УДК 615.01:615.324

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПРОПОЛИСА И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЕГО В КОМПЛЕКСЕ С ПРОИЗВОДНЫМИ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Симонян Е.В.

ГБОУ ВПО «Южно – Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru

Методами ГХ с масс – селективным детектированием и ВЭЖХ изучен химический состав прополиса и экстракта, приготовленного на его основе. Идентифицированы рутин, апигенин, кверцетин, кемпферол, диметилкемпферол, кофейная кислота, феруловая кислота, коричная кислота. А также обнаружены другие полифенольные соединения, органические кислоты и некоторые неидентифицированные вещества. Рассчитаны некоторые хроматографические параметры, характеризующие эффективность разделения. Полученные данные подтверждены методом тонкослойной хроматографии. Теоретически рассчитаны некоторые виды фармакологической активности комплексов кислоты янтарной, фумаровой, никотиновой и глутаминовой с некоторыми фенольными соединениями. Математически доказано потенцирование антиокислительной активности исследуемых лекарственных средств в сочетании с экстрактом прополиса. Доказано экспериментально наличие антимикробного действия карбоновых кислот и их комплексов с экстрактом прополиса в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры.

Ключевые слова: кислота янтарная, кислота фумаровая, кислота никотиновая, кислота глутаминовая, прополис, флавоноиды

THE STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF PROPOLIS AND THE THEORETICAL JUSTIFICATION FOR APPLYING IT IN COMPLEX WITH DERIVATIVES OF CARBOXYLIC ACIDS

Simonyan E.V.

South Ural state medical University of the Ministry of health of the Russian Federation, Chelyabinsk, e-mail: kanc@chelsma.ru

GC with mass – selective detection and HPLC studied the chemical composition of propolis extract and prepared on its basis. Identified rutin, apigenin, quercetin, kaempferol, dimetilkempferol, caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid. And also found other polyphenolic compounds, organic acids and some unidentified material. Designed some chromatographic parameters characterizing the separation efficiency. The data obtained confirmed by thin layer chromatography. Theoretically calculated some types of pharmacological activity of succinic acid complexes, fumaric, nicotinic, and glutamic some phenolic compounds. Mathematically proven antioxidant activity potentiation study drugs in combination with an extract of propolis. Proved experimentally the existence of an anti-microbial action of carboxylic acids and their complexes with an extract of propolis against gram-positive and gram-negative microorganisms.

Keywords: succinic acid, fumaric acid, nicotinic acid, glutamic acid, propolis, flavonoids

Одной из актуальных задач современной медицины является создание новых лекарственных средств, обладающих комплексным действием, минимальными побочными эффектами и практическим отсутствием противопоказаний. Это направление перспективно в ряду лекарственных средств, представляющих соединения эндогенной природы. В качестве объектов исследования нами были выбраны кислоты янтарная, фумаровая, никотиновая и глутаминовая, для усиления фармакологических эффектов которых предложено использовать экстракт прополиса, содержащий комплекс биологически – активных веществ, способных потенцировать фармакологическое действие.

Материалы и методы исследования

Первым этапом нашего исследования было изучение состава фенольных соединений прополиса [2]. Для этого мы использовали газовую хроматографию с масс – селективным детектированием. В качестве объекта исследования использовали метанольный экстракт прополиса. Определение проводили на приборе SATURN 2100 Varian. Температура нагрева газа составляла 300°С. В режиме регистрации ионов через источник пропускали гелий, а в режиме ожидания использовали азот. Масс-спектры представляли в виде полного списка относительных интенсивностей ионов в масс-спектрах с шагом 0.05 m/z и использовали для последующей обработки.

Хроматографирование методом ВЭЖХ спиртового экстракта прополиса, приготовленного методом мацерации с использованием спирта этилового 70%, осуществляли на жидкостном хроматографе «Стайер» в обращено – фазовом режиме, используя в качестве длины волны детектирования 290 и 326 нм. В качестве подвижной фазы использовали различные варианты смеси изопропанола и воды. Использовать ацетонитрил в данном случае невозможно, так как при взаимодействии с экстрактом прополиса выпадал осадок. Скорость подачи элюента варьировала от 50

до 100 мкл в минуту. Установлено, что лучшее разделение компонентов смеси наблюдалась при использовании в качестве элюента изопропанола с водой (90:10), подкисленной кислотой уксусной в концентрации 1%, при скорости подачи 100 мкл/минуту.

Для создания новых комбинированных лекарственных средств с препаратами, содержащими карбоксильную группу, из разных фармакологических групп целесообразно было теоретически спрогнозировать некоторые фармакологические свойства. В связи с этим было проведено компьютерное моделирование структуры полифенолов изучаемых лекарственных средств, а также их комплексов. Моделирование комплексов осуществляли при помощи программного пакета Mech [3], который использует генетические алгоритмы формирования молекулярных ассоциатов в полимолекулярных системах. Расчет вели в пересчете на рутин, апигенин, кемпферол, пиноцембрин и пиностробин, которые с достоверностью были обнаружены в результате хроматографического определения.

Для решения задачи ориентации имеется ряд подходов. В основе большинства из них – предположение о геометрическом соответствии фармакофорной части молекулы сайту рецептора. Для «укладки» в полости рецептора, как и во многих традиционных подходах, используется пространство-заполняющая модель. Ориентацию молекулы определяет весь комплекс Ван-дер-Ваальсовых, кулоновских и специфических взаимодействий с рецептором и сольватным окружением. В совокупности эти виды взаимодействий определяют молекулярное поле, которое обеспечивает комплементарность биологически активных соединений к рецептору. Следует иметь в виду, что молекула с данным видом активности содержит фрагменты, определяющие связывание с активными центрами рецептора. Эту часть молекулы можно назвать фармакофорной. Эффективность ее связывания с рецептором определяет величину активности.

Результаты исследования и их обсуждение

На основании проведенных исследований установили наличие в экстракте прополиса ряда фенольных соединений: рутин, апигенин, кверцетин, кемпферол, диметилкемпферол, кофейная кислота, феруловая кислота, коричная кислота, а также некоторые неидентифицированные вещества, 5 – гидрокси, 4, 7 – диметоксифлаванон и нафтален. Были рассчитаны некоторые хроматографические параметры (табл. 1).

Кроме того, проведена идентификация флавоноидов методом ТСХ восходящим методом. Установлено, что в системе БУВ (4:1:5) на хроматограмме экстракта прополиса после просматривания в УФ – свете и обработки хроматограммы 5% раствором алюминия хлорида наблюдалось появление пятен с величинами Rf равными 0,44, 0,67 и 0,91. Первое пятно по величине Rf и совокупности окраски совпадало с пятном РСО рутина, а пятно с Rf = 0,91 – с РСО кверцетина. Одно пятно осталось неидентифицированным. В системе растворителей БУВ (4:3:3) наблюдается появление не менее 4 пятен с величиной Rf 0,14, 0,42, 0,69 и 0,91. Было установлено, что пятна величиной Rf 0,42, 0,69 и 0,91 соответствовали Rf СО пятен рутина, гиперозида и кверцетина, соответственно. Аналогичные данные получены при хроматографировании в системе хлороформ – спирт этиловый 95%– вода (26:14:3). На хроматограмме наблюдалось появление трех пятен с величиной Rf, соответственно, 0,15 (неидентифицированный компонент), 0,4 (рутин) и 0,63 (кверцетин). В системе хлороформ – спирт этиловый 95% после проявления щелочным раствором диазобензолсульфокислоты наблюдалось появление двух пятен, одно из которых с величиной Rf = 0,81 соответствовало пятну СО пиностробина, а второе (Rf = 0,89) предположительно было идентифицировано как пиноцембрин. Различные виды фармакологической активности определяли, используя программный пакет: 3D⁄4D QSAR алгоритм BiS/MC (multi-conformational) для мультиконформационного анализа биологически активных соединений, их ориентации и докинга в полостях рецептора. Абсолютная активность была принята за единицу. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Установлено, что кислота фумаровая, янтарная и никотиновая могут обладать выраженным бактерицидным или бактериостатическим действием в отошении St. aureus. Кроме того, двухосновные карбоовые кислоты активны в отношении E. coli. При этом теоретически рассчитанная активность рутин также доказывает его антимикробное действие. Для кислоты никотиновой практически отсутствует активность в отношении кишечной палочки, а кислота глутаминовая обладает низкой активностью в отношении обоих микроорганизмов. Сочетание рутина с карбоновыми кислотами несколько снижает их эффективность. Однако при моделировании противотуберкулезной активности установлено, что в комплексах рутин – кислота никотиовая, рутин – кислота янтарная, рутин – кислота фумаровая происходит потенцирование фармакологических свойств. Все кислоты кроме глутаминовой проявляют противовоспалительную активность. При этом рутин практически инертен в модели внутреннего воспаления и подавляет активность кислоты янтарной в комплексе. Но в модели внешнего воспаления наблюдается повышение активности всех карбоновых кислот в присутствии рутина. Аналогично были проведены расчеты для комплексов с апигенином, кемпферолом, пиноцембрином и пиностробином. Результаты представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 1

Хроматографические параметры разделения прополиса

Определяемый компонент	Время удерживания, мин. t_R	Коэффициент емкости, k/	Эффективность, N	Фактор асимметрии, As
Феруловая кислота	3,5	0,75	16000	1,11
Апигенин	5,7	1,85	20794	1,24
Кемпферол	7,4	2,7	17978	1,30
Рутин	8,9	3,45	25806	1,33
Пиноцембрин	11,0	4,5	30250	1,33
Пиностробин	15,4	6,7	26214	1,38

Таблица 2

Прогнозирование антимикробной и противовоспалительной активности карбоновых кислот и комплексов рутин – карбоновая кислота

Объект исследования	Активность в отношении		Противотуберкулезная активность	Модель внутреннего воспаления	Модель внешнего воспаления
	St. aureus	E. coli			
Рутин	0,878	0,960	0,320	0,0846	0,229
Кислота янтарная	0,343	0,684	0,247	0,617	0,200
Кислота фумаровая	0,341	0,347	0,351	0,144	0,146
Кислота никотиновая	0,763	0,001	0,383	0,231	0,236
Кислота глутаминовая	0,087	0,005	0,087	0	0,012
Рутин +к-та янтарная	0,205	0,199	0,875	0,017	0,848
Рутин + к-та фумаровая	0,201	0,205	0,632	0,614	0,819
Рутин + к-та никотиновая	0,156	0,056	0,943	0,343	0,457
Рутин + к-та глутаминовая	0,121	0,078	0,227	0	0,249

Таблица 3

Прогнозирование антимикробной и противовоспалительной активности карбоновых кислот и их комплексов с апигенином и кемпферолом

Объект исследования	Активность в отношении		Противотуберкулезная активность	Модель внутреннего воспаления	Модель внешнего воспаления
	St. aureus	E. coli			
Апигенин	0,327	0,314	0,260	0,007	0,065
Апигенин +к-та янтарная	0,329	0,276	0,234	0,017	0,061
Апигенин + к-та фумаровая	0,314	0,273	0,219	0	0
Апигенин+ к-та никотиновая	0,267	0,275	0,341	0,045	0,112
Апигенин + к-та глутаминовая	0,265	0,241	0,268	0,035	0,007
Кемпферол	0,401	0,342	0,087	0,075	0,069
Кемпферол +к-та янтарная	0,412	0,360	0,067	0,099	0,087
Кемпферол +к-та фумаровая	0,477	0,401	0,092	0,088	0,056
Кемпферол +к-та никотиновая	0,397	0,356	0,113	0,118	0,098
Кемпферол +к-та глутаминовая	0,379	0,406	0,097	0,114	0,088

Установлено, что карбоновые кислоты практически не оказывают влияние на фармакологическую активность апигенина и кемпферола.

Таким образом установлено, что антимикробная активность комплексов может быть обусловлена именно присутствием пиноцембрина и пиностробина в прополисе. При этом усиливается противовоспалительное действие. Для подтверждения антимикробного действия кислот янтарной, фумаровой никотиновой и глутаминовой и их композитов с экстрактом прополиса нами был проведен эксперимент *in vitro* в отношении штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus штамм 209, Escherichia coli штамм М-17, Pseudomonas aeruginosa штамм 4/1 и Candida albicans штамм 18/1*. Исследования проводили в трех повторах [3]. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 4

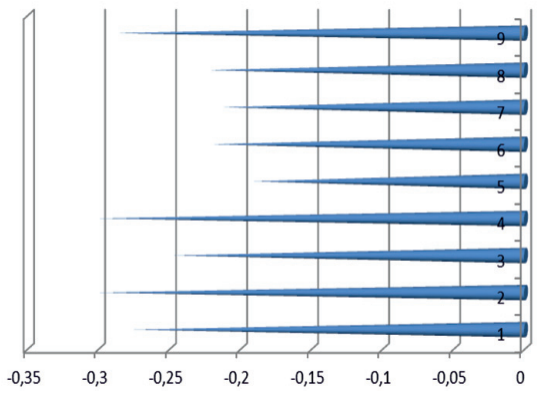
Прогнозирование антимикробной и противовоспалительной активности карбоновых кислот и их комплексов с пиоцембрином и пиностробином

Объект исследования	Активность в отношении		Противотуберку-лезная активность	Модель внутреннего воспаления	Модель внешнего воспаления
	St. aureus	E. coli			
пиноцембрин	0,435	0,265	0,087	0,134	0,145
пиноцембрин +к-та янтарная	0,679	0,554	0,116	0,145	0,348
пиноцембрин + к-та фумаровая	0,587	0,601	0,099	0,123	0,366
пиноцембрин к-та никотиновая	0,508	0,587	0,101	0,099	0,086
пиноцембрин + к-та глутаминовая	0,499	0,501	0,078	0,101	0,108
Пиностробин	0,399	0,351	0,128	0,207	0,300
Пиностробин +к-та янтарная	0,614	0,588	0,132	0,099	0,345
Пиностробин +к-та фумаровая	0,577	0,534	0,127	0,077	0,417
Пиностробин +к-та никотиновая	0,558	0,499	0,171	0,099	0,422
Пиностробин +к-та глутаминовая	0,502	0,488	0,095	0,068	0,213

Таблица 5

Антимикробное действие карбоновых кислот в сочетании с экстрактом прополиса

Определяемые вещества	Концентрация, г/мл	Микроорганизмы			
		E. coli	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans
Кислота янтарная	0,05	-	-	-	-
	0,005	+	+	+	+
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Кислота фумаровая	0,05	-	+	+	-
	0,005	+	+	+	+
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Кислота никотиновая	0,05	-	-	-	-
	0,005	-	-	+	+
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Кислота глутаминовая	0,05	-	-	-	-
	0,005	-	+	+	-
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Экстракт прополиса	0,01	-	-	-	-
	0,001	-	-	+	-
	0,0001	+	-	+	-
	0,00001	+	-	+	+
Смесь кислоты янтарной и экстракта прополиса	0,05	-	-	-	-
	0,005	+	+	-	-
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Смесь кислоты фумаровой и экстракта прополиса	0,05	-	-	-	-
	0,005	+	-	+	+
	0,0005	+	+	+	+
Смесь кислоты никотиновой и экстракта прополиса	0,05	-	-	-	-
	0,005	-	-	+	-
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Смесь кислоты глутаминовой и экстрак-та прополиса	0,05	-	-	-	-
	0,005	-	-	-	-
	0,0005	+	+	+	+
	0,00005	+	+	+	+
Контроль культуры микроорганизмов		+	+	+	+
Примечания: «-» – отсутствие микроорганизмов; «+» – наличие микроорганизмов					



Значение энергии ВЗМО. 1 – кислота янтарная, 2 – кислота фумаровая, 3 – кислота никотиновая, 4 – кислота глутаминовая, 5 – рутин, 6 – кислота янтарная + рутин, 7 – кислота фумаровая + рутин, 8 – кислота никотиновая + рутин, 9 – кислота глутаминовая + рутин

Было установлено, что кислота янтарная в концентрации 0,05 г/мл оказывает неселективное антимикробное действие в отношении грам – положительных, грам – отрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов, что согласуется с предварительно проведенным прогнозом. Скорее всего, это связано с тем, что в недиссоциированном виде органические кислоты являются липофильными и могут легко проникать через мембрану бактериальной клетки в цитоплазму. Оказавшись внутри клетки, где pH имеет приблизительно нейтральное значение, эти кислоты диссоциируют, высвобождая протоны. Бактерицидное действие органических кислот может также возникнуть в результате скопления анионов внутри клетки. Снижение pH внутри клетки приводит к тому, что микробная клетка использует свою энергию для выведения протонов наружу, что приводит к истощению клетки. Фумаровая кислота проявляет свою антимикробную активность только в отношении *E. coli и C. albicans.,* поскольку величина показателя константы ионизации кислоты фумаровой значительно ниже, чем у янтарной. Кислота никотиновая и глутаминовая в концентрации 0,005 г/мл оказывает неселективное антимикробное действие в отношении *E. coli* и *St. aureus* и . *E. coli* и *C. albicans*, соответственно. При оценке антибактериальных свойств прополиса было установлено, что он обладает губительным воздействием на грам – положительные и грам – отрицательные микроорганизмы и дрожжеподобные грибы в минимальных разведениях. Было отмечено, что *P. aeruginosa* менее чувствительна к прополису. Для прогнозирования антиоксидантной активности карбоновых кислот и их комплексов с некоторыми флавоноидами использовали программный пакет «GAMESS», с помощью которого были рассчитаны энергии верхней занятой молекулярной орбитали (ВЗМО). Чем больше энергия ВЗМО, тем сильнее выражены восстановительные свойства соединения. Окислительные свойства, характеризуют способность соединения отдавать электрон, и тем самым обеспечивать восстановление свободно-радикального соединения или дезактивацию активной формы кислорода. Теоретически было рассчитано значение энергии ВЗМО для исследуемых кислот, а так же рутина и комплексов. Результаты представлены на диаграмме.

Установлено, что наибольшей величиной АОА обладает рутин [4]. Кислота янтарная и фумаровая также обладают некоторой активностью в отношении свободных радикалов, а кислота никотиновая и глутаминовая – лишь незначительной величиной. Однако в присутствии рутина их активность может возрастать.

Выводы

1. Хроматографически обнаружены и идентифицированы различные фенольные соединения в прополисе и экстракте на его основе.
2. Теоретически спрогнозированы некоторые виды антимикробной и противовоспалительной активности, антиоксидантный эффект.
3. Доказано наличие бактерицидного эффекта в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры.

Список литературы

1. Изучение антимикробной активности некоторых двухосновных карбоновых кислот в сочетании с прополисом/Ю.С. Шишкова, Е.В. Симонян, О.С. Абрамовских, Ю.В. Шикова и др. //Медицинский альманах. – 2014, № 1 (31). – С. 99 – 101

2. Карцова Л.А., Алексеева А.В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений //Журн. аналит. химии.2008.Т.63, № 11.С.1126–1136.

3. Потемкин В.А., Гришина М.А., Барташевич Е.В. Комбинированная вычислительная 3D – QSAR технология BiS // Информационно – вычислительные технологии в решении фундаментальных и прикладных задач (Сессия ИВТН – 2004): Сборник материалов. М., 2004. С. 24.

4. Шикова Ю.В. Изучение антиокислительной активности дибунола и экстракта прополиса в опытах in vitro / Ю.В. Шикова, Ю.Л. Баймурзина, Т.В. Кайбышев // Материалы 69-й республиканской итоговой научно-практической конференции молодых ученых и студентов РБ с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» / БГМУ. – Уфа. – 2004. – С. 224-225.