



УДК. 544:615.322

Сравнительный хроматографический анализ фракционного состава фитопрепаратов растений рода копеечник

Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В.

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово

Поступила в редакцию

Аннотация

Методами жидкостной колоночной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии проведен сравнительный анализ летучих компонентов фракций содержащихся в фитопрепаратах растений рода Копеечник. Производные октогидрофенантрена предложено в качестве реперного биологически активного вещества для идентификации фитопрепаратов из Копеечников чайного и забытого.

Ключевые слова: жидкостная колоночная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, фитопрепараты

Methods liquid columnar chromatography and chromat-mass spectrometry carry out the comparative analysis of flying components of fractions of plants of a sort of Hedysarum containing in phytopreparations. Derivatives octohydrofenantrens is offered in quality reперного biologically active substance for identification of phytopreparations from Hedysarum tea and forgotten.

Keywords: liquid columnar chromatography, chromat-mass spectrometry, phytopreparations

Введение

Род копеечник (*Hedysarum*) относится к семейству бобовых (Fabaceae) и является ценным лекарственным растением [1]. Экстракты корней копеечников чайного (*H. theinum*) и забытого (*H. neglectum*) применяются при воспалении предстательной железы, острых и хронических нефрологических и неврологических заболеваниях [2]. Тонизирующие свойства данных растений обуславливаются высоким содержанием в корнях фенольных соединений. Было выявлено несколько фенольных компонентов катехиновой и лейкоантоциановой структуры [3], которые, как известно, обладают Р-витаминной активностью.

Для выделения биологически активных веществ (БАВ) из растений рода *Hedysarum* широко используются различные хроматографические методы. Метод жидкостной колоночной хроматографии успешно применяется как в России, так и в зарубежных странах [4,5]. Для разделения экстрактов в качестве сорбентов используются Sephadex LH-20, Sephadex G-10, Sepharose 4B, полиамид, Silica gel L 40/100. Ранее нами опубликованы экспериментальные данные о применении перешитых полисахаридных гелей в исследовании БАВ копеечников. [6].

Эксперимент

В режиме гелепроникающей хроматографии на хроматографической колонке с сорбентом Sepharose CL-4B и использованием различных систем элюирования были получены 2-3 ключевых пиков и 2-4 пика минорных компонентов. По нашим данным, ключевыми БАВ являются конденсированные танины. [7] Также впервые проведено сравнение сефадекса LH-20 и его химически модифицированного аналога (СФД-20-БЭП-гСК-пНАН) в котором качестве лиганда-модификатора использован *n*-нитроанилин. При хроматографии ФП Копеечника забытого с применением тетробората натрия в качестве элюента [8]. Выделение и обнаружение ключевых БАВ из водноспиртовых экстрактов *H. theinum* и *H. neglectum* проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Сорбфилл» в системах растворителей *n*-бутанол—этанол—вода (13:7:2) и хлороформ—метанол—вода (13:7:2). Реактивы обнаружения: 20% раствор H_2SO_4 , $CuSO_4 / HCl$, $FeCl_3$. Полученные данные показали наличие в фитопрепаратах (ФП) как высокомолекулярных полифенолов ($R_f < 0,3$), так и низкомолекулярных соединений фенольного характера ($R_f > 0,3$) [9]. Целью данной работы является определение химического состава ключевых пиковых фракций ФП *H. theinum* и *H. neglectum* методом ГЖХ-МС.

Объектами исследования в настоящей работе являлись водно-спиртовые ФП, полученные из корней *H. theinum* и *H. neglectum* по оригинальной авторской методике (решение о выдаче патента на изобретение от 24.05.2010). Хроматографирование 0,4 мл изучаемых ФП проводили в режиме гелепроникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографической колонке (0,5 x 80 «Pharmacia», Швеция), наполненной 7-8мл Sepharose CL-4B (сф. CL-4B, «Pharmacia», Швеция). В условиях градиентного элюирования: вода дистиллированная (5мл), спирт этиловый (1:1 – 5мл) и отмывка 0,01М, и 0,1М NaOH (режим Б). Скорость элюирования – 0,2-0,3 мл/мин, объем собираемых фракций – 1мл. Детектирование проводили на длине волны 240нм (сф – 26, Россия. УФ-спектры ключевых (пиковых) хроматографических фракций при соответственном разведении, снимали в диапазоне 220-360нм на СФ-2000 (Россия). Полученные пиковые фракции далее были изучены методом ГЖХ-МС на приборе: хромато-масс-спектрометр Finnigan Trace DSQ (США), колонка TR-ms, газ-носитель гелий (скорость потока 5мл/мин.). Термические параметры хроматографирования: начальная температура - 50⁰С (выдержка 5 мин.), конечная – 340⁰С (выдержка 10 мин.), скорость нагрева 10⁰С в минуту. Объем пробы ФП, вводимый в хроматограф – 10мк/л.

Результаты и их обсуждение

В продолжение сравнительного изучения химического состава ФП копеечников чайного и забытого, нами в режиме гелепроникающей хроматографии на Sepharose CL-4B в условиях градиентного элюирования (режим Б) показано наличие 5-6 пиков ключевых и минорных компонентов ФП (см. рис. 1).

Ранее нами методом фитохимического скрининга были обнаружены в I ключевом пике группа полисахаридов (реакции с α -нафтолсерной кислотой, $Cu(OH)_2$ и др.), в III ключевом пике - олигомерные танины (реакции с $FeCl_3$, 1% раствором желатины) [9].

Спектры в УФ области у ключевых пиковых фракций однотипны, имеют относительно слабые полосы поглощения в зоне λ 265-280нм и являются подобными УФ-спектрам конденсированных танинов (см. рис. 2).

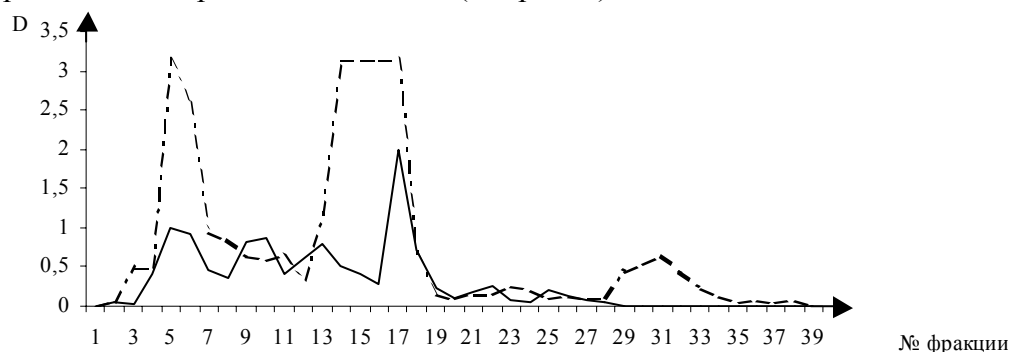


Рис. 1. Хроматограммы БАВ ФП Копеечника чайного и копеечника забытого. где: линия (—) соответствует ФП К. чайный; (---) ФП К. забытый.

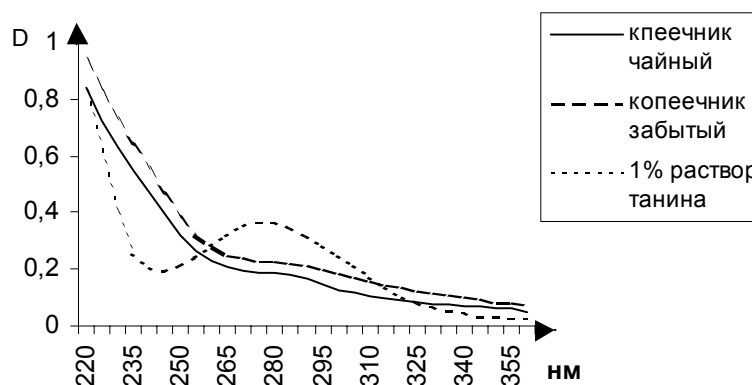


Рис. 2. УФ-спектры ключевых пиковых фракций.

Методом ГЖХ-МС, был изучен состав летучих компонентов выделенных пиковых фракций ФП (см. табл. №1, №2). Интересно, что I, II и III ключевые пики исследуемых ФП, кроме II пика ФП *H. neglectum* (не идентифицирован из-за малой концентрации веществ), показывают наличие только алифатических соединений (2,6,10-триметилтетрадекан, гексадеканол-2 и др.). Остальные фракции, включая минорные, наряду с алифатическими, содержат группу ароматических соединений – производные нафталина, фенантрена и др. На наш взгляд, наличие в достаточно большом количестве в ФП *H. theinum* и *H. neglectum* 4а-метил-1-метилден-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрена, позволяет считать его основным реперным компонентом для данных видов копеечника см. рис. (3 - а). Интересно отметить, что в V пике ФП *H. neglectum* обнаружено серосодержащее производное – 1,1-диметилтетрадецилгидросульфид (см. рис. 3-б). Однако по данным обзора [10], серосодержащие компоненты в растениях рода копеечник ранее не были найдены.

Таким образом, можно считать, что данное вещество обнаружено нами в растениях рода *Hedysarum* впервые. Интересно, что в VI пике ФП *H. theinum* найдено азотсодержащее алкалоидо-подобное соединение семеричной структуры (см. Рис. 3-в).

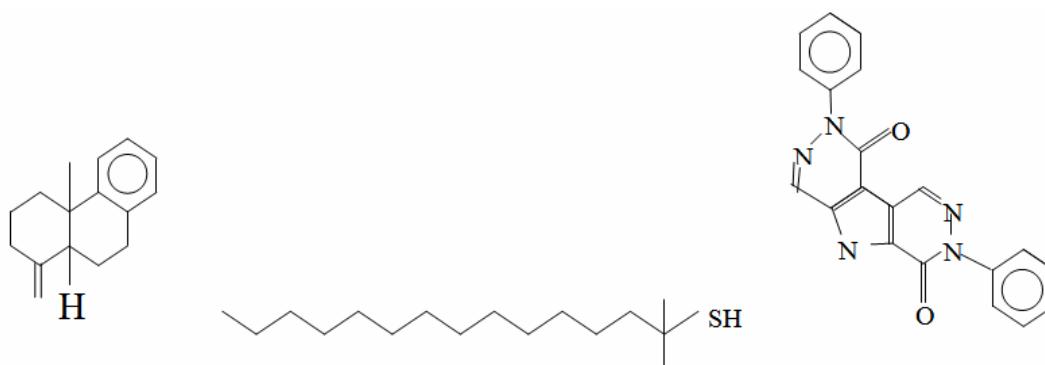


Рис. 3. а) 4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен; б) 1,1-диметилтетрадецилгидросульфид; в) 2,7-дифенил-1,6-диоксопирадазино[4,5:2',3']пирроло[4',5'-d]пиридазин.

Таблица 1. Фракционный состав летучих компонентов фитопрепарата *H. theinum*

пик	Время удерживания (мин/сек)	идентифицированное соединение
пик I	18.11	5-(1-[2-(2-бутоксиэтокси)этокси]бутил)-1,3-бензодиоксол
пик II	22.98	2-[(триметилсилил)окси]-1-[[триметилсилил)окси]метил]этиловый эфир октадектриеновой кислоты (Z,Z,Z)
пик III	17.73 20.29-26.13	2,6,10-триметилтетрадекан; гексадеканол-2
пик IV	19.79-21.11 19.99 28.39	2,6-диизопропилнафталин; 4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен; 3,7,11-триметил-1-додеканол;
пик V	15.32-16.89 17.02 17.70 17.73 17.81 23.44-23.64	гексадеканол-2; 3-этил-5-(2'-этилбутил)октадекан; (2-фенил-1,3-диоксолан-4-ил)метил(9E)-9-октадеценат; ретиаль; 4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен; ол-транс-сквален
пик VI	15.32 15.37 16.87 17.02-17.70 19.89 21.31 23.01 25.52 26.71 28.16 28.90	2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил)-пропанат; 2,7-дифенил-1,6-диоксопирадазино[4,5:2',3'] пирроло[4',5'-d]пиридазин; 2,6-диизопропилнафталин; 4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-Октагидрофенантрен; Бутилтетрадецилфталат; Бутилундецилфталат; 1-пропилпентиллаурат; 3-этил-5-(2'-этилбутил)октадекан; Диоктиловый эфир гександиовой к-ты Октадециловый эфир пальмитиновой кислоты; Моно(1-этилгексил)фталат

Данные растения отличаются по типу фитостероидов – производное андрогена найдено в копеечнике чайном (VI пик), а производное эстрогена в копеечнике забытом (V пик). Также в V минорном пике ФП обнаружены некоторые витамины: *H. theinum* - ретиналь (витамин А), *H. neglectum* - 24,25-дигидроксихолекальциферол (производное витамина D₃).

Таблица 2. Фракционный состав летучих компонентов ФП *H. neglectum*

пик	время удерживания (мин/сек)	идентифицированное соединение
пик I	21.18	гексадеканол-2;
пик II	-	-
пик III	17.70	2,6,10-триметилтетрадекан;
пик IV	17.98	2-метилгексадекан-1-ол;
	21.03	4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен;
	28.34	1,2,3-пропанитрилдокозагексаинат
пик V	13.27	1,1-диметилтетрадецилгидросульфид;
	17.83	24,25-дигидроксихолекальциферол;
	21.36	Эстра-1,3,5(10)-триен-17-β-ол;
	23.62	2,2,4-триметил-3-(3,8,12,16-тетраметил-гептадека-3,7,11,15-тетраэтил)-циклогексанол;
пик VI	15.35	гексадеканол-2;
	17.02	4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен;
	17.73	2,6-диизопропилнафталин;
	23.03	3,7,11-триметил-1-додеканол (гексагидрофарнезол);
	25.50	1,2,3-пропанитрилдокозагексаинат;
	26.71	2,3-бис-[(триметилсилил)окси]пропил-9,12-октадекадиенат;

К совпадающим растительным БАВ в данных видах копеечников относятся: 2,6,10-триметилтетрадекан; гексадеканол-2; 2,6-диизопропилнафталин; 4а-метил-1-метилен-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен и 3,7,11-триметил-1-додеканол. Таким образом, данный метод является одним из важнейших для поиска и обнаружения наиболее специфических растительных БАВ фитопрепаратов на основе Копеечников, в том числе и некоторых реперных соединений (производных октогидрофенантрена). Исследования в данном направлении продолжаются.

Список литературы

1. Флора Сибири Fabaceae (Leguminosae). Под ред. Положия А.В., Малышевой Л.И.-Новосибирск.: Наука.-1994.-Т.9.-С.280.
2. Минаева В. Г. Лекарственные растения Сибири //Новосибирск. Наука. 1991, С. 273-274.
3. Красноборов И. М., Азовцев Г. Р., Орлов В. П. Новый вид рода *Hedysarum* (Fabaceae) из Южной Сибири // Ботанический журнал. 1985. Т. 70. № 7. С 968-973.

4. Hai-L.Q., Liang H., Zhao Y.Y., Du N.S. Studies on chemical constituents in the root of *Hedysarum polybotrys*. // *Zhongguo-Zhong-Yao-Za-Zhi*. 2002 Nov; 27(11): 843-5.
5. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И. Исследование химического состава копеечника щетинистого (*Hedysarum stigerum*) // Тезисы II Всероссийская конференция Химия и технология растительных веществ, Казань, 24.27 июня 2002 г
6. Кузнецов П.В., Сухих А.С., Федорова Ю.С. К проблеме стандартизации качества некоторых фитопрепаратов из различных видов копеечника // Вестник РАЕН (ЗСО). 2009. Вып. 11. С. 185-189.
7. Федорова Ю.С., Кузнецов П.В., Сухих А.С. Особенности хроматографирования фракций фитопрепарата из копеечника забытого на полисахаридном адсорбенте сефароза CL-4В // Медицина в Кузбассе. 2009. Вып. 7. С. 72-73.
8. Кузнецов П.В., Фёдорова Ю.С. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XXVII. К феномену хроматографического разделения фитопрепаратов копеечника забытого на сефадексе LN-20 и его химически модифицированном аналоге // Ползуновский вестник. 2009. № 3. С. 338-340.
9. Федорова Ю.С. Кузнецов П.В. Сравнительный фитохимический анализ биологически активных веществ некоторых фитопрепаратов рода *Hedysarum*. / Вестник Российской Академии естественных наук (ЗСО). 2010.-183-186с.
10. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.Н., Семенов А.А. Компонентный состав видов рода *Hedysarum* (Fabaceae) // Раст. ресурсы. Вып.4. 2004. С. 111-137.

Федорова Юлия Сергеевна - аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», Кемерово

Сухих Андрей Сергеевич - к.фарм.н., ст. научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Кемерово

Кузнецов Петр Васильевич - д.фарм.н., проф. зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ГОУ ВПО КемГМА, Кемерово

Fedorova Julia S. – Postgraduate student, faculty of pharmaceutical and toxicological chemistry state medical academy Kemerovo, Kemerovo

Sukhikh Andrey S. - The candidate of pharmaceutical sciences, the senior scientific employee of Central Scientifically research laboratory state medical academy Kemerovo, Kemerovo

Kuznetsov Petr V. - The doctor of pharmaceutical sciences, the professor managing faculty of pharmaceutical and toxicological chemistry state medical academy Kemerovo, Kemerovo