

УДК 543.544

О. В. Стасевич, кандидат химических наук, старший преподаватель (БГТУ);
В. Н. Леонтьев, кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой (БГТУ);
Н. А. Коваленко, кандидат химических наук, доцент (БГТУ);
Г. Н. Супиченко, кандидат химических наук, ассистент (БГТУ)

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И РАЗДЕЛЕНИЕ ГИПЕРИЦИНСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА ЗВЕРОБОЯ

Произведен качественный и количественный хроматографический анализ гипериксодержащих экстрактов зверобоя, на основе которых возможно создание лекарственных средств для лечения онкологических заболеваний методом фотодинамической терапии. Подобраны оптимальные условия для проведения ТСХ и ВЭЖХ анализов этанольных экстрактов зверобоя. Произведено хроматографическое разделение экстракта зверобоя на сорбенте Diaion HP-20, которое дало возможность повысить содержание гипериксодержащих по сравнению с исходным экстрактом более чем в 4 раза.

Qualitative and quantitative chromatographic analysis of hypericin-containing extracts of St. John's Wort which could be used for producing drugs for treating of oncological diseases by the method of photodynamic therapy have been presented. The optimal conditions of carrying out of TLC and HPLC analysis of ethanolic St. John's Wort extracts have been selected. The chromatographic separation of St. John's Wort extract have been carried out using the Diaion HP-20 sorbent. This separation gives the opportunity to enrich the initial extract with hypericins more than 4 times.

Введение. В настоящее время в Республике Беларусь актуальным вопросом является выделение, идентификация и определение биологически активных соединений из растений различных агроклиматических зон Беларуси. На основе полученных субстанций возможно создание лекарственных препаратов, биологически активных добавок, фитопрепаратов. По характеру воздействия на организм лекарственные средства растительного происхождения имеют ряд преимуществ перед синтетическими аналогами, так как они проявляют более мягко выраженный терапевтический эффект.

Фотодинамическая терапия – сравнительно новый перспективный метод лечения онкологических заболеваний, основанный на том, что опухолевые клетки разрушаются под действием активных форм кислорода, которые образуются в результате химической реакции, активируемой световой энергией. Для протекания данной реакции необходимо присутствие в ткани мишени фоточувствительного вещества (фотосенсибилизатора) и наличие источника света с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения данного вещества [1].

В качестве фотосенсибилизаторов могут выступать лишь соединения, имеющие в своей структуре хромофорную группу атомов, которая способна поглощать свет в видимой или ближней ультрафиолетовой области спектра. К таким соединениям относится гипериксин. Это вещество является одним из основных биологически активных компонентов зверобоя и представляет собой конденсированное производное антрахинона. Кроме гипериксина в зверобое

обнаружен второй потенциальный фотосенсибилизатор – псевдогипериксин.

Основная часть. Цель данной работы – качественный и количественный анализ гипериксодержащих экстрактов зверобоя с применением хроматографических методов анализа.

Гипериксины из травы зверобоя выделяли экстракционным способом с применением аппарата Сокслета и этанолом в качестве растворителя. Качественный состав полученного экстракта определялся методом ТСХ. Для подбора оптимальных условий проведения ТСХ анализа было осуществлено разделение этанольного экстракта в элюирующих системах растворителей: I) пропанол-2 – гексан (7 : 3); II) пропанол-2 – вода (9 : 1); III) этилацетат – *n*-бутанол – муравьиная кислота – вода (5 : 3 : 1 : 1); IV) хлороформ – этиловый спирт (8 : 2); V) этилацетат – муравьиная кислота (50 : 6). Вещества детектировали, просматривая хроматограммы под УФ-лампой со светофильтром с длиной волны 254 и 365 нм. Пластины также проявляли в парах йода.

При анализе хроматограмм, полученных в пяти предложенных элюирующих системах, было установлено, что наиболее четкое разделение компонентов этанольного экстракта наблюдалось при использовании элюирующей системы V. Типичная тонкослойная хроматограмма исследуемого экстракта, полученная при использовании элюирующей системы V, представлена на рис. 1.

Гипериксин (рис. 1, позиция 7) на хроматограмме идентифицировали по ярко-красной флуоресценции и показателю $R_f = 0,87$, значение которого совпадало со значением R_f стандартного

образца гиперидина (Carl Roth GmbH, Германия). Псевдогиперидин (рис. 1, позиция б) на хроматограмме идентифицировали по ярко-красной флуоресценции (в УФ-свете с длиной волны 365 нм) и показателю $R_f = 0,83$, значение которого согласуется с показателями R_f , приведенными в литературе при использовании данной элюирующей системы [2].

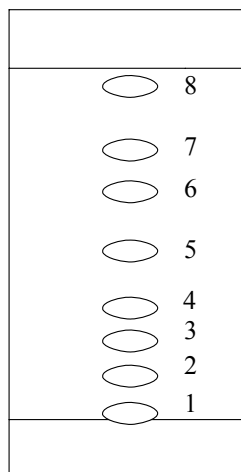


Рис. 1. Типичная тонкослойная хроматограмма экстракта зверобоя в элюирующей системе V

Таким образом, в результате анализа гиперидинсодержащих экстрактов методом ТСХ было установлено, что исследуемые экстракты состоят из 8 основных компонентов.

Показатели R_f для всех компонентов этанольного экстракта приведены в табл. 1. Результаты представлены как среднее арифметическое трех параллельных опытов с учетом стандартного отклонения.

Таблица 1
Величины R_f для компонентов гиперидинсодержащего экстракта

Вещество	R_f
8	$0,97 \pm 0,01$
7 (гиперидин)	$0,87 \pm 0,02$
6 (псевдогиперидин)	$0,83 \pm 0,02$
5	$0,65 \pm 0,02$
4	$0,42 \pm 0,02$
3	$0,34 \pm 0,02$
2	$0,12 \pm 0,02$
1	$0,020 \pm 0,006$

Количественное содержание гиперидинов в экстракте определялось методом ВЭЖХ при помощи хроматомасс-спектрометра «Waters Micro-mass ZQ 2000» с использованием колонки BDS HYPERSIL C18 250×4,6 мм, детектирование осуществляли диодно-матричным детектором при длине волны 590 нм и масс-детектором с электро-спрей-ионизацией. Элюирование проводили в линейном градиенте при использовании системы, состоящей из ацетонитрила (раствор А) и 0,01 М водного раствора ацетата аммония (раствор Б) (А : Б: 0 мин – 15 : 85; 0–5 мин – 30 : 70; 5–10 мин – 45 : 55; 10–15 мин – 60 : 40; 15–20 мин – 75 : 25; 20–40 мин 90 : 10) со скоростью протока 1 мл/мин.

Гиперидин в экстрактах идентифицировали на хроматограмме (рис. 2, а) по времени удержания 35,95 мин, что совпадало со временем удержания стандартного образца гиперидина.

В масс-спектрах данного соединения наблюдались сигналы, соответствующие молекулярным ионам гиперидина с $m/z = 503,66$ в области отрицательных ионов и с $m/z = 505,64$ в области положительных ионов (рис. 2, б).

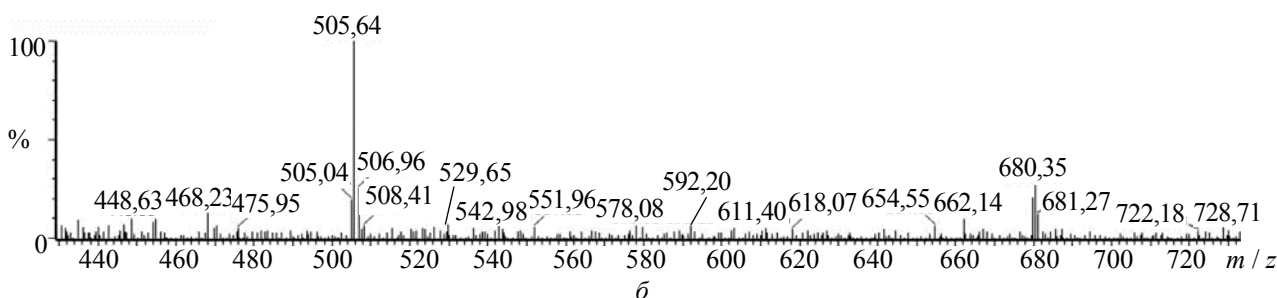
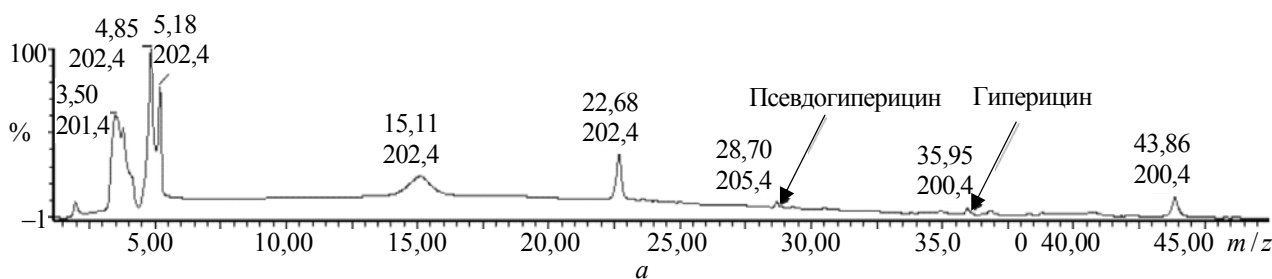


Рис. 2. ВЭЖХ хроматограмма экстракта зверобоя (а), масс-спектр гиперидина в области положительных ионов (б)

Псевдогиперицин в экстрактах был идентифицирован по масс-спектру в области отрицательных ионов, где наблюдался сигнал с $m/z = 519,63$, соответствующий иону $[M-H]^-$ для соединения с молекулярной формулой $C_{30}H_{16}O_9$. В области положительных ионов для псевдогиперицина также наблюдался молекулярный ион $[M+H]^+$ с $m/z = 521,61$. Было выявлено, что в данных условиях проведения ВЭЖХ-анализа псевдогиперицин имел более короткое время удержания по сравнению с гиперацином – 28,7 мин.

Электронный спектр псевдогиперицина был аналогичен спектру гиперацина, где наблюдалась полоса с максимумом поглощения 590 нм, что характерно для конденсированных производных антрохинона.

Количественное определение гиперацина в зверобое осуществляли методом калибровочного графика, построенного по растворам стандартного образца гиперацина (уравнение прямой $y = 328\,775x - 2\,785\,034$, $R^2 = 0,962068$).

Для получения гиперацинобогатых фракций было проведено препаративное разделение экстракта зверобоя с помощью хроматографического метода. Разделение экстракта осуществляли на сорбенте Diaion HP-20, элюирование проводили с использованием водного этанола в возрастающей концентрации (0, 20, 40, 60, 80 и 100%), а также смесью этанола и хлороформа (1 : 1).

Фракции, полученные после разделения, анализировали на спектрофотометре, в результате чего был построен профиль элюирования, представленный на рис. 3.

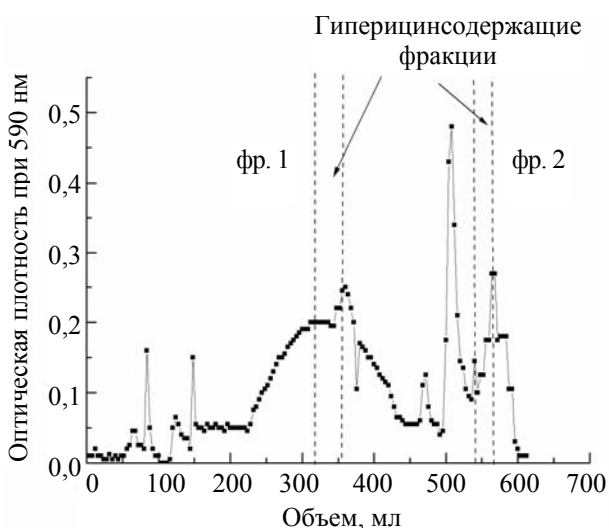


Рис. 3. Профиль элюирования на сорбенте Diaion HP-20

В результате ТСХ-анализа фракций, соответствующих пикам профиля, было выявлено, что гиперацинобогатые фракции выходили с колонки при элюировании 80%-ным водным этанолом объемом 304–356 мл (фр. 1), а также при элюировании смесью этанола с хлороформом в объеме 540–564 мл (фр. 2). Результаты ВЭЖХ-анализа полученных фракций представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты разделения гиперацинобогатого экстракта на сорбенте Diaion HP-20

Фракция	Содержание гиперацина в исходном экстракте, %	Выход фракции по отношению к введенному экстракту, %	Содержание гиперацина во фракции, %
1	0,081	9,98	0,34
2		14,20	0,13

Как видно из табл. 2, разделение экстракта зверобоя на сорбенте Diaion HP-20 дает возможность обогатить гиперацинами исходный экстракт более чем в 4 раза, что подтверждает целесообразность разделения гиперацинобогатого экстракта на данном сорбенте. Вместе с тем чистота фракций, полученных при хроматографическом разделении этанольного экстракта гиперацина, не является достаточно удовлетворительной. Поэтому для дальнейшего использования гиперацинов в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии необходимо провести дополнительные исследования, касающиеся очистки и обогащения гиперацинобогатых экстрактов.

Заключение. Подобраны оптимальные условия для проведения ВЭЖХ и ТСХ анализов. Проведено хроматографическое разделение экстракта зверобоя на сорбенте Diaion HP-20, которое дало возможность обогатить исходный экстракт гиперацинами более чем в 4 раза.

Литература

- Karioti, A. Hypericins as potential leads for new therapeutics / A. Karioti, A. R. Bilia // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – Vol. 11. – P. 562–594.
- Китанов, Г. М. Фитохимическое изучение и анализ видов *Hypericum L.*, произрастающих в Болгарии / Г. М. Китанов // *Растительные ресурсы.* – 1988. – Т. 24.1. – С. 114–121.

Поступила 19.03.2012