023 году. Для оценки влияния таких факторов, как содержание балластных веществ в водно-спиртовом извлечении, а также наличия возможных гликозидных связей авторами проведен анализ не только

исходного извлечения, но и извлечения, для которого предварительно был проведен гидролиз фракции фенольных соединений. Авторы отмечают, что содержание розмариновой кислоты в образце, для которого не проводился гидролиз, составило 0,46%, а для образца, для которого проведен предварительный гидролиз, – 0,37%, что говорит о возможных потерях определяемого компонента в процессе очистки и гидролиза.

Ключевые слова: розмариновая кислота, количественное определение, лаванда узколистная, высокоэффективная жидкостная хроматография, гидролиз, полифенольный комплекс

В лаборатории культуры растительных клеток Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета в 2022 году начаты исследования каллусных культур лаванды узколистной. В настоящее время большую популярность набирает использование культуры клеток высших растений как источника биологически активных компонентов косметических средств. Лаванда узколистная, широко известная в косметологии и парфюмерии своими бактерицидными, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, привлекает внимание научного сообщества благодаря разнообразному составу биологически активных веществ: жирные кислоты, нуклеиновые и аминокислоты, витамины, ферменты, антиоксиданты, фитогормоны и другие. Содержание данных биологически активных веществ в составе косметических средств позволяет предполагать наличие таких эффектов, как предохранение кожи от истончения, обезвоживания, уменьшение глубины и количества морщин, защита клеток кожи от стресса, а также стимулирование синтеза коллагена и эластина. Более того, использование извлечений из биомассы клеток растений представляет интерес с точки зрения оптимизации технологического процесса. Основными преимуществами являются: доступность и стабильность получения сырья, так как нет зависимости от сезонов, климатических и географических условий, доступность сырья даже из самых редких растений, технологическая гарантия на экологическую чистоту продуктов и безопасность ингредиентов, минимальное количество пигментов и других сопутствующих веществ, затрудняющих анализ сырья.

Цель настоящего исследования – анализ количественного содержания розмариновой кислоты в биомассе лаванды узколистной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали биомассу лаванды узколистной, полученную *in vitro*. В качестве первичного экспланта использованы части листа интактного растения. Питательную среду готовили по прописи Мурасиге – Скуга (MS) с добавлением фитогормонов – альфа-нафтилуксусной кислоты (α -НУК), 2,4-дихлорфеноксиксусной кислоты (2,4-Д), 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетина. Культивирование осуществляли в бутылках объемом 250 мл (объем питательной среды в бутылке составлял 50 ± 5 мл), закрытых ватно-марлевой пробкой и бумагой, при температуре 25°C и влажности воздуха, равной 60–70%, для предотвращения испарения влаги из питательной среды и усыхания биомассы [1].

Культивирование проводили параллельно в темноте и на свету, с соблюдением фотопериода длительностью в 16 часов. Освещенность в световой комнате была равна 10 000 Лк [2].

Для анализа использовали водно-спиртовое извлечение, полученное из биомассы методом перколяции 70% спиртом этиловым, соотношение «сырье : экстрагент» – 1:12.

Для качественной и количественной оценки полифенольного комплекса использовали систему ВЭЖХ Flexar (Perkin Elmer, США) с диодно-матричным детектором. Хроматографическое разделение выполняли на колонке Kromasil 100 C18 (150 мм \times 2,1 мм \times 3,5 мкм), температура колонки составляла 35°C . Элюирование осуществлялось в градиентном режиме. Подвижная фаза, состоящая из 0,1% трифторуксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 50:50 об. %, подавалась со скоростью 0,2 мл/мин. Объем пробы составлял 20 мкл. Детектирование выполняли в диапазоне длин волн 200–400 нм. Время анализа – 120 минут [3].

В качестве растворителя проб использовали подвижную фазу.

Стандартный раствор розмариновой кислоты с концентрацией 0,0106 мг/мл готовили путем растворения точной навески стандартного образца розмариновой кислоты («ЧДА», регистрационный номер CAS 20 283-92-5, массовая доля – 98%, Sigma-Aldrich) в растворителе. Раствор использовали свежеприготовленным.

Методика определения. Для определения розмариновой кислоты использовали водно-спиртовое извлечение из сухого образца биомассы лаванды узколистной, полученное методом перколяции. Масса навески сухой биомассы составляла около 7 г, влажность биомассы – 4,74%, в качестве экстрагента использован 70% спирт этиловый в соотношении «сырье: экстрагент» – 1:12.

Водно-спиртовое извлечение в объеме 60 мл перелили в колбу объемом 250 мл. Извлечение отфильтровали и упарили досуха на роторно-пленочном испарителе Heidolph (Германия). Сухой остаток растворили в 10 мл 96% спирта этилового и отфильтровали.

Так как розмариновая кислота может находиться в виде гликозидов, в дополнительной пробе извлечения был проведен предварительный гидролиз фракции фенольных соединений с целью разрушения гликозидных связей и перевод розмариновой кислоты в свободную форму. Для этого к 34 мл водно-спиртового извлечения, полученного ранее методом перколяции, добавили 50 мл кислоты хлористоводородной разведенной. Смесь гидролизвали путем рефлюкса при 80°C в течение 2 часов [4].

После гидролиза колбу со смесью охладили и провели трехкратную экстракцию этилацетатом, который добавляли порциями по 45 мл. Полученный органический слой промыли водой до нейтрального значения pH и добавили осушающий агент (безводный сульфат натрия). Извлечение отфильтровали и упарили досуха на роторно-пленочном испарителе Heidolph (Германия). Сухой остаток растворили в 10 мл 96% спирта этилового и отфильтровали.

Для анализа методом ВЭЖХ обе аликвоты исследуемых образцов разводили подвижной фазой 1:20.

Содержание розмариновой кислоты в процентах (X) вычисляли методом внешнего стандарта по формуле:

для образца без гидролиза

$$X = \frac{C_{\text{ст}} \cdot S \cdot 10 \cdot 60 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{S_{\text{ст}} \cdot 0,5 \cdot 1000 \cdot m_{\text{н}} \cdot (100 - w)} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot S \cdot 12\,000 \cdot P}{S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{н}} \cdot (100 - w)}$$

для образца с предварительным гидролизом

$$X = \frac{C_{\text{ст}} \cdot S \cdot 10 \cdot 60 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{S_{\text{ст}} \cdot 0,5 \cdot 1000 \cdot 34 \cdot m_{\text{н}} \cdot (100 - w)} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot S \cdot 60\,000 \cdot P}{S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{н}} \cdot 17 \cdot (100 - w)}$$

где S – площадь пика на хроматограмме исследуемого раствора, е.о.п; C_{ст} – концентрация розмариновой кислоты в СО розмариновой кислоты, мг/мл; S_{ст} – площадь пика розмариновой кислоты на хроматограмме раствора СО розмариновой кислоты, е.о.п; m_н – навеска биомассы лаванды узколистной, г; P – степень чистоты; w – влажность биомассы, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По литературным данным, розмариновая кислота, являющаяся основным компонентом полифенольного комплекса водно-спиртового извлечения, полученного из биомассы лаванды узколистной, обладает выраженным противовоспалительным, антимутагенным и успокаивающим действием [5].

Розмариновая кислота – один из эффективных натуральных антиоксидантов и может защищать от образования свободных радикалов,

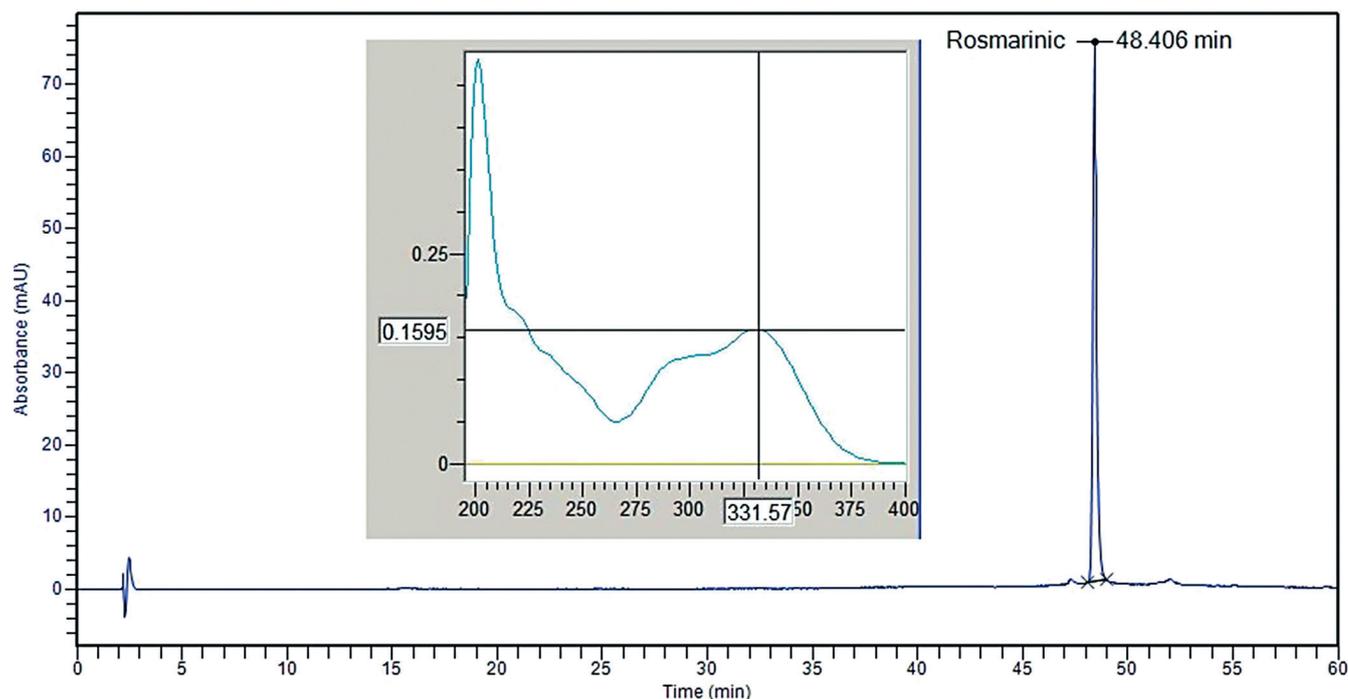


РИС. 1. Хроматограмма стандартного раствора розмариновой кислоты:
Absorbance – оптическая плотность (аналитический сигнал); *Time* – время анализа;
Rosmarinic – розмариновая кислота; *mAU* – единицы оптической плотности; *min* – минуты;
 48.406 *min* – время удерживания розмариновой кислоты; 331.57 – длина волны в нм, при которой
 наблюдается максимум пика УФ-спектра розмариновой кислоты

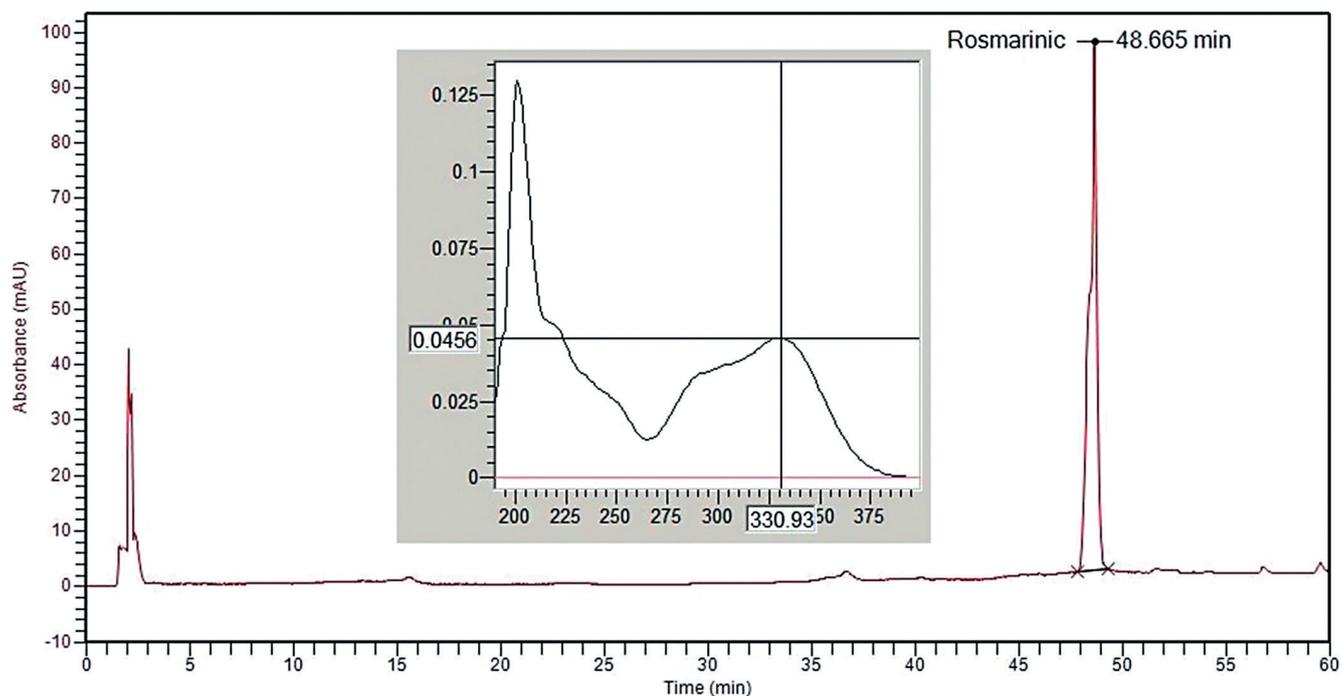


РИС. 2. Хроматограмма извлечения биомассы *Lavandula angustifolia* без гидролиза:
Absorbance – оптическая плотность (аналитический сигнал); *Time* – время анализа;
Rosmarinic – розмариновая кислота; *mAU* – единицы оптической плотности; *min* – минуты;
 48.665 *min* – время удерживания розмариновой кислоты; 330.93 – длина волны в нм, при которой
 наблюдается максимум пика УФ-спектра розмариновой кислоты

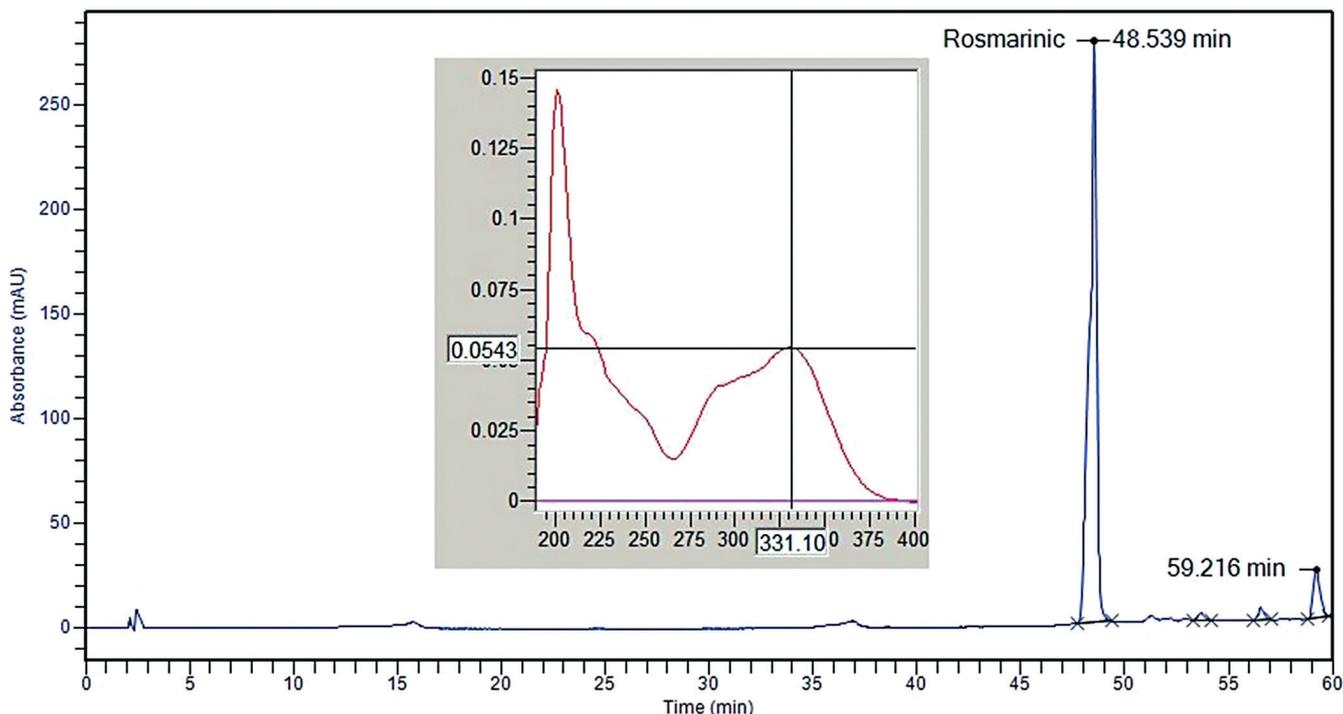


РИС. 3. Хроматограмма органического слоя извлечения биомассы *Lavandula angustifolia* после гидролиза: Absorbance – оптическая плотность (аналитический сигнал); Time – время анализа; Rosmarinic – розмариновая кислота; mAU – единицы оптической плотности; min – минуты; 48.539 min – время удерживания розмариновой кислоты; 331.10 – длина волны в нм, при которой наблюдается максимум пика УФ-спектра розмариновой кислоты

что делает ее довольно часто применяемой в косметическом производстве [6].

Вследствие этого нами были выполнены исследования по количественному определению розмариновой кислоты в биомассе лаванды узколистной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В процессе проводимых экспериментов нами были изучены и подобраны условия пробоподготовки, оценена необходимость предварительного гидролиза извлечения. Подлинность розмариновой кислоты доказана путем сравнения времени удерживания розмариновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора ($48,5 \pm 0,2$ мин.) и исследуемого раствора, а также путем сравнения УФ-спектров пика розмариновой кислоты в диапазоне длин волн 200–400 нм на хроматограммах стандартного и исследуемого растворов. В ходе эксперимента обнаружено, что наибольшее содержание розмариновой

кислоты достигается в образце без предварительного гидролиза, что подтверждает гипотезу о его нецелесообразности. В силу особенностей биологического синтеза розмариновой кислоты находится в сырье преимущественно в свободном виде, без образования гликозидов. Снижение содержания розмариновой кислоты после гидролиза фракции фенольных соединений, предположительно, происходит из-за потерь определяемого вещества в результате дополнительных трудоемких этапов пробоподготовки (дополнительное кипячение, жидкость-жидкостная экстракция, осушение).

В ходе исследования также доказано, что розмариновая кислота является основным компонентом полифенольного комплекса биомассы, так как на хроматограммах исследуемых растворов практически полностью отсутствовали пики с временами удерживания других фенольных соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОЗМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОБРАЗЦАХ

Таблица

Масса навески, г	Содержание розмариновой кислоты	
	Методика без гидролиза	Методика с гидролизом
6,83	0,46	0,36
6,85	0,46	0,37
6,81	0,45	0,36
Среднее значение, %	0,46	0,37
Стандартное отклонение	0,006	0,006
RSD, %	1,26	1,58

ВЫВОДЫ

1. Определено количественное содержание розмариновой кислоты в биомассе лаванды узколистной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием. Полученные результаты будут использованы при разработке состава и технологии получения косметических средств на основе биомассы лаванды узколистной.

2. Изучено влияние предварительного гидролиза на содержание розмариновой кислоты в извлечении. Определено содержание

розмариновой кислоты в образцах с предварительным гидролизом и без него, которое составило 0,37% и 0,46% соответственно.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
2. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Шанчиц М.П., Ромашко С.Н., Булатова А.А., Логвина А.О. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза // *Труды Белорусского государственного университета.* – 2009. – №2. – С. 168.
3. Sipkina N.Yu., Skorik Yu.A. Detection and Determination of Some Phenolic and Cinnamic Acids in Plant Extracts // *Journal of Analytical Chemistry.* 2015. V. 70. P. 1406–1411.
4. Nuutila A.M., Kammiovirta K., Oksman-Caldentey K.M. Comparison of methods for hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC // *Food Chemistry.* 2002. V. 76. P. 519–525.
5. Al-Sereiti M.R., Abu Amer K.M. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials // *Indian J. Exper. Biol.* 1999. P. 124–130.
6. Malencic D.J., Gasic O., Popovic M., Boza P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem // *Phytother. Res.* 2000. V. 14. P. 546–548.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ROSMARINIC ACID IN LAVANDULA ANGUSTIFOLIA MILL BIOMASS

M.O. Rudomyotova, A.B. Zelentsova, N.S. Pivovarova, N.Yu. Sipkina, T.S. Shebitchenko
Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

The authors of the article quantified the content of the main component of the polyphenolic complex – rosmarinic acid, in aqueous-alcoholic extract obtained from the biomass of Lavandula angustifolia by HPLC. The research was carried out on the basis of the laboratory of plant cell culture and CKP «Analytical Centre» St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University in 2023. To assess the influence of such factors as the content of ballast substances in the water-alcoholic extract, as well as the presence of possible glycosidic bonds, the authors analysed not only the original extract, but also the extract previously subjected to acid hydrolysis. The authors note that the content of rosmarinic acid in the sample for which no hydrolysis was carried out was 0.46%, for the sample for which preliminary hydrolysis was carried out – 0.37%, which indicates possible losses of the determined component in the process of purification and hydrolysis.

Keywords: rosmarinic acid, quantification, Lavandula Angustifolia, high-performance liquid chromatography, hydrolysis, polyphenolic complex