

УДК 615.322:543.05

**Н. А. Коваленко<sup>1</sup>, А. В. Янцевич<sup>2</sup>, Г. Н. Супиченко<sup>1</sup>, В. Н. Леонтьев<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Белорусский государственный технологический университет<sup>2</sup> Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси**ПОЛУЧЕНИЕ ГИПЕРИЦИНОБОГАЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ  
ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО**

Приведены результаты твердофазной экстракции (ТФЭ) препаратов травы зверобоя. Для получения экстрактов использовали воздушно-сухое растительное сырье зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. (сорт Янтарь), выращенного в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси. Анализ растворов экстракта травы зверобоя проводили методом электронной абсорбционной спектроскопии. Показано влияние природы растворителя на спектральные характеристики экстракта. Для проведения твердофазной экстракции использовали сорбент Waters Sep-Pak C18®Vac RC. В качестве элюирующей системы использовали растворы метанола различной концентрации. Для метанольных фракций твердофазной экстракции записаны электронные спектры поглощения и флуоресценции. Показано, что основная часть гиперического элюируется 80%-ным метанолом. Рассчитаны значения квантового выхода флуоресценции метанольных фракций твердофазной экстракции. Полученные результаты показывают, что твердофазная экстракция на гидрофобном сорбенте является перспективным способом повышения содержания гиперического в экстрактах травы зверобоя.

**Ключевые слова:** гиперичесин, твердофазная экстракция, *Hypericum perforatum*.

**N. A. Kovalenko<sup>1</sup>, A. V. Yantsevich, G. N. Supichenko<sup>1</sup>, V. N. Leont'ev<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Belarusian State Technological University<sup>2</sup> Institute of Bioorganic Chemistry of the National academy of Sciences of Belarus**PREPARATION OF HYPERICIN ENRICHED  
ST. JOHN'S WORT EXTRACTS**

Results of solid phase extraction (SPE) of St. John's Wort extracts were described. In order to obtain the extract the air-dried plant material of *Hypericum perforatum* L. (cultivar Yantar) grown in the Central Botanical Garden of NAS of Belarus was used. Analysis of the St. John's wort extract solutions was carried out by electronic absorption spectroscopy. It was shown the influence of the nature of the solvent on the spectral characteristics of the extract. The sorbent Waters Sep-Pak S18®Vac RC was used for solid-phase extraction. The methanol solutions of different concentrations were used as an eluent system. For SPE methanol fractions absorption and fluorescence spectra were registered. It is shown that the main part of hypericin was eluted with 80% methanol. The values of quantum yields were calculated. These results suggest that solid phase extraction on the non-polar sorbent is a promising way to increase the content of the hypericin in the St. John's Wort extracts.

**Key words:** hypericin, solid phase extraction, *Hypericum perforatum*.

**Введение.** Одним из перспективных методов лечения онкологических заболеваний является метод фотодинамической терапии. Для реализации этого метода необходимы эффективные фотосенсибилизаторы, способные накапливаться в опухолевых клетках, не затрагивая нормальные ткани, что позволяет предотвратить или уменьшить повреждение здоровых клеток в процессе разрушения опухоли. Такими свойствами обладает гиперичесин, входящий в состав экстракта травы зверобоя продырявленного [1].

Проведенные ранее исследования [2] показали, что обработка травы зверобоя двухфазной системой экстрагентов с последующей очисткой полученного экстракта от примесных соединений с использованием водными растворами желатины, аммиака и муравьиной кисло-

ты позволяет получать препараты с содержанием гиперического не менее 5,5–5,9 мас.

Цель настоящей работы – получение гиперического обогащенных экстрактов травы зверобоя с применением твердофазной экстракции.

**Основная часть.** В работе были использованы воздушно-сухие образцы надземной части зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. (сорт Янтарь). Растительное сырье было получено на интродукционных участках Центрального ботанического сада НАН Беларуси в 2012 г. Сбор надземной части образцов травы зверобоя осуществляли в фазу цветения в период с июня по август с соблюдением общих правил сбора лекарственных растений. Воздушно-сухое растительное сырье измельчали до размера частиц 1 мм.

Экстракты травы зверобоя получали с применением двухфазной системы растворителей при комнатной температуре и непрерывном перемешивании в течение 90 мин. В качестве экстрагирующей системы использовали смесь растворителей – хлороформ : этанол : вода (8 : 10 : 10) [3]. Подготовку экстрактов осуществляли по методикам, описанным в литературном источнике [2].

Для оценки влияния состава растворителя на максимум поглощения и коэффициент молярной экстинкции были зарегистрированы электронные спектры поглощения экстракта травы зверобоя (рис. 1) в различных растворителях: этаноле (1), метаноле (2), ацетонитриле (3) и 80%-ном метаноле (4).

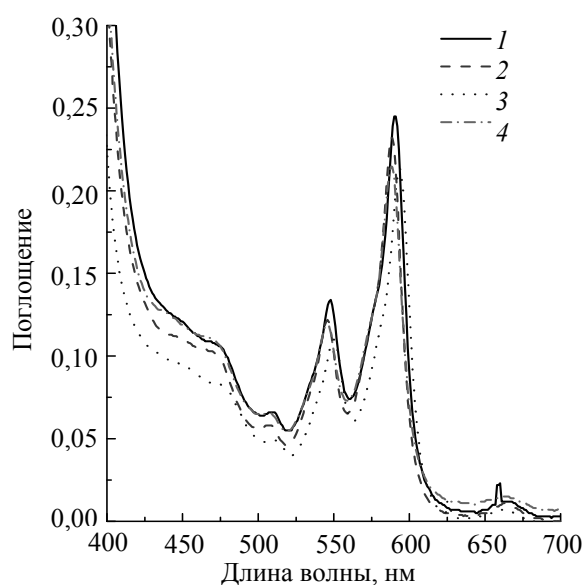


Рис. 1. Спектр поглощения неочищенного экстракта в различных растворителях в области 400–700 нм (концентрация экстракта 287 мкг/мл)

Сравнение спектральных характеристик свидетельствует, что характер растворителя оказывает влияние на положение максимума и интенсивность поглощения гиперидина, однако при этом ошибка количественного определения гиперидина, вызванная сменой растворителя от 100%-ного метанола до 80%-ного метанола не превысит 10%.

Для проведения твердофазной экстракции использовали неполярный сорбент Waters Sep-Pak C18@Vac RC, представляющий собой силикагель с привитыми октадецильными группами. В качестве элюирующей системы были использованы растворы метанола различной концентрации. Характеристики полученных фракций приведены в табл. 1.

Анализ фракций проводили методом электронной абсорбционной спектроскопии. Для

минимизации ошибки количественной оценки содержания гиперидина, которая может возникнуть при изменении полярности среды, перед регистрацией спектров все образцы разбавляли чистым абсолютизированным метанолом в 50-кратном соотношении.

Таблица 1  
Фракции, полученные методом твердофазной экстракции

Фракция	Элюент	Объем элюента, мл
1	25%-ный метанол	3,0
2	50%-ный метанол	3,0
3	75%-ный метанол	3,0
4	80%-ный метанол	3,0
5	100%-ный метанол	3,0
6	100%-ный метанол	9,0
7	Хлороформ	9,0

На рис. 2 представлены спектры поглощения фракций 1–7 в видимой области.

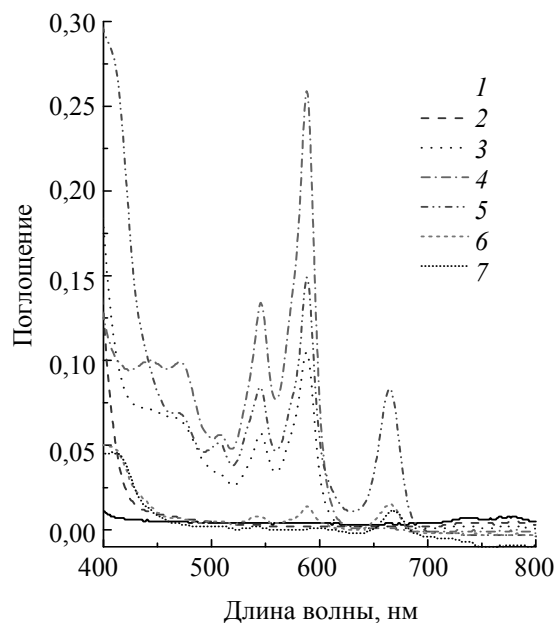


Рис. 2. Спектры поглощения фракций 1–7 в области 400–800 нм

Из данных рис. 2 видно, что основная часть гиперидина элюируется в составе фракции 4.

Для оценки чистоты полученных фракций были измерены интенсивности полос поглощения при 280 и 590 нм, а также рассчитаны их отношения. Полученные данные приведены в табл. 2. Из представленных данных видно, что хрома-

тографическое разделение неочищенного экстракта на сорбенте Waters Sep-Pak C18@Vac RC позволило получить препарат с достаточно высоким содержанием гиперидина, превышающем исходное приблизительно в 1,7 раза.

Таблица 2  
Спектральные характеристики фракций

Фракция	Оптическая плотность растворов при $\lambda = 280$ нм и $\lambda = 590$ нм		$A_{590} / A_{280}$
	$A_{280}$	$A_{590}$	
1	0,13	0,002	0,015
2	0,565	0,014	0,025
3	1,177	0,105	0,089
4	0,758	0,259	0,342
5	1,202	0,143	0,119
6	0,034	0,014	0,412
7	0,0183	0,002	0,109
Стандартный образец гиперидина в метаноле	—	—	0,581

Фракции 2 и 3, полученные путем элюции 50 и 75% метанолом, содержат преимущественно сопутствующие гиперидину соединения, поглощающие в УФ-области. Для сравнения в табл. 2 приведены данные для стандартного образца гиперидина в метаноле [4].

Для характеристики флуоресцентных свойств ТФЭ-фракций были сняты их спектры испускания при оптимальной длине волны возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 470$  нм), которые приведены на рис. 3.

На основании полученных спектральных характеристик рассчитаны значения квантового выхода фракций 3 и 4, которые представлены в табл. 3. Низкие значения кажущегося квантового выхода экстрактов гиперидина обусловлены наличием примесей, способных вызывать тушение флуоресценции.

По литературным данным [4], квантовый выход стандартного раствора гиперидина в метаноле составляет 0,27. Сравнивая литературные данные и полученные нами экспериментальные данные по значениям квантового выхода неочищенного экстракта зверобоя и фракции 4, можно отметить, что ТФЭ-разделение очищенного экстракта на сорбенте Waters Sep-Pak C18@Vac RC позволяет получать препарат

травы зверобоя с повышенным содержанием гиперидина.

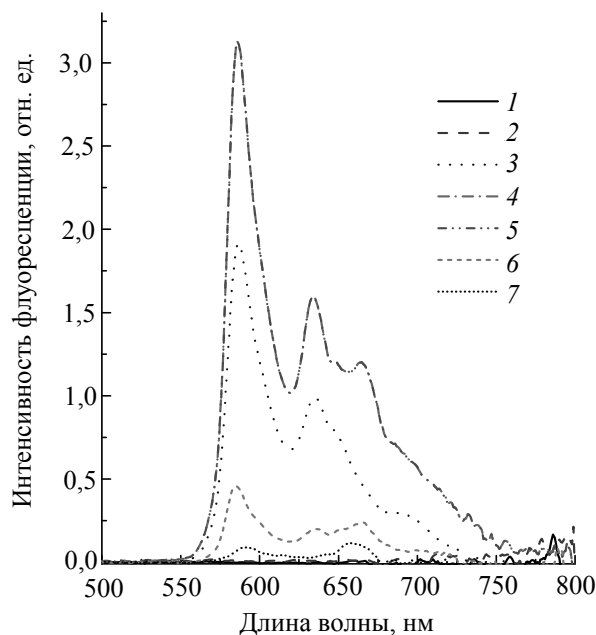


Рис. 3. Спектры испускания флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 470$  нм) фракций 1–7

Таблица 3  
Значения квантового выхода флуоресценции фракций 3 и 4

Параметр	Фракция		Неочищенный экстракт
	3	4	
Интегральная интенсивность флуоресценции образца	107,2	195,9	324,1
Интегральная интенсивность флуоресценции стандарта (флуоресцеин в 0,1 н. растворе NaOH, квантовый выход 0,93)	768,1	901,5	3658,2
Отношение интенсивности флуоресценции	0,14	0,22	0,09
Относительный квантовый выход	0,13	0,20	0,08

**Заключение.** Проведенные исследования указывают на то, что твердофазная экстракция на октадецилсилильном сорбенте может быть использована для обогащения экстрактов травы зверобоя гиперидином.

#### Литература

1. Karioti A., Bilia A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutics // Int. J. Mol. Sci. 2010. Vol. 11. P. 562–594.

2. Коваленко Н. А., Янцевич А. В., Супиченко Г. Н., Леонтьев В. Н. Влияние вида сырья и условий обработки на содержание гиперина в экстрактах травы зверобоя // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2015. № 1. С. 37–42.

3. Сорокин В. В., Каухова И. Е., Вайнштейн В. А. Применение направленной экстракции при получении препаратов травы зверобоя // *Фармация.* 2007. С. 34–35.

4. Adhikary R. Application of fluorescence spectroscopy: excited-state dynamics, food-safety, and disease diagnosis. Iowa State University Ames: Iowa, 2011. 235 p.

#### References

1. Karioti A., Bilia A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, vol. 11, pp. 562–594.

2. Kovalenko N. A., Yantsevich A. V., Supichenko G. N., Leont'ev V. N. The influence of raw material type and treatment conditions on the hypericin content in St. John's wort extracts. *Vest'i NAN Belarusi. Ser. bial. navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Ser. biol. Sciences], 2015, no. 1, pp. 37–42 (in Russian).

3. Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Vaynshteyn V. A. The use of directed extraction for preparation of St. John's wort extracts. *Farmatsiya* [Pharmacy], 2007, pp. 34–35 (in Russian).

4. Adhikary R. Application of fluorescence spectroscopy: excited-state dynamics, food-safety, and disease diagnosis. Iowa State University Ames, Iowa, 2011. 235 p.

#### Информация об авторах

**Коваленко Наталья Александровна** – кандидат химических наук, доцент, и. о. заведующего кафедрой аналитической химии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: Kovalenko@belstu.by

**Янцевич Алексей Викторович** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (220141, г. Минск, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, Республика Беларусь). E-mail: Yantsevich@iboch.nas-net.by

**Супиченко Галина Николаевна** – кандидат химических наук, ассистент кафедры аналитической химии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: Supichenko@belstu.by

**Леонтьев Виктор Николаевич** – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: Leontiev@belstu.by

#### Information about the authors

**Kovalenko Natal'ya Aleksandrovna** – Ph. D. Chemistry, associate professor, acting Head of the Department of Analytical Chemistry. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Kovalenko@belstu.by

**Yantsevich Aleksey Viktorovich** – Ph. D. Chemistry, senior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5, block 2, Academician V. F. Kuprevicha str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Yantsevich@iboch.nas-net.by

**Supichenko Galina Nikolaevna** – Ph. D. Chemistry, assistant, Department of Analytical Chemistry. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Supichenko@belstu.by

**Leont'ev Viktor Nikolaevich** – Ph. D. Chemistry, associate professor, Head of the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Leontiev @belstu.by

*Поступила 19.02.2015*