

5. Шиловский Б.И., Эфрос А.Л. Электронные свойства легированных полупроводников. М.: Наука, 1979. 416с.

Новикова Виктория Васильевна - аспирант 1 года обучения, ВГУ, Воронеж

Стародубова Светлана Павловна - Магистрант 1 года обучения, ВГУ, Воронеж

Чайка Михаил Юрьевич - Старший научный сотрудник кафедры физической химии, ВГУ, Воронеж

Кравченко Тамара Александровна - д.х.н., профессор. ВГУ, Воронеж

Novikova Viktoria V. - year post-graduate courses, Voronezh State University, Voronezh

Starodubova Svetlana P. - Master student 1 year, Voronezh State University, Voronezh

Chayka Mikhail Ju. - Senior member of staff of physical chemistry department, Voronezh State University, Voronezh

Kravchenko Tamara A. - Doctor of chemical sciences, professor, Voronezh State University, Voronezh



УДК 582:615.322

Ключевые биологически активные вещества фитопрепаратов на основе растений рода Копеечник

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

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово

Поступила в редакцию 8.09.2010 г.

Аннотация

Комплексом хроматографических методов с использованием высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и газожидкостной хроматографией с масс-спектрометрической детекцией (ГЖХ-МС), определены основные типы биологически активных веществ содержащиеся в фитопрепаратах приготовленных на основе некоторых видов Копеечников (К. забытый, К. чайный, К. альпийский).

Ключевые слова: биологически активные вещества, растения рода Копеечник

The complex chromatography methods with use of highly effective liquid chromatography (HPLC) and газожидкостной a chromatography with mass spectrometer детекцией (GLC-MS), defines the basic types of biologically active substances containing in phytopreparations prepared on the basis of some kinds Hedysarum (*H. neglectum*, *H. theinum*, *H. alpinum*).

Keywords: biologically active substances, plants of a sort of Hedysarum

Введение

Сегодня в мировой практике лекарственное растительное сырье и фитопрепараты из различных видов Копеечника (род *Hedysarum* сем. *Fabaceae*) содержат уникальный компонентный состав различных типов растительных БАВ. Среди них, по данным [1], среди первичных метаболитов определены: аминокислоты, углеводы, липиды, жирные кислоты. Среди вторичных метаболитов найдены:

терпены, флавоноиды, изофлавоноиды, ксантоны и их аналоги, дубильные вещества, фитостероиды, серу – и азот- содержащие органические вещества. Однако, ввиду большого видового разнообразия рода Копеечник, стандартизация по ключевым компонентам БАВ, типа используемого сырья для получения фитопрепаратов затруднена. В последние годы в аптечной сети России присутствуют фитопрепараты, содержащие не только цельное лекарственное растительное сырьё (корни, корневища и др.), и индивидуальные вещества (препарат «Алпизарин» на основе К. альпийского), а так же суммарные и комбинированные. Большая часть фитопрепаратов из растений копеечника рекомендована пока только для использования в виде биологически активных добавок. Это обусловлено отсутствием расширенных исследований о качественном и количественном составе ключевых компонентов в различных видах растений рода Копеечник. Такая ситуация делает невозможным проведение расширенных фармакологических исследований. Поэтому целью работы является исследование комплексом хроматографических методов компонентного состава фитопрепаратов полученных на основе различных видов Копеечника (К. забытый (*H. neglectum*), К. чайный (*H. theinum*), К. альпийский (*H. alpinum*)).

Эксперимент

Исследуемые ФП получены по оригинальной авторской технологии (решение о выдаче патента РФ на изобретение от 24.05.2010г.) из аптечных образцов корней копеечника чайного (*H. theinum*), копеечника забытого (*H. neglectum*) и травы копеечника альпийского (*H. alpinum*).

Фитопрепараты были изучены методом ГЖХ-МС на приборе: хромато-масс-спектрометр Finnigan Trace DSQ (США), колонка TR-ms, газ-носитель гелий (скорость потока 5м/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. Подготовка пробы: раствор образца разбавляли в ацетонитриле 2:5. Анализ ВЭЖХ проводили на приборе системы Альянс («Waters») с детектором с фотодиодной матрицей на колонке Alliance C18 (4,6 x 150), 5 мкм в режиме элюирования: 0,1% об ортофосфорная кислота: ацетонитрил (78:22). Скорость потока – 1мл/мин., объем инъекции – 20 мкл, температура колонки – 30⁰С. Подготовка пробы: раствор образца разбавляли в 5 раз 50% этиловым спиртом. Хроматографическая идентификация найденных БАВ проводилась с образцами свидетелей.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано [2], что по данным фитохимического скрининга основной ключевой компонент изученных ФП *H. theinum* и *H. neglectum* – олигомерные танины (осаждение 1% раствором желатина, чёрно-зелено-синие окраски с Fe(III) и др.). Их выделение и очистка проводилась нами методом жидкостной колоночной хроматографии на гелях: сефадекс LH-20 и его химически модифицированном аналоге [3]. Известно, что ГЖХ-МС - современный метод исследования летучих компонентов разнообразных растительных экстрактов, настоек. С помощью данного метода из гексанового экстракта корней *H. theinum* были идентифицированы жирные кислоты, изофлавоноиды – медикарпин, веститол, формонетин; тритерпеновые соединения,

основными из которых являются β -ситостерол и стигмаст-4-ен-3-он; фенольные соединения ряда бутилфенола [4]. По данным обзора [1] растительные биологически активные вещества (рБАВ) следующих видов копеечника - *H. neglectum*, *H. theinum*, *H. alpinum*, изучены не достаточно. Уже первичное изучение наших ФП из *H. neglectum* и *H. theinum* методом ГЖХ-МС показало высокую актуальность его применения для обнаружения ключевых рБАВ в летучих фракциях.

В настоящей работе в условиях ГЖХ-МС анализа определены следующие летучие фракции ФП: в копеечнике забытом из 34 значимых хроматографических фракций определено 17; в копеечнике чайном из 26 значимых фракций – также 17 фракций. Среди идентифицированных в обнаруженных в ФП БАВ на основе Копеечника забытого: 2-фенил-1,3-диоксолан-4-ил) метиловый эфир (9E)-9-октадеценат (14,48 мин/сек); эстра-1,3,5(10)-триен-17- β –ол (15,12 мин/сек); 1-гептатриакотанол (16,44 мин/сек); 4-(4-гидроксифенил)-2-бутанон (17.45 мин/сек); 4-гидрокси- α – метил – бензенпропанол(17.73 мин/сек); дифенилкетон(19.15 мин/сек); этил α -d-глюкопиранозид(19.43 мин/сек); D-манноза (20.75 мин/сек); Бутилундециловый эфир фталевой кислоты(24.02 мин/сек); 2-гексадеканол (24.38 мин/сек); Эстра-1,3,5(10)-триен-17- β -ол(26.08 мин/сек); Этиловый эфир пальмитиновой кислоты(26.54 мин/сек); Этанол-2(9,12)-октадекадиениокси (ZZ) (27.86 мин/сек); 9,12-октадекадиеновая кислота (ZZ) (29.45 мин/сек); Этиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты(29.8 мин/сек);12-моно-олеин(29.9 мин/сек); 4,10-дигидрокси-5,7-диметокси-2,3-диметил-1,4-антрацинидион (30.39 мин/сек).

Исходя из полученных данных на перспективу можно рекомендовать дальнейшее изучение разнообразных производных эстра-1,3,5(10)-триен-17- β -ола, как новых производных обнаруженных нами фитостероидов. Данная группа рБАВ также обнаружена в ФП Копеечника чайного. Среди определенных: 6-[7-нитробензофуразан-4-ил] аминок-морфинан-4,5-эпокси-3,6-ди-ола (как сумма минорных компонентов) (4.00-16.00 мин/сек); 2-бромтетрадекановой кислоты (как сумма минорных производных 4.00-16.00 мин/сек); 4-(4-гидроксифенил)-2-бутанон (17.45 мин/сек); 4-(p-гидроксифенил)-2-бутанол (17.76 мин/сек); Этил- α -d-глюкопиранозид(19.20 мин/сек); 2,6-диизопропилнафталин (19.74 мин/сек); 2,6-диизопропилнафталин (19.91 мин/сек); эстра-1,3,5(10)-триен-17- β -ол (20.45 мин/сек); эстра-1,3,5(10)-триен-17- β –ол(20.50 мин/сек); 3-О-метил- d-глюкоза (20.50 мин/сек); 2,6-диизопропилнафталин(20.95 мин/сек); тетрадекановая кислота(21.84 мин/сек); n-гексадекановая кислота (25.98 мин/сек); нитрил олеиновой кислоты(26.54 мин/сек); 3-этил-5-(2-этилбутил)-октадекан(31.54 мин/сек); 3-этил-5-(2-этилбутил)-октадекан (34.81 мин/сек); производное сквалена: 2,6,10,15,19,23-гексаметил-(ол-E)-2,6,10,14,18,22-тетракозагексан (37.53 мин/сек). Интересно, что в копеечнике альпийском не обнаружены рБАВ из группы фитостероидов. Однако в нем, по нашим данным, содержится наибольшее количество эфиров карбоновых кислот. Определяемые летучие компоненты, содержащиеся в ФП на основе К. альпийского представлены следующими веществами: 3-метилбутиловый эфир муравьиной кислоты (5.27 мин/сек); 3-(3-аминобензамидо)-1-(2,4,6-трихлорфенил)-2-пиразолин-5-он(8.29 мин/сек); 2,4-диметоксифенол (11.87 мин/сек); D-манноза (20.83 мин/сек); этил α -d-глюкопиранозид(21.71 мин/сек); 3-О-метил- d-глюкоза (24.00 мин/сек); 4,4-этилендиокси-1-пентиламин (25.37 мин/сек); n-гексадекановая кислота (26.46 мин/сек); этиловый эфир пальмитиновой кислоты (26.92 мин/сек); линоленовая кислота (29.99 мин/сек); этил [9E,12E]-9,12октадека-диенат (30.19 мин/сек); этиловый эфир линоленовой кислоты (30.34 мин/сек); этил-15-метилгептадеканат (30.77 мин/сек).

Наибольшее совпадение найденных соединений (этил α -D-глюкопиранозид, D-манноза, этиловый эфир пальмитиновой кислоты, этиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты) обнаружено в ФП *H. neglectum* и ФП *H. alpinum*; наименьшее – в ФП *H. alpinum* и *H. theinum* (3-O-метил-D-глюкоза, н-гексадекановая кислота).

В составе полученных нами ФП копеечников чайного, забытого и альпийского методом ВЭЖХ обнаружены следующие типы БАВ: жирные и оксикоричные кислоты, ксантоны, флавоноиды и дубильные вещества. Полученные экспериментальные данные приведены в таблицах 1 и 2. Так, в ФП 1 отмечено отсутствие капроновой и лауриновой кислот, в ФП 2 – каприновой и γ -линоленовой кислот, в ФП 3 найдено наименьшее количество жирных кислот, при этом отсутствуют: капроновая, лауриновая, гадолеиновая и пальмитолеиновая кислоты (см. табл. №1).

Таблица 1. Состав жирных кислот в исследуемых фитопрепаратах *H. theinum*, *H. neglectum*, *H. alpinum*.

	идентифицированные соединения	ФП 1	ФП 2	ФП 3
1.	капроновая кислота	—	+	—
2.	каприловая кислота	+	+	+
3.	каприновая кислота	+	—	+
4.	лауриновая кислота	—	+	—
5.	миристиновая кислота	+	+	+
6.	пальмитиновая кислота	+	+	+
7.	пальмитолеиновая кислота	+	+	—
8.	стеариновая кислота	+	+	+
9.	олеиновая кислота	+	+	+
10.	линолевая кислота	+	+	+
11.	γ -линоленовая кислота	+	—	+
12.	α -линоленовая кислота	+	+	+
13.	гадолеиновая кислота	+	+	—

Поэтому вполне можно считать, что отсутствие вышеуказанных жирных кислот у ФП 3 и наличие их в ФП 1 и ФП 2 является их дифференцирующим признаком, а данные кислоты, на наш взгляд, можно отнести к реперным БАВ (рБАВ). Интересно, что только у ФП 2 (см. табл. 2) содержится одна реперная оксикислота – хлорогеновая. Отсутствие флавоноидов рутина и кверцетина характерно только для ФП 1 и ФП 2, а в ФП 3 – практически не содержатся дубильные вещества. Интересно, что разделение на виды *H. theinum* и *H. neglectum* на сегодня затруднено, из-за отсутствия четких систематических морфологических признаков, так как в природных популяциях одновременно встречаются особи с бурым (красным), белым и розовым корнями. По данным литературы считается, что бурый корень – это основной диагностический признак, характерный для представителей вида *H. theinum* [5]. Поэтому, для определения вида данных растений до настоящего времени применяется трудоемкий метод SDS-электрофореза [5].

Таблица 2. Содержание вторичных метоболитов в фитопрепаратах

Идентифицированные соединения	ФП 1	ФП 2	ФП 3
Дубильные вещества			
Галловая кислота	+	+	+
Эпигаллокатехин	+	+	—
Катехин	+	+	—
Эпикатехин	+	+	—
Флавоноиды			
Дандзин	+	—	+
Гиперозид	+	+	+
Рутин	—	—	+
Кверцетин	+	—	+
Ксантоны			
Мангиферин	+	+	+
Изомангиферин	+	+	+
Оксикоричные кислоты			
Цикоревая кислота	+	—	+
Кофейная кислота	+	—	+
Хлорогеновая кислота	+	+	+
Неохлорогеновая кислота	+	—	—

Заключение

В заключении отметим, что полученные данные, к сожалению, могут варьировать из-за отсутствия стандартизированного аптечного сырья копеечников чайного и забытого, однако известно, что эти два вида успешно культивируются [6]. Известно также, что для получения природных лекарственных веществ из копеечников (*H. alpinum*, *H. neglectum*, *H. theinum*) применяется метод культивирования тканей *in vitro* [7].

Таким образом, найденные отличия химического состава изученных нами ФП могут быть рекомендованы для видовой дифференциации *H. theinum* и *H. neglectum*.

Так, наличие неохлорогеновой, хлорогеновой, цикоревой и кофейной, оксикоричных кислот, а также флавоноидов: дандзина и гиперозида и ряда жирных кислот (кроме капроновой и лауриновой), свойственно только для копеечника чайного. Копеечник забытый, напротив, характеризуется присутствием только одной хлорогеновой кислоты, флавоноидом гиперозидом, и отсутствием жирных кислот - каприновой и γ -линоленовой.

Список литературы

- 1.Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И. Семенов А.А. Компонентный состав видов рода *Hedysarum* (*Fabaceae*).// Растит. Ресурсы . 2004. Т.40. Вып. 4. С. 111-137.
- 2.Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Сравнительный фитохимический анализ биологически активных веществ некоторых фитопрепаратов рода *Hedysarum* / Вестник РАЕН (ЗСО). 2010.- С.183-186.
- 3.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 LH-20 и его химически модифицированном аналоге. // Ползуновский вестник. № 3. 2009. С. 338-340.

4. Сальникова О.И., Покровский Л.М., Нечепуренко И.В., и соавт. Изучение химического состава корней копеечника чайного с помощью хромато-масс-спектрометрии // Материалы II Всероссийской конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул. 2005. С. 452- 455.

5. Конарев В. Г., Гаврилюк И. П., Губарева Н. К. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. // М.:, Колос. 1993. 250с.

6. Карнаухова Н.А. Особенности развития *Hedysarum teinum* (Fabaceae) в природных условиях и при интродукции в центральный сибирский ботанический сад (г. Новосибирск) // Раст. ресурсы. 2007. Вып. 3. С. 14-24.

7. Н.С.Ляпкина, Н.В.Хадеева, С.С.Шаин, А.Н.Майсунян Разработка методов культивирования тканей копеечника in vitro / Биотехнология. 1999. №1. С. 55-61.

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



УДК 544

Повышение эффективности электродиализной деминерализации молочной сыворотки

Кулинцов П.И.¹, Бобринская Г.А.¹, Селеменев В.Ф.¹,
Гаршина Т.И.², Агупова М.В.¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж

²ООО «Инновационное предприятие «Щекиноазот», Щекино

Поступила в редакцию 2.07.2010 г.