

УДК 638.17:543.544



ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ФЛАВОНОВ И ФЛАВОНОЛОВ В ПРОПОЛИСЕ

*Е.В. Лупина, Д.И. Писарев, О.О. Новиков, А.Ю. Малютина,
Г.В. Васильев, Ю.Г. Васильева*

ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России,
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Настоящая статья посвящена сравнительной оценке состава флавонов и флавонолов в различных образцах прополиса для установления возможности его адекватной стандартизации. **Материалы и методы.** В качестве объектов исследования взяты 6 опытных образцов прополиса из разных регионов России. Из опытных образцов готовили извлечения спиртом этиловым 80%-ным по традиционной схеме изготовления настоек в соотношении 1:10. Полученные извлечения фильтровали и использовали для непосредственного анализа. Хроматографическое разделение спиртовых извлечений прополиса проводили на жидкостном хроматографе фирмы «Agilent Technologies 1200 Infinity», США. Детекцию проводили с помощью диодно-матричного детектора Agilent 1200. **Результаты и обсуждение.** Используя обращенно-фазную высокоэффективную жидкостную хроматографию в градиентном режиме элюирования, удалось идентифицировать флавоны и флавонолы. Выявлено, что состав прополиса имеет стабильный состав флавонов и флавонолов, включающий такие компоненты как кверцетин, изорамнетин, 3,4'-диметоксикемпферол, рамнетин, пендулетин, кемпферол, рамноцитрин, галангин, кемпферид, хризин и метоксигалангин. Из найденных компонентов наибольшее содержание приходится на флавонолы, метоксильные производные кемпферола – рамноцитрин (22,0%) и кемпферид (12,0%), из флавонов – хризин (16,0%). Методом внутренней нормализации рассчитан удельный вес каждого из компонентов внутри указанной группы. Установлено, что около 84% всех флавонолов приходится на кемпферол и его метоксильные производные. Состав флавонов и флавонолов может варьировать в зависимости от образца. При этом во всех изученных объектах присутствовал кемпферол, тогда как в отдельных пробах прополиса отсутствовали отдельные из идентифицированных компонентов. Предложена стандартизация прополиса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по содержанию флавоноидов в пересчёте на кемпферол, как стабильный, коммерчески наиболее доступный компонент прополиса. Используя абсолютную градуировку, определено количественное содержание кемпферола в опытных образцах прополиса, которое находилось в диапазоне 0,0141–0,0159%. **Заключение.** Результаты проведённых экспериментов позволяют рекомендовать проводить оценку качества прополиса по содержанию кемпферола в опытных образцах.

Ключевые слова: прополис, флавонолы, обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография, метод абсолютной градуировки

CHEMICAL STUDY OF FLAVONS AND FLAVONOLS COMPOSITION IN PROPOLIS

*E. V. Lupina, D. I. Pisarev, O. O. Novikov, A. Yu. Malyutina,
G. V. Vasilev, Yu. G. Vasileva*

Belgorod National State Research University of the Russian Federation, 85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015
E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

The aim of the study. This article is dedicated to the comparative assessment of flavones and flavonols composition in various samples of propolis for providing the possibility of its standardization. **Materials and methods.** To carry out

Для цитирования:

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. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-241-254 © Лупина Е.В., Писарев Д.И., Новиков О.О., Малютина А.Ю., Васильев Г.В., Васильева Ю.Г., 2018

For citation:

Lupina E. V., Pisarev D. I., Novikov O. O., Malyutina A. Yu., Vasilev G. V., Vasileva Yu. G. CHEMICAL STUDY OF FLAVONES AND FLAVONOLS COMPOSITION IN PROPOLIS. Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(3):241-254. (In Russ). DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-241-254

the research, 6 experimental samples of propolis were taken from different regions of Russia. Using those samples, we prepared the extracts with 80% ethanol according to traditional scheme of making tinctures in the ratio of 1:10. After that our extracts were filtered and used directly in the assessment. Chromatographic separation of spirit extracts of propolis was carried out on a liquid chromatograph of "Agilent Technologies 1200 Infinity", USA. The detection was carried out on the basis of the diode array detector "Agilent 1200". **Results and discussion.** Using the reversed-phase HPLC in gradient elution regime we managed to identify flavonols and flavones. It was found out that the composition of propolis has a stable composition of flavones and flavonols including quercetin, isoramnetin, 3,4'-dimethoxyempferol, ramnetin, penduletin, kaempferol, ramnocitrin, galangin, kaempferid, chrysin and methoxyhalangin. Among the identified components, the highest content is in flavonols, methoxyl derivatives ramnocitrin (22,0%), and kaempferid (12,0%); in flavones it is chrysin(16,0%). The specific gravity of each component within the specified group was calculated by the internal normalization method. It was established that about 84% of all flavonols are in kaempferol and its methoxyl derivatives. The composition of flavones and flavonols can vary depending on the sample. Hereby, kempferol was identified in all the studied samples, whereas some of the identified components were absent from separate propolis samples. Propolis standardization by method of high-performance liquid chromatography in respect of the content of flavonoids in terms of kaempferol as a stable, commercially most available component of propolis was suggested. With the use of absolute calibration, the quantitative content of kaempferol in propolis samples was determined in the range of 0.0141-0.0159%. **Conclusion.** The results of the carried out experiments made it possible to recommend the quality assessment of propolis according to the content of kaempferol in the experimental samples.

Keywords: propolis, flavonols, reversed-phase high-performance liquid chromatography, absolute calibration method

ВВЕДЕНИЕ. Прополис – клейкая смолистая субстанция, собираемая пчёлами с почек деревьев и модифицируемая ими своими ферментами [1]. Прополис может иметь разные цвета от тёмно-зеленого до жёлтого и красного; вкус горький жгучий, запах смолистый [2]. По физико-химическим свойствам прополис является уникальным природным продуктом, в состав которого входит более 800 веществ [3]. Прополис включает спектр ценных биологически активных компонентов, поэтому имеет разнообразную фармакологическую активность. В первую очередь, для прополиса характерны выраженные антибактериальные, противовоспалительные, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства [4].

В прополисе содержится ряд микроэлементов, азотистых соединений – амиды, амины, аминокислоты. В следовых количествах обнаруживаются витамины. Однако наибольшую фармакологическую ценность несут полифенолы, представленные флавоноидами, фенолокислотами, оксикоричными кислотами. Флавоноиды прополиса имеют разнообразную фармакологическую активность, а именно, оказывают желчегонное, мочегонное, капилляроукрепляющее и противовоспалительное действие [3, 5, 6, 7, 8, 9].

Среди флавоноидов прополиса можно выделить флавонолы, которые являются наиболее распространенными представителями флавоноидов в природе и обладают широким терапевтическим эффектом [10, 11]. В частности, кверцетин имеет противовоспалительное действие, понижает факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и позиционируется как агент, подавляющий процессы атерогенеза [12]. Изорамнетин защищает кардиомиоциты от активных форм кислорода, подавляя апоптоз, обладает антиканцерогенными свойствами, индуцируя апоптоз клеток миелоидной эритролейкемии [13]. 3,4'-диметокси-кемпферол, рамнетин, пендулетин проявляют противовоспалительную активность [14]. Галангин спосо-

бен подавлять факторы, определяющие устойчивость бактерий к антибиотикам [15]. Кемпферол запускает процесс апоптоза клеток рака яичников, имеет выраженные антиоксидантные свойства, что проявляется в подавлении оксидационного стресса [16, 17]. Предполагается, что кемпферол обладает противовоспалительным и антиаллергенным действием, препятствует развитию атеросклероза [18, 19, 20]. Он также обладает нейропротекторным действием, предотвращая развитие болезни Паркинсона [21]. Кемпферол предотвращает разрушение клеток поджелудочной железы от хронической гипергликемии [22]. В экспериментах *in vivo* кемпферол способен регулировать дифференциацию проадипоцитов, что проявляется в уменьшении разрастания жировой ткани [23].

Поскольку состав флавонолов прополиса в разных литературных источниках существенно варьирует, а также остаётся открытым вопрос по какой группе веществ стандартизовать данный объект, то **ЦЕЛЬЮ** настоящего исследования явилась объективная сравнительная оценка состава флавонов и флавонолов в различных образцах прополиса для установления возможности его адекватной стандартизации по указанным группам веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве объектов исследования взяты 6 опытных образцов прополиса из разных регионов России. Из опытных образцов готовили извлечения спиртом этиловым 80%-ным по традиционной схеме изготовления настоек в соотношении 1:10. Полученные извлечения фильтровали и использовали для непосредственного анализа.

Хроматографическое разделение спиртовых извлечений прополиса проводили на жидкостном хроматографе фирмы «Agilent Technologies 1200 Infinity», США. Детекцию проводили с помощью диодно-матричного детектора Agilent 1200.

Мобильные фазы готовили, используя воду сверхчистую (для жидкостной хроматографии) и

спирт этиловый (по ГОСТ Р 51652). В качестве кислотного модификатора применяли кислоту муравьиную (квалификация – х.ч.).

Число теоретических тарелок, характеризующее эффективность колонки [24] высчитывали по формуле 1:

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_r}{\mu_{0,5}} \right)^2 \quad (1)$$

где t – время удерживания анализируемого компонента, мм;

$\mu_{0,5}$ – ширина пика, мм на половине высоты.

В качестве оптимального критерия взят показатель не менее 5000.

Коэффициент разделения пиков R_s рассчитывали по формуле 2:

$$R_s = \frac{\Delta l}{\mu_{0,5(1)} + \mu_{0,5(2)}} \quad (2)$$

где Δl – расстояние между вершинами двух соседних пиков, мм;

$\mu_{0,5(1)}$; $\mu_{0,5(2)}$ – ширина на половине высоты пиков двух компонентов, мм.

Коэффициент разделения R_s должен быть не менее 1,5.

Коэффициент асимметрии пика (T_f) определяли по формуле 3:

$$T = \frac{\mu_{0,05}}{2 \times f} \quad (3)$$

где $\mu_{0,05}$ – ширина пика на высоте 5,0% от базовой линии, мм;

f – расстояние от начала пика на высоте 5,0% от базовой линии до перпендикуляра, проведенного из его вершины, мм.

Коэффициент асимметрии T_f должен составлять менее 2.

Мобильная фаза: 1,0%-ный водный раствор кислоты муравьиной (А) – спирт этиловый 95%-ный (Б); колонка стальная: *Ascentis express C₁₈* 2,7 μ m \times 100 мм \times 4,6 мм.

скорость мобильной фазы – 0,5 мл/мин;

температура термостата колонки +35 $^{\circ}$ C;

объем пробы аналита – 1 μ л.

Состав подвижной фазы программировали в условиях, указанных в таблице 1.

Таблица 1 – Условия элюирования компонентов прополиса

Время, мин	А, %	Б, %
0	90	10
40	10	90

Детекцию проводили при длинах волн: 268, 336 нм – для флавонов, 350, 360, 375 нм – для флавонолов.

Идентификацию компонентов осуществляли по времени удерживания, путём сравнения с соответствующими стандартными образцами и по итогам детектирования.

Относительное содержание отдельных компонентов в сумме определяли с помощью внутренней нормализации (формула 4):

$$Xi = \frac{Si \times 100}{\sum S} \quad (4)$$

где S_i – среднее значение площади пика аналита на хроматограммах суммы;

$\sum S$ – среднее значение суммы площадей пиков на хроматограммах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В ходе хроматографического разделения установлено, что в прополисе присутствует 12 компонентов флавоновой и флавоноловой природы. Хроматограмма разделения спиртового извлечения из прополиса, зарегистрированная при $\lambda=375$ нм диодно-матричного детектирования представлена на рисунке 1.

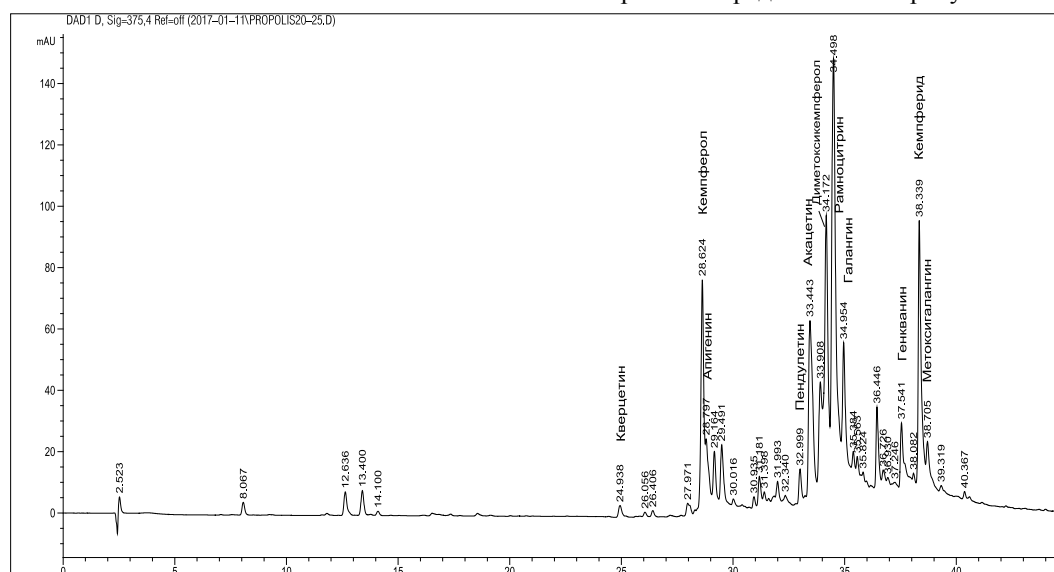


Рисунок 1 – Хроматограмма прополиса, зарегистрированная при $\lambda=375$ нм диодно-матричного детектирования

Как видно на приведённом рисунке 1, большинство компонентов, присутствующих на хроматограмме, разделяются по базовой линии, что свидетельствует о хорошей селективности использованных

хроматографических условий. Эффективность хроматографической системы подтверждали путём расчёта критериев пригодности, результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Критерии пригодности хроматографической системы для определения флавонов и флавонолов в прополисе

t_R	N	R_s	T_f	W_b
24,938	143430	44,4	0,63	0,155
28,624	338364	2,0	1,06	0,1158
28,809	382507	1,04	0,56	0,1096
32,998	498600	3,37	0,87	0,11
33,443	819389	1,3	2,35	0,0869
33,539	587092	1,46	0,63	0,1030
34,172	419638	1,13	0,84	0,1242
34,498	247171	1,33	0,76	0,1633
34,954	504452	1,92	0,65	0,1158
37,539	726899	1,78	0,9	0,1036
38,339	555196	1,52	0,54	0,121
38,705	830006	1,95	0,53	0,1

t_R – абсолютное время удерживания, N – число теоретических тарелок, R_s – коэффициент разделения пиков, T_f – коэффициент асимметрии, W_b – ширина пика на базовой линии

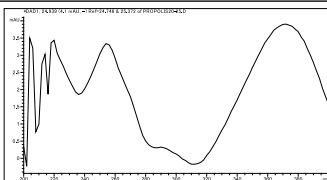
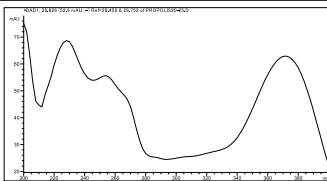
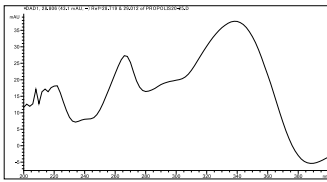
Представленные в таблице 2, результаты расчёта критериев пригодности ($N > 5000$, $R_s > 1,5$, $T_f < 2$), в общем, соответствуют реферируемым значениям. Следовательно, представленная хроматографическая система может быть признана эффективной для определения флавонов и флавонолов в прополисе.

Полученные в ходе хроматографирования пло-

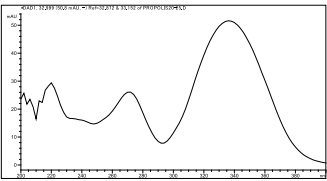
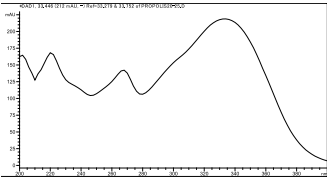
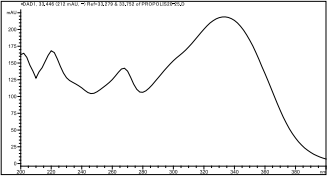
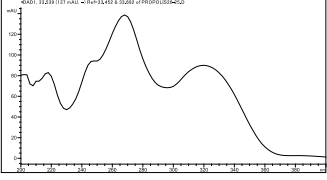
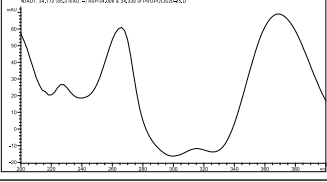
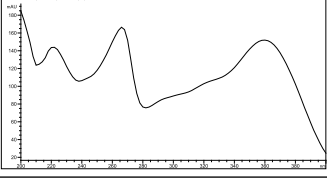
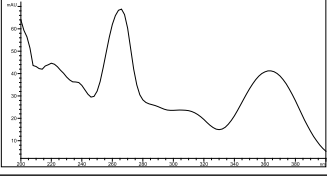
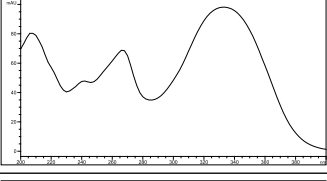
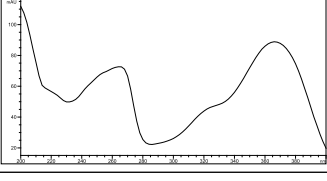
щади пиков флавонов и флавонолов, использовали для расчёта относительного содержания каждого из компонентов методом внутренней нормализации.

Результаты детектирования компонентов флавонов и флавонолов и их содержание в сумме приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Компонентный состав флавонов и флавонолов прополиса и их относительное содержание в сумме

tR	УФ-спектр компонента	Содержание компонента в сумме, %	Идентифицированный компонент
24,938		0,72	Кверцетин
28,624		7,72	Кемпферол
28,809		4,86	Апигенин

Продолжение таблицы 3

32,998		5,92	Пендулетин
33,443		7,7	Акацетин
33,539		15,9	Хризин*
34,172		8,9	Диметоксикемпферол
34,498		22,1	Рамноцитрин
34,954		4,57	Галангин
37,539		8,5	Генкванин
38,339		11,95	Кемпферид
38,705		1,06	Метоксигалангин

*на хроматограмме не указан

Процентное распределение флавонов и флавонолов внутри группы представлено на рисунке 2.

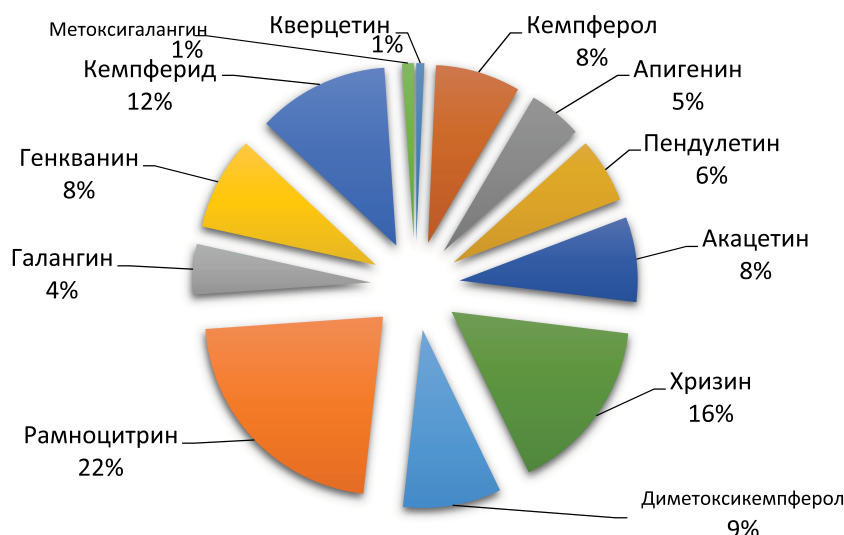


Рисунок 2 – Процентное распределение флавонолов в прополисе внутри группы

Данные, представленные в таблице 3 и на рисунке 2, показывают, что в прополисе из найденных компонентов наибольшее содержание приходится на флавонолы, метоксильные производные кемпферола – рамноцитрин (22,0%) и кемпферид (12,0%), из флавононов – хризин (16,0%).

Однако, состав флавононов и флавонолов может варьировать в зависимости от образца. При этом во всех изученных объектах присутствовал кемпферол, тогда как в отдельных пробах прополиса отсутствовали отдельные из идентифицированных компонентов. Поэтому нами предложена стандартизация прополиса по содержанию флавоноидов в

пересчёте на кемпферол, как постоянный компонент прополиса и коммерчески наиболее доступный.

Для количественного определения флавонолов в прополисе в пересчёте на кемпферол использован метод абсолютной градуировки. Для этого заранее была построена калибровочная кривая, приготовленная из градуировочного раствора стандартного образца кемпферола. Диапазон концентраций калибровочных растворов составил 0,004–0,2%.

Калибровочный график, отражающий зависимость площади пика (S) от концентрации введённого вещества (C%), представлен на рисунке 3.

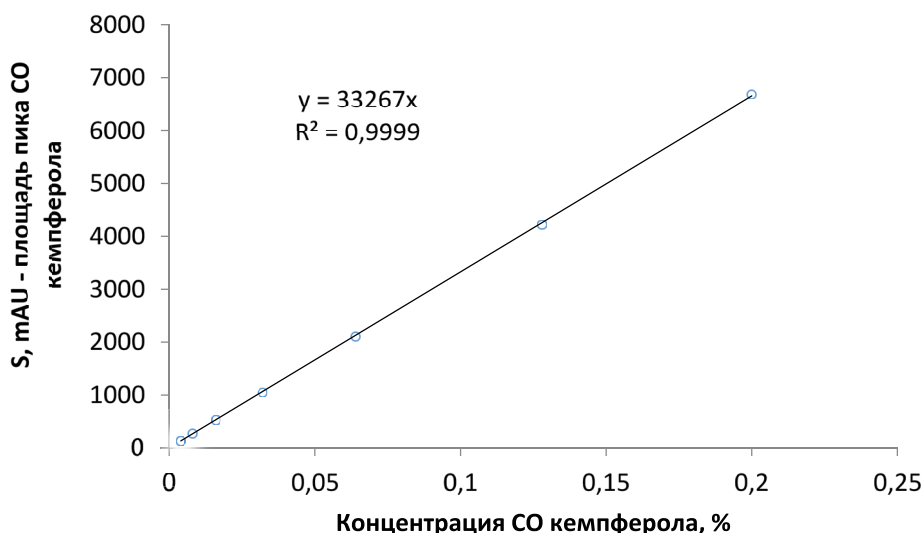


Рисунок 3 – Калибровочный график зависимости площади пика от концентрации кемпферола

В указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость имела прямолинейную зависимость, уравнение регрессии имело вид:

$$y = 33267x$$

R^2 – коэффициент корреляции составил 0,999,

что свидетельствует о прямолинейной зависимости между концентрацией СО кемпферола и площадью пика.

Результаты расчёта содержания кемпферола в прополисе разных опытных образцов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Содержание кемпферола в опытных образцах прополиса

№ опытного образца прополиса	1	2	3	4	5	6
Содержание кемпферола, %	0,0149	0,0159	0,0156	0,0148	0,0149	0,0141

Данные, представленные в таблице 4, свидетельствуют, что содержание кемпферола в опытных образцах прополиса находилось в диапазоне 0,0141–0,0159%.

Прополис представляет собой концентрат полифенольных соединений, за счёт чего обладает широким спектром биологической активности. Носителями фармакологических свойств в прополисе, в первую очередь, являются флавоноиды, представленные исключительно агликонами. По имеющимся в литературе данным и в ходе собственных исследований, установлено, что агликонов в прополисе встречается порядка 10–15, что существенно затрудняет стандартизацию данного объекта. Однако, существуют флавоноидные агликоны, которые присутствуют практически во всех исследованных образцах прополиса в мажорных концентрациях. Таким базовым флавоноидом, в первую очередь, является кемпферол. Экономическая доступность и химическая стабильность указанного компонента делает его удобным средством для стандартизации прополиса. Перечисленные причины позволили нам впервые предложить стандартизацию прополиса по содержанию кемпфе-

рола. Разработанная методика с использованием абсолютной градуировки обладает линейностью, воспроизводимостью и может быть рекомендована как один из вариантов стандартизации прополиса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, в ходе проведённых исследований, установлено, что состав изученных образцов прополиса характеризуется достаточно стабильным, однотипным набором флавонолов, включающих: кверцетин, изорамнетин, рамнетин, пендулетин, производные кемпферола, галангин, метоксигалангин. Все компоненты хорошо разделяются в условиях градиентного режима хроматографирования. Доминирующими флавонолами прополиса являются кемпферол и его производные: рамноцитрин, кемферид, которые занимают в среднем около 84% всей суммы флавонолов. Методом абсолютной градуировки удалось оценить количественное содержание кемпферола в исследованных образцах прополиса. Воспроизводимый состав флавонолов в прополисе, их хорошее хроматографическое поведение в условиях обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяют рекомендовать стандартизовать прополис по кемпферолу.

INTRODUCTION. Propolis is a sticky resinous substance collected by bees from treekidneys and modified by their enzymes [1]. Propolis can have different colors from dark green to yellow and red; its taste is bitter and peppery, the odour is resinous [2]. According to its physicochemical properties, propolis is a unique natural product, the composition of which includes more than 800 substances [3]. Propolis includes a range of valuable biologically active components, and therefore has a variety of pharmacological activities. Primarily propolis is characterized by strong antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulating and antitumoral properties [4]. Propolis contains a number of microelements, nitrogen compounds - amides, amines, amino acids. In trace amounts, vitamins are found. However, polyphenols represented by flavonoids, phenolic acids and oxycinnamic acids are of the greatest pharmacological value. Flavonoids of propolis have a variety of pharmacological activities: choleric, diuretic, capillary-strengthening and anti-inflammatory effects [3, 5, 6, 7, 8, 9].

Among all the propolis flavonoids it's possible to extract the flavonols, which are the most wide-spread natural representatives of flavonoids and have a broad therapeutic effect [10, 11]. In particular, quercetin has an anti-inflammatory effect, reduces risk factors for a cardiovascular disease and is positioned as an agent that suppresses atherogenesis [12]. Isoramnetin protects cardiomyocytes from active forms of oxygen,

suppressing apoptosis, has anti-carcinogenic properties, inducing apoptosis of myeloid erythroleukemia cells [13]. 3,4'-dimethoxycompferol, ramnetin, andpenduletin show anti-inflammatory activity [14]. Galangin is able to suppress the factors determining the resistance of bacteria to antibiotics [15]. Kaempferol starts the process of apoptosis of ovarian cancer cells, has strong antioxidant properties, which are manifested in the suppression of oxidation stress [16, 17]. It is assumed that kaempferol has anti-inflammatory and anti-allergic action, prevents the development of atherosclerosis [18, 19, 20]. It also has a neuroprotective effect, preventing the development of Parkinson's disease [21]. Kaempferol prevents the destruction of pancreatic cells caused by chronic hyperglycemia [22]. In experiments in vivo, kaempferol is able to regulate the differentiation of proadipocytes, which is manifested in a decrease in the growth of adipose tissue [23].

Since the composition of propolis flavonols varies considerably in different literary sources, and the problem according to what group of substances to standardize this object remains unsolved, the **AIM** of this study was an objective comparative assessment of flavones and flavanols composition in various propolis samples in order to establish the possibility of its adequate standardization in these groups of substances.

MATERIALS AND METHODS. To carry out the research, 6 experimental samples of propolis were taken from different regions of Russia. Using those samples,

we prepared the extracts with 80% ethanol according to traditional scheme of making tinctures in the ratio of 1:10. The obtained extracts were filtered and used directly in the assessment.

Chromatographic separation of propolis spirit extracts was carried out on a liquid chromatograph of "Agilent Technologies 1200 Infinity", USA. The detection was carried out on the basis of the diode array detector "Agilent 1200".

The mobile phases were prepared with the use of ultra-pure water (for liquid chromatography) and ethyl alcohol (according to GOST R 51652). As an acid modifier, formic acid was used (qualification – chemically pure).

The number of theoretical plates characterizing the efficiency of the column [24] was calculated according to Formula 1:

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_r}{\mu_{0,5}}\right)^2 \quad (1)$$

where t_r is retention time for the analyzed component; $\mu_{0,5}$ is a peak width at the half-height, mm.

As the optimal criterion, the value not less than 5000 was taken.

The peak separation coefficient R_s was calculated according to Formula 2:

$$R_s = \frac{\Delta l}{\mu_{0,5(1)} + \mu_{0,5(2)}} \quad (2)$$

Where Δl is the distance between the peaks of two adjacent peaks, mm;

$\mu_{0,5(1)}, \mu_{0,5(2)}$ is the peak width at the half-height of the two components, mm.

Separation coefficient R_s should not be less than 1,5.

The peak asymmetry coefficient (T_f) is calculated according to Formula 3:

$$T_f = \frac{\mu_{0,05}}{2 \times f} \quad (3)$$

where $\mu_{0,05}$ is the peak width at 5,0% height above the base line, mm;

f is the distance from the beginning of the peak at 5.0% height above the baseline to the perpendicular drawn from its apex, mm.

The asymmetry coefficient T_f should be not less than 2.

The mobilephase: 1,0% water solution of formic acid (A) and ethanol 95% (B);

steel column: *Ascentisexpress* $C_{18}2,7\mu m \times 100 mm \times 4,6 mm$;

mobile phase speed: 0,5 ml / min;

column thermostat temperature: +35°C;

sample volume: 1 μl .

The composition of the mobile phase was programmed in the conditions shown in Table 1.

Table 1 – Conditions for elution of propolis components

Time, min	A, %	B, %
0	90	10
40	10	90

The detection was carried out at the following wave lengths: 268, 336 nm (for flavones); 350, 360, 375 nm (for flavonoles).

The components were identified by the retention time, by comparison with the corresponding standard samples and by the results of the detection. The relative composition of individual components in sum was determined using of the internal normalization (Formula 4):

$$Xi = \frac{Si \times 100}{\sum S} \quad (4)$$

where S_i is the average area of the analyte peak on the chromatograms of the sum;

$\sum S$ is the average value of the sum of peak areas on chromatograms.

RESULTS AND DISCUSSION. In the course of chromatographic separation it was found out that 12 components of flavone and flavonol nature are present in propolis. The chromatogram of separation of spirit extraction from propolis, recorded at $\lambda = 375$ nm of diode-matrix detection, is shown in Fig. 1.

As seen in Figure 1, most of the components present on the chromatogram are separated along the baseline. That indicates good selectivity of the chromatographic conditions used.

The efficiency of the chromatographic system has been confirmed by calculating suitability criteria. The results are shown in Table 2.

Table 2 – Criteria for suitability of a chromatographic system for determination of flavones and flavonols in propolis

t_r	N	R_s	T_f	W_b
24.938	143430	44.4	0.63	0.155
28.624	338364	2.0	1.06	0.1158
28.809	382507	1.04	0.56	0.1096
32.998	498600	3.37	0.87	0.11
33.443	819389	1.3	2.35	0.0869
33.539	587092	1.46	0.63	0.1030
34.172	419638	1.13	0.84	0.1242

Table 2 continued

t_R	N	R_s	T_f	W_b
34.498	247171	1.33	0.76	0.1633
34.954	504452	1.92	0.65	0.1158
37.539	726899	1.78	0.9	0.1036
38.339	555196	1.52	0.54	0.121
38.705	830006	1.95	0.53	0.1

t_R – absolute retention time, N – number of theoretical plates, R_s – peak separation coefficient, T_f – asymmetry coefficient, W_b – peak width at the baseline

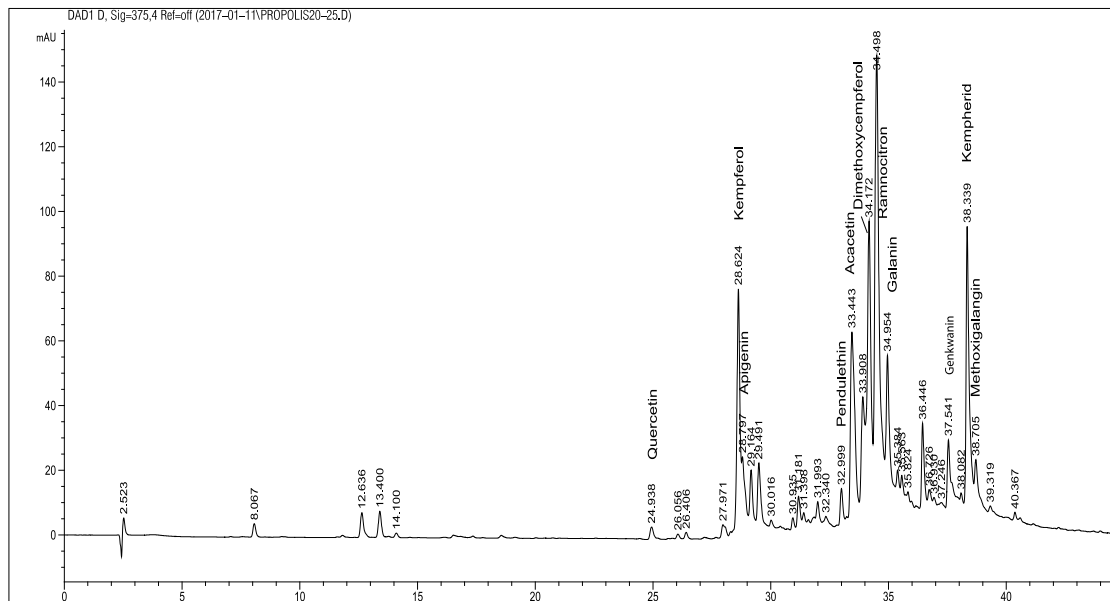


Fig. 1 – Chromatogram of propolis registered at $\lambda = 375\text{ nm}$ with diode-matrix detection

The results of calculating suitability criteria presented in Table 2 ($N > 5000$, $R_s > 1.5$, $T_f < 2$) generally correspond to the referenced values. Consequently, the present chromatographic system can be recognized as effective for the determination of flavones and flavonols in propolis.

The peak areas of flavones and flavonols obtained

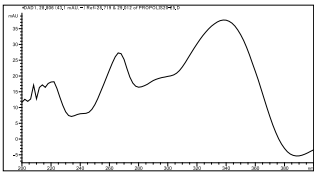
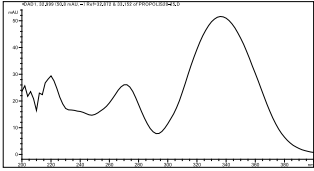
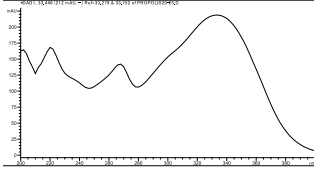
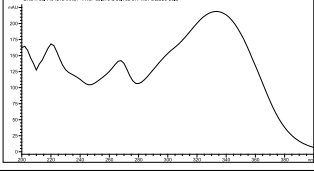
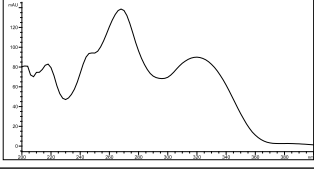
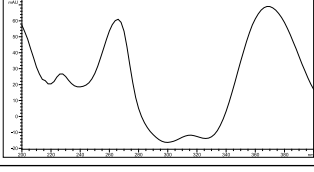
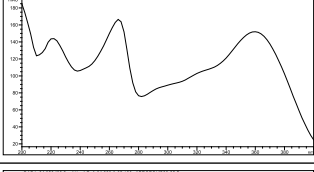
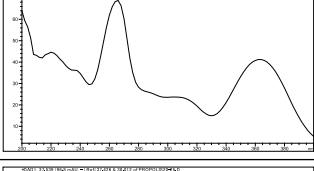
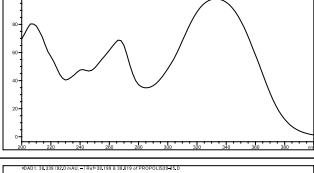
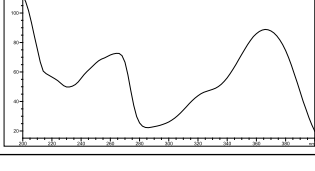
during chromatography were used to calculate the relative content of each component by the internal normalization method.

The results of the detection of components of flavones and flavonols and their composition in sum are given in Table 3.

Table 3 – The component composition of flavones and flavonols of propolis and their relative content in sum

t_R	UV-spectrum of component	Summed concentration, %	Identified component
24.938		0.72	Quercetin
28.624		7.72	Kaempferol

Table 3 continued

28.809		4.86	Apigenin
32.998		5.92	Penduletine
33.443		7.7	Acacetin
33.539		15.9	Chrysin*
34.172		8.9	Dimethoxichempferol
34.498		22.1	Ramnocitrine
34.954		4.57	Galangin
37.539		8.5	Genkwanin
38.339		11.95	Kempherid
38.705		1.06	Methoxigalangiin

*not shown on chromatogram

The percentage distribution of flavones and flavonols within the group is shown in Figure 2.

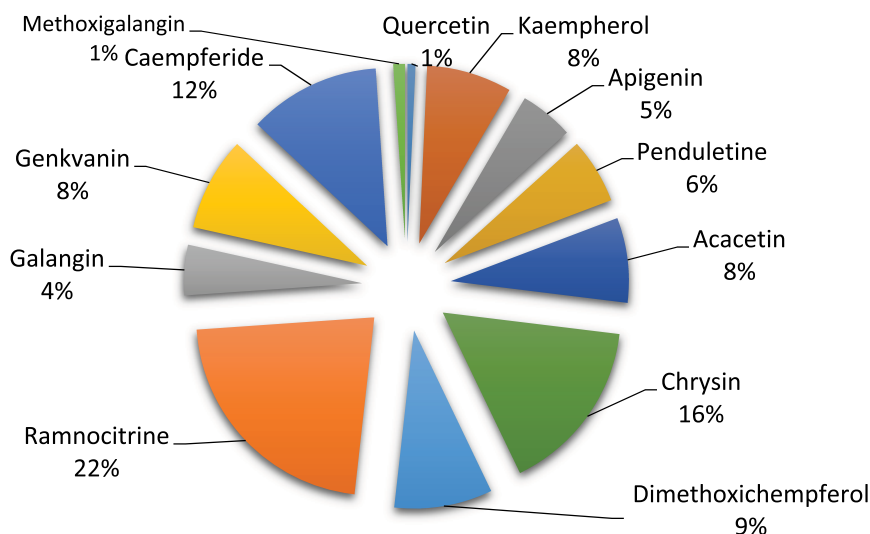


Fig. 2 – The percentage distribution of flavones and flavonols within the group

The data presented in Table 3 and in Figure 2 show that among the identified components, the highest content is in flavonols, methoxyl derivatives: ramnocitrin (22,0%), and kaempferid (12,0%); in flavones it is chrysin (16,0%).

However, the composition of flavones and flavonols can vary depending on the sample. Hereby, kempferol was identified in all the studied samples, whereas some of the identified components were absent from separate propolis samples. Therefore, we proposed the standardization of propolis according to the composition

of flavonoids in terms of kaempferol as a stable and commercially most available component of propolis. For the quantitative determination of flavonols in propolis, the method of absolute calibration in terms of kaempferol was used. For this purpose, a calibration curve prepared from a calibration standard sample of kaempferol was prepared in advance. The range of concentrations of calibration solutions was 0.004–0.2%.

A calibration graph showing the peak area (S) as a function of the concentration of the inserted substance (C%) is shown in Figure 3.

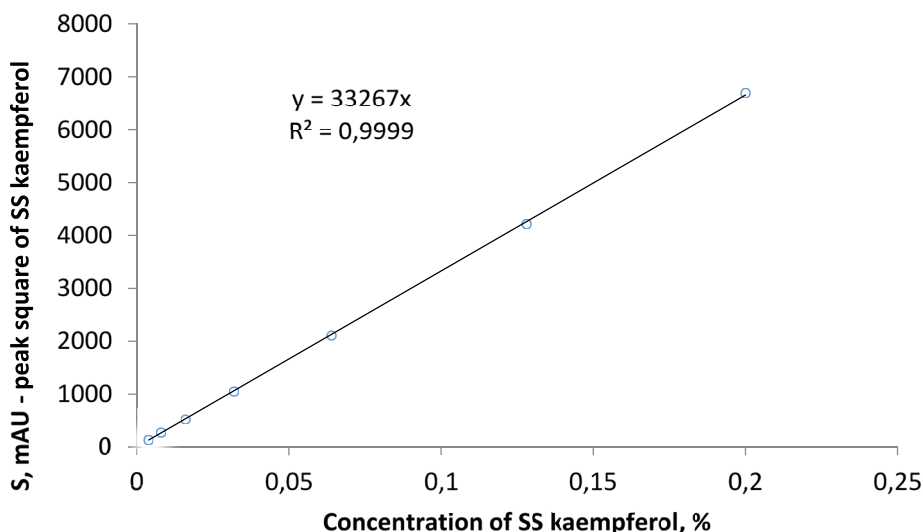


Fig. 3 – Calibration graphic of peak area versus concentration of kaempferol

In the indicated range of concentrations, the calibration dependence had a rectilinear dependence and the equation had the form:

$$y = 33267x$$

R^2 , a correlation coefficient, equals to 0,999. That shows the linear dependence between the concentration

of the standard sample of kaempferol and its peak square.

The results of the calculation of the kaempferol composition in propolis different test samples are shown in Table 4.

Table 4 – The content of kaempferol in propolis

№ experimental sample of propolis	1	2	3	4	5	6
Composition of kaempferol, %	0.0149	0.0159	0.0156	0.0148	0.0149	0.0141

The data presented in Table 4 indicates that the content of kaempferol in the pilot propolis samples was in the range 0.0141–0.0159%.

Propolis is a concentrate of polyphenolic compounds, due to which it has a wide spectrum of biological activity. The carriers of propolis pharmacological properties are primarily flavonoids, represented exclusively by aglikones.

According to the data available in the literature and in the course of the research of our own, it has been established that in propolis aglikones occur in the range of 10–15, which significantly complicates the standardization of this object. However, there are flavonoid aglycons, which are present in almost all propolis samples in major concentrations. Such a basic flavonoid is primarily kaempferol. The economic availability and chemical stability of this component makes it a convenient means for standardizing propolis. These reasons allowed us to propose a novel standardization of propolis according to the composition of kaempferol. The developed

technique with the use of absolute calibration has linearity, reproducibility and can be recommended as one of the options for standardization of propolis.

CONCLUSION. Thus, in the course of the carried out research, it has been established that the composition of the propolis samples is characterized by a fairly stable, same-type set of flavonols, including: quercetin, isoramnetin, ramnetin, penduletin, kempferol derivatives, galangin, methoxyhalangin. All the components are well separated under the conditions of gradient chromatography. The dominant propolis flavonols are ramnocitrine, kaempferol, camphoride, the derivatives of caffeer occupy an average of about 84% of the total amount of flavonols. By method of absolute calibration, it was possible to estimate the quantitative composition of kaempferol in the investigated propolis samples. The reproducible composition of flavnols in propolis, their good chromatographic behavior under RP HPLC conditions allow us to recommend the standardization of propolis in terms of kaempferol.

Библиографический список

1. Ramadan A., Soliman G., Sawsan S. Mahmoud, Salwa M. Nofal, Rehab F. Abdel-Rahman. Evaluation of the safety and antioxidant activities of Crocus sativus and Propolis ethanolic extracts // Journal of Saudi Chemical Society. Vol. 16. Is. 1. P. 13–21.
2. Felipe C. da Silva, Carmen S. Favaro-Trindade, Severino M. de Alencar, Marcelo Thomazini, Julio C.C. Balieiro. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis // Journal of ApiProduct and ApiMedical Science. 2011. Vol. 3. Is. 2. P. 94–100. DOI 10.3896/IBRA.4.03.2.05
3. Ивашевская Е.Б., Лебедев В.И., Рязанова О.А., Позняковский В.М. Экспертиза продуктов пчеловодства. Качество и безопасность. Сиб. унив. изд-во: Новосибирск, 2007. 208 с.
4. Watanabe M.A., Amarante M.K., Conti B.J., Sforcin J.M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review // JPP. 2011. Vol. 63. Is. 11. P. 1378–1386. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x
5. Браславский В.Б., Куркин В.А. Исследование электронных спектров флавоноидов тополя и прополиса // Медицинский альманах. 2011. №15(2). С. 140–144.
6. Тихонов А.И., Ярных Т.Г., Черных В.П., Зупанец И.А., Тихонова С.А. Теория и практика производства лекарственных препаратов прополиса. Харьков: «Основа», 1998. 384 с.
7. Поправко С.А., Гуревич А.И., Колосов М.Н. Флавоноидные компоненты прополиса // Химия природных соединений. 1969. № 6. С. 476–482.
8. Симонян Е.В., Юркова Е.А., Карагезова С.Т. Определение флавоноидов в продуктах пчеловодства / Научная дискуссия: вопросы медицины: материалы I Международной заочной научно-практической конференции. М.: Международный заочный центр науки и образования, 2012.
9. Соколов И.В., Торгов И.В. Флавоноидные агликоны в прополисе и его источниках // Химия природных соединений. 1990. № 4. С. 550–551.
10. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино, 2013. 310 с.
11. Шустов В.В., Терах Е.И. Применение флавоноидов в медицине / Научное сообщество студентов XXI столетия. XXX международная студенческая научно-практическая конференция. 2015. № 4(29). URL: [http://sibac.info/archive/nature/4\(29\)](http://sibac.info/archive/nature/4(29)) (дата обращения: 04.04.2018).
12. Kleemann R., Verschuren L., Morrison M., Zadelaar S., van Erk M.J., Wielinga P.Y., Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models // Atherosclerosis. 2011. Vol. 218. P. 44–52.
13. Sun B., Sun G.B., Xiao J., Chen R.C., Wang X., Wu Y., Cao L., Yang Z.H., Sun X.B. Isoramnetin inhibits H(2)O(2)-induced activation of the intrinsic apoptotic pathway in H9c2 cardiomyocytes through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation // J.Cell Biochem. 2012. Vol. 113. P. 473–485.
14. Martinez J., Silván A.M., Abad M.J., Bermejo P., Villar A., Söllhuber M. Isolation of two flavonoids from Tanacetum microphyllum as PMA-induced ear edema inhibitors // Journal of Natural Products. 1997. Vol. 60(2). P. 142–144.
15. Eumkeb G., Sakdarat S., Siriwong S. Reversing beta-lactam antibiotic resistance of Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance and synergism with ceftazidime // Phytomedicine. 2010. Vol. 18. P. 40–45.

16. Luo H., Rankin G.O., Li Z., Depriest L., Chen Y.C. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway // *Food Chem.* 2010. Vol. 128. P. 513–519.
17. Nirmala P., Ramanathan M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinoma in rats // *Eur.J.Pharmacol.* 2011. Vol. 654. P. 75–79.
18. Huang C.H., Jan R.L., Kuo C.H., Chu Y.T., Wang W.L., Lee M.S., Chen H.N., Hung C.H. Natural flavone kaempferol suppresses chemokines expression in human monocyte THP-1 cells through MAPK pathways // *J.Food Sci.* 2010. Vol. 75. P. 254–259.
19. Lin M.K., Yu Y.L., Chen K.C., Chang W.T., Lee M.S., Yang M.J., Cheng H.C., Liu C.H., Chen D., Chu C.L. Kaempferol from *Se-men cuscatae* attenuates the immune function of dendritic cells // *Immunobiology.* 2011. Vol. 216. P. 1103–1109.
20. Xiao H.B., Lu X.Y., Sun Z.L., Zhang H.B. Kaempferol regulates OPN-CD44 pathway to inhibit the atherogenesis of apolipoprotein E deficient mice // *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2011. Vol. 257. P. 405–411.
21. Li S., Pu X.P. Neuroprotective effect of kaempferol against a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease // *Biol.Pharm.Bull.* 2011. Vol. 34. P. 1291–1296.
22. Zhang Y., Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyper-glycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function // *Eur.J.Pharmacol.* 2011. Vol. 670. P. 325–332.
23. Byun M.R., Jeong H., Bae S.J., Kim A.R., Hwang E.S., Hong J.H. TAZ is required for the osteogenic and anti-angiogenic activities of kaempferol // *Bone.* 2012. Vol. 50. P. 364–372.
24. European Pharmacopoeia. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France; 2012. 2727 p.

References

1. Ramadan A, Soliman G, Sawsan SM, Salwa MN, Rehab F Abdel-Rahman. Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. *Journal of Saudi Chemical Society.* 2012 Jan;16(1):13-21.
2. da Silva FC, Favaro-Trindade CS, de Alencar SM, Marcelo Thomazini, Julio CC Balieiro. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science.* 2011;3(2):94-100. DOI 10.3896/IBRA.4.03.2.05
3. Ivashkevskaya EB, Lebedev VI, Ryazanova OA, Poznyakovskiy VM. Ekspertiza produktov pchelovodstva. Kachestvo i bezopasnost' [Expertise of bee products. Quality and safety]. Novosibirsk: Sib. univ. izd-vo; 2007. 208 p. Russian.
4. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *JPP.* 2011 Sep 27;63(11):1378-86. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x.
5. Braslavskiy VB, Kurkin VA. Issledovaniye elektronnykh spektrov flavonoidov topolya i propolisa [Study of electronic spectra of poplar and propolis flavonoids]. *Medical Almanac.* 2011;15(2):140-144. Russian.
6. Tikhonov AI, Yarnykh TG, Chernykh VP, Zupanec IA, Tihonova SA. Teoriya i praktika proizvodstva lekarstvennykh preparatov propolisa [Theory and practice of production of medicinal preparations of propolis]. Kharkov: «Osnova»; 1998. 384 p. Russian.
7. Popravko SA, Gurevich AI, Kolosov MN. Flavonoidnyye komponenty propolisa [Flavonoid components of propolis]. *Khimiya prirodnykh soyedineniy.* 1969;6:476-482. Russian.
8. Simonyan EV, Yurkova EA, Karagezova ST. Opredeleniye flavonoidov v produktakh pchelovodstva [Determination of flavonoids in bee products]. In: Nauchnaya diskussiya: voprosy meditsiny [Scientific discussion: questions of medicine]. Proceedings of I International Correspondence Scientific and Practical Conference. Moscow: Mezhdunarodnyy zaochnyy tsentr nauki i obrazovaniya; 2012. Russian.
9. Sokolov IV, Torgov IV. Flavonoidnyye aglikony v propolise i yego istochnikakh [Flavonoid aglycons in propolis and its sources]. *Khimiya prirodnykh soyedineniy.* 1990;4:550-1. Russian.
10. Tarakhovskiy YuS, Kim YuA., Abdrasilov BS, Muzafarov EN. Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino: Synchrobook; 2013. 310 p. Russian.
11. Shustov VV, Terakh EI. Primeneniye flavonoidov v meditsine [The use of flavonoids in medicine]. In: Nauchnoye soobshchestvo studentov XXI stoletiya [Scientific community of students of the XXI century]. Proceedings of XXX International Student Scientific and Practical Conference [Internet]: 2015;4(29) [cited 2018 Apr 04]. Available from: [http://sibac.info/archive/nature/4\(29\)](http://sibac.info/archive/nature/4(29)). Russian.
12. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga PY, Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis.* 2011;218:44-52.
13. Sun B, Sun GB, Xiao J, Chen RC, Wang X, Wu Y, Cao L, Yang ZH, Sun XB. Isorhamnetin inhibits H(2) O(2)-induced activation of the intrinsic apoptotic pathway in H9c2 cardiomyocytes through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation. *J.Cell Biochem.* 2012;113:473-485.
14. Martinez J, Silvan AM, Abad MJ, Bermejo P, Villar A, Söllhuber M. Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-induced ear edema inhibitors. *Journal of Natural Products.* 1997;60(2):142-4.
15. Eumkeb G, Sakdarat S, Siriwong S. Reversing beta-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine.* 2010;18:40-5.
16. Luo H, Rankin GO, Li Z, Depriest L, Chen YC. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chem.* 2011;128:513-9.
17. Nirmala P, Ramanathan M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinoma in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;654:75-9.

18. Huang CH, Jan RL, Kuo CH, et al. Natural flavone kaempferol suppresses chemokines expression in human monocyte THP-1 cells through MAPK pathways. *J. Food Sci.* 2010;75:254-9.
19. Lin MK, Yu YL, Chen KC, Chang WT, Lee MS, Yang MJ, Cheng HC, Liu CH, Chen D, Chu CL. Kaempferol from *Semen cuscuteae* attenuates the immune function of dendritic cells. *Immunobiology.* 2011;216:1103-9.
20. Xiao HB, Lu XY, Sun ZL, Zhang HB. Kaempferol regulates OPN-CD44 pathway to inhibit the atherogenesis of apolipoprotein E deficient mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011;257:405-11.
21. Li S, Pu XP. Neuroprotective effect of kaempferol against a 1-me-thyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34:1291-6.
22. Zhang Y, Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyper-glycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;670:325-32.
23. Byun MR, Jeong H, Bae SJ, Kim AR, Hwang ES, Hong JH. TAZ is required for the osteogenic and anti-adipogenic activities of kaempferol. *Bone.* 2012;50:364-72.
24. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg, France: European Directorate for Quality of Medicines and Health care; 2014. 2727 p.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Лупина Екатерина Викторовна – аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: 583404@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0001-5081-2785.

Писарев Дмитрий Иванович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0002-2996-7712.

Новиков Олег Олегович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: novikov@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-3145-6783.

Малютина Анастасия Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0001-6170-2151.

Васильев Георгий Владимирович – старший преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: vasilyev@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-4847-7476.

Васильева Юлия Геннадьевна – аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: 689014@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-1471-5309.

Authors:

Lupina Ekaterina Viktorovna – post-graduate student in the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: 583404@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0001-5081-2785.

Pisarev Dmitriy Ivanovich – PhD (Pharmacy), Associate Professor, Professor of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0002-2996-7712.

Novikov Oleg Olegovich – PhD (Pharmacy), Professor, Head of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: novikov@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-3145-6783.

Malyutina Anastasiya Yurevna – PhD (Pharmacy), Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0001-6170-2151.

Vasilyev Georgy Vladimirovich – Senior Lecturer of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: vasilyev@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-4847-7476.

Vasileva Yulia Gennadievna – post-graduate student in the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: 689014@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-1471-5309.

Поступила в редакцию: 02.04.2018
Отправлена на доработку: 27.05.2018, 03.06.2018
Принята к печати: 21.06.2018

Received: 02.04.2018
Sent back for revision: 27.05.2018, 03.06.2018
Accepted for publication: 21.06.2018