

На правах рукописи



Милевская Виктория Васильевна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ
АНТИДЕПРЕССАНТНОГО И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Краснодар

2017

Работа выполнена на кафедре аналитической химии факультета химии и высоких технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Научный руководитель: **Темердашев Зауаль Ахлоович** –
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Шпигун Олег Алексеевич** –
чл.-корр. РАН, доктор химических наук,
профессор МГУ имени М.В. Ломоносова

Якуба Юрий Федорович -
доктор химических наук, доцент,
ФГБНУ СКФНЦСВВ

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Самарский национальный исследовательский
университет имени академика С.П. Королева»

Защита диссертации состоится 07 декабря 2017 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.101.16 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последние годы растет количество исследований, посвященных определению основных компонентов в лекарственных травах и препаратах на их основе. Это связано с наличием в их составе соединений фенольного происхождения, проявляющих целый спектр свойств биологической активности, что повсеместно используется в медицине. Лекарственные растения семейств Зверобойные (*Hypericaceae*) и Яснотковые (*Laminaceae*) – одни из активно используемых в фитотерапии материалов. Семейство Зверобойных *Hypericaceae* связывают, прежде всего, с травой зверобоя *Hyperici herba*, а именно вида *Hypericum perforatum* L., который описан в Фармакопее РФ. Представителями семейства Яснотковые *Laminaceae* являются растения рода шалфей *Salvia*, чабрец *Thymus*, душица *Origanum*, мелисса *Melissa* и другие.

С совершенствованием аналитических возможностей значительно расширяется круг определяемых соединений и повышается надежность процедуры идентификации биологически активных веществ (БАВ) в лекарственном растительном сырье (ЛРС). Наиболее часто для этих целей используют методы жидкостной хроматографии в совокупности с другими способами детектирования (УФ, ИК, ЯМР, МС), однако таких работ встречается крайне мало, и они во многом носят противоречивый характер. Для определения БАВ фенольного ряда в различных растениях семейств Яснотковых и Зверобойных часто используют или методы суммарного определения фенольных кислот и флавоноидов, или метод жидкостной хроматографии с детектированием в УФ и видимой области без привлечения других способов детальной их идентификации, что снижает достоверность и информативность проведенного анализа. Поэтому требуется построение надежных схем идентификации БАВ в объектах растительного происхождения, причем даже без привязки к морфологии и метаболическим процессам индивидуального растения.

Важной и малоизученной проблемой является деградация компонентов лекарственных трав в процессе хранения и/или их извлечения из растительных образцов под действием различных факторов, что сказывается на дальнейших фармакологических свойствах препаратов на основе ЛРС. Этот факт подчеркивает актуальность исследования индивидуального компонентного состава

лекарственных растений с привлечением методов современной аналитической химии.

Работа выполнена в рамках проектов Госзадания Минобрнауки РФ (№ 4.873.2014/К от 18.07.2014 г., № 4.2612.2017/ПЧ) и гранта РФФИ (№ 15-03-02453-а) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр», уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

Цель данной диссертационной работы – обоснование и разработка аналитических схем идентификации и определения биологически активных веществ в лекарственных растениях антидепрессантного и противовоспалительного действия.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) изучение и оптимизация процессов экстракции БАВ из ЛРС в условиях различных способов их извлечения;

2) идентификации БАВ фенольного происхождения в ЛРС;

3) разработка методик определения БАВ с учетом их структурного и химического разнообразия в ЛРС;

4) оптимизация аналитических схем идентификации и определения биологически активных веществ в исследуемых образцах;

5) анализ лекарственных растений антидепрессантного и противовоспалительного действия, а также препаратов на их основе с применением разработанных аналитических схем идентификации и определения аналитов.

Научная новизна. Разработаны комплексные хроматографические схемы идентификации и определения фенольных соединений в экстрактах лекарственных растений семейств Яснотковых (шалфея лекарственного, чабреца ползучего, душицы обыкновенной и мелиссы лекарственной) и Зверобойных (зверобоя продырявленного) в условиях различных способов их экстрагирования.

Рассмотрены проблемы и особенности получения кинетических характеристик экстракции БАВ фенольного ряда в разных условиях их извлечения из анализируемой растительной матрицы.

Практическая значимость. Изучены условия экстракции фитокомпонентов из ЛРС при воздействии различных физико-химических параметров, включая

ультразвуковую, микроволновую, субкритическую и сверхкритическую флюидную экстракции, а также получены кинетические кривые выхода БАВ из растительной матрицы.

Установлены условия хроматографического разделения и детектирования различных групп БАВ лекарственных трав.

На основе данных анализа лекарственных трав семейств Зверобойные и Яснотковые предложен способ установления качества и подлинности исходного сырья, а также препаратов растительного происхождения. По результатам проведенных исследований получены патенты РФ на изобретение № 2568912 «Способ экстракции биологически активных веществ из зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.)» и № 2614200 «Способ установления подлинности и качества зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.)».

Положения, выносимые на защиту:

- результаты исследований экстракции БАВ из ЛРС в условиях различных способов их извлечения, а также их сопоставительный анализ;
- результаты кинетических исследований процессов извлечения БАВ из растительных образцов в различных условиях их экстракции;
- результаты исследований по идентификации БАВ в образцах лекарственных трав;
- оптимизированные аналитические схемы определения БАВ с учетом их структурного и химического разнообразия в ЛРС;
- результаты анализа лекарственных растений антидепрессантного и противовоспалительного действия разного места произрастания, а также препаратов на их основе с применением разработанных аналитических схем идентификации и определения аналитов.

Апробация работы. Результаты работы доложены в рамках следующих научных мероприятий: Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева (г. Чебоксары, 2012 г.), II Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (г. Краснодар, 2013 г.), IV Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (г. Краснодар, 2014), II Всероссийская конференция по аналитической

спектроскопии с международным участием (г. Краснодар, 2015 г.), XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (г. Екатеринбург, 2016 г.), III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (г. Краснодар, 2017 г.), Третий съезд аналитиков России (г. Москва, 2017 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 12 тезисов докладов и получены 2 Патента РФ на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц и 23 рисунка, состоит из введения, литературного обзора, 8 разделов экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы из 175 наименований.

Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, выполнении экспериментальных работ, интерпретации полученных данных, подготовке публикаций, докладов и выступлений на конференциях, практической апробации результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором рассмотрены основные классы БАВ и их физиологическая активность в составе лекарственных растений семейств Зверобойных и Яснотковых. В работе анализируются основные способы экстракционного извлечения фенольных соединений из растительного сырья под действием различных химических и физических факторов, показаны их преимущества и недостатки. Обобщены имеющиеся в литературе данные по определению и идентификации БАВ в составе лекарственных трав. Обоснован выбор метода анализа для получения данных о содержании основных компонентов и их детальной идентификации в изучаемых объектах. Сформулированы основные проблемы, которые имеются в данной области исследования.

В экспериментальной части указаны объекты исследования, реактивы и материалы, методы и методики проведения анализа, а также полученные результаты.

Исследования осуществляли на хроматографе «LC 20 Prominence» (Shimadzu, Япония) со спектрофотометрическим детектором на основе диодной матрицы SPD-M20A и квадрупольным масс-детектором LCMS2010EV, а также газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония).

Для ультразвуковой и микроволновой экстракции использовали УЗ-ванну УЗВ -4,0/1 ТТЦ ("Сапфир", Россия) и установку ETHOS EX ("Milestone", Италия). Динамическую экстракцию БАВ из ЛРС при повышенных температуре и давлении изучали на специально собранной экспериментальной установке. Исследования по сверхкритической флюидной экстракции БАВ из ЛРС выполняли в ООО «Компания Караван», (Краснодар, Россия).

Использованные в экспериментальных исследованиях реактивы имели квалификацию «ос.ч.» или «х.ч.» и стандартные вещества БАВ чистотой $\geq 85\%$.

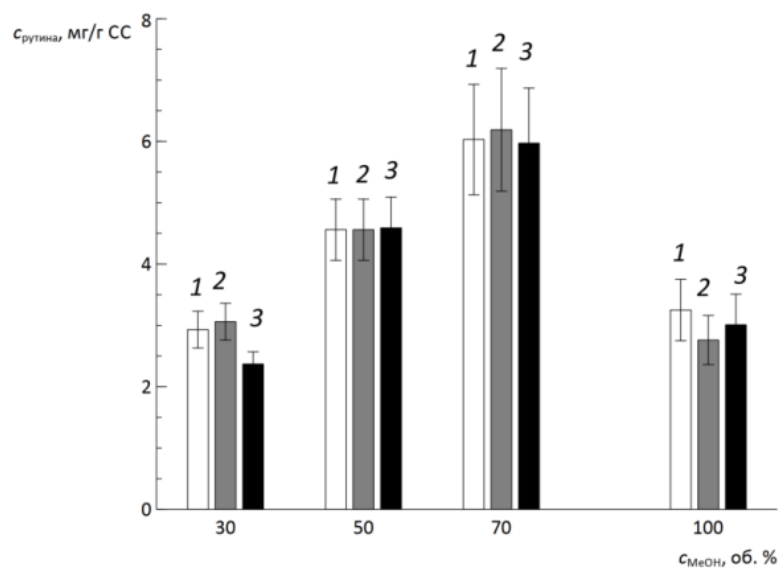
Экстракция БАВ из лекарственного растительного сырья

Извлечение веществ фенольной природы из лекарственных трав семейств Зверобойные и Яснотковые осуществляется переводом целевых компонентов из твердой растительной матрицы в жидкую фазу с использованием различных растворителей (метанол, этанол, этилацетат и т.д.). В ряде случаев интенсификация процесса экстракции компонентов из ЛРС возможна с помощью повышения температуры или одновременно температуры и давления, применяют также ультразвуковое или микроволновое воздействие. Отсутствие унифицированных способов экстракции БАВ из лекарственных трав, применение различных вариантов их извлечения значительно затрудняют проведение процедуры идентификации и определения компонентного состава исследуемых объектов.

В работе изучены условия экстракции фитокомпонентов из ЛРС, проведены сравнительные исследования и анализ различных способов их извлечения, включая ультразвуковую, микроволновую, субкритическую и сверхкритическую флюидную экстракции. В качестве лимитирующих физико-химических параметров экстракции рассматривались продолжительность извлечения, температура, давление, воздействие микроволнового и ультразвукового полей.

При ультразвуковой экстракции наибольший выход компонентов наблюдался при их извлечении 70% водно-спиртовым раствором, что показано на

примере рутина (рисунок 1). Исключением является кверцетин, для которого наилучшее соотношение спирта и воды находится в пределах 30% (v/v).



Время экстракции, мин: 1 - 15, 2 - 30, 3 - 45; объем экстрагента - 10 мл; n=3

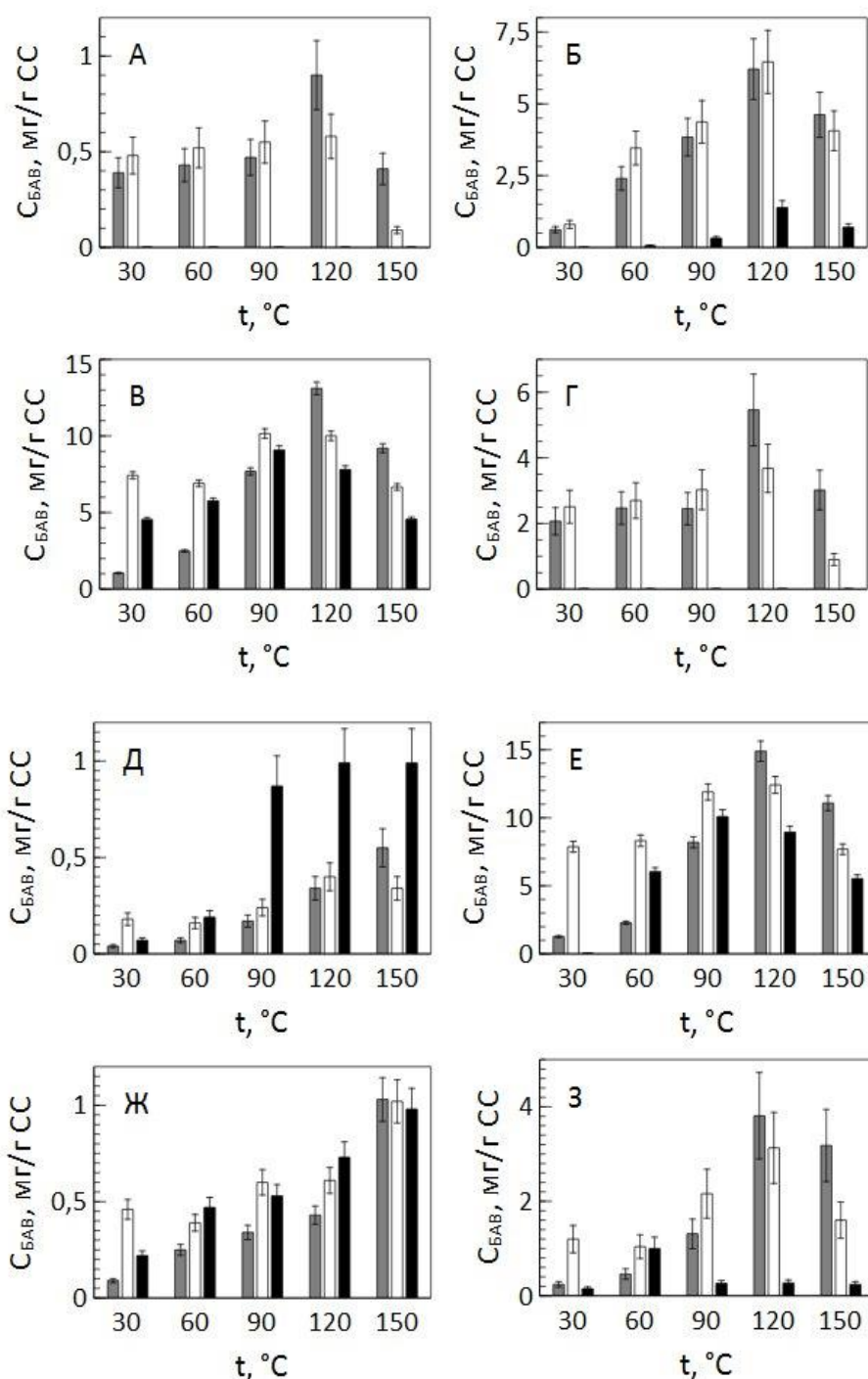
Рисунок 1 – Влияние УЗ обработки на экстракцию рутина из зверобоя

При микроволновой экстракции компонентов оптимально использование 70% водно-спиртового раствора, увеличение времени извлечения практически не сказывается на выходе большинства компонентов, кроме кверцетина.

Субкритический способ экстракции осуществляли в динамическом режиме при повышенных температуре и давлении. В этих условиях экстрагент (этиловый спирт) показал лучшие результаты в сравнении с водным. Эффективное извлечение водой кверцетина и биапигенина, а также флороглюцинолов – гиперфорина и адгиперфорина невозможно даже при повышенной температуре. Экстракция большинства БАВ повышается с ростом температуры до 120°C, а при дальнейшем нагревании она снижается, что может быть связано с их трансформацией при повышенной температуре. Исключение составляют эпикатехин и протокатеховая кислота, для которых вероятно дальнейшее увеличение концентрации в экстрактах с ростом температуры и давления (рисунок 2).

Нами также был апробирован вариант сверхкритической флюидной экстракции БАВ из растительной матрицы. Важным результатом этих исследований явился тот факт, что в условиях сверхкритической флюидной

экстракции БАВ из зверобоя практически не извлекаются, за исключением незначительных количеств гиперфорина, рутина и кверцетина. Фенольные соединения количественно остаются в шроте растительного образца.



А – адгиперфорин, Б - I3,II8-биапигенин, В - гиперозид, Г - гиперфорин, Д - протокатеховая кислота, Е - рутин, Ж - (-)-эпикатехин. З- кверцетин
 Экстрагент: 70%-ный этанол (серые столбцы), этанол (белые столбцы), вода (черные столбцы)

Рисунок 2 – Экстракция БАВ из зверобоя в динамических условиях при повышенных температуре и давлении ($n=3$)

Сравнение эффективности различных способов извлечения БАВ из ЛРС

При проведении сравнительной оценки способов извлечения фенольных веществ из ЛРС использовали одинаковый состав экстрагента и соблюдали одинаковое соотношение массы сырья к объему экстрагента, варьируя только параметры интенсификации: температуру, давление, действие ультразвукового и микроволнового полей (таблица 1).

Все эксперименты проводили с использованием травы зверобоя торгового наименования "Травы Кавказа" (г. Горячий Ключ). Для каждого варианта извлечения пробы сырья готовили в 5 параллелях и анализировали хроматографически с помощью ВЭЖХ-ДМД-МС.

Таблица 1 – Параметры различных способов извлечения БАВ из сырья*

Параметр	Способ извлечения БАВ из сырья					
	Ia	Iб	IIa	IIб	III	IV
Масса образца зверобоя, г	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2
Объем экстрагента, мл	100	25	25	25	25	10
Соотношение масса образца/объем экстрагента	1/100	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
Состав экстрагента	50% этанол	70% этанол	70% этанол	70% этанол	70% этанол	70% этанол
Время экстрагирования, мин	90	90	30	30	30	20
Температура экстрагирования, °С	T _{кип} экстрагента	T _{кип} экстрагента	25	25	75	120

*Ia – экстракция компонентов по Фармакопейной статье, Iб – промежуточная версия между Ia и IIa-IV способами, однократная (IIa), двукратная (IIб) ультразвуковая экстракция, микроволновая (III) и динамическая (IV) экстракция при повышенных температуре и давлении

С использованием вышеперечисленных вариантов были получены данные по извлечению компонентов зверобоя (таблица 2). Фармакопейный способ при нагревании I и субкритический способ при повышенных температуре и давлении IV обеспечивают наибольший выход активных компонентов, превышая почти в 2 раза ультразвуковой вариант экстракции. При сравнении способов экстракции БАВ из шалфея установлено, что при ультразвуковой экстракции наблюдается меньшая эффективность в сравнении со способами I, III, IV. Примечательно, что извлечение

БАВ из сырья в динамическом варианте IV приводит к уменьшению навески сырья в 5, расхода растворителя в 10 раз, а также сокращению времени извлечения в 4.5 раза по сравнению с Фармакопейным вариантом.

Кинетические характеристики способов извлечения БАВ из ЛРС

Для описания процессов извлечения БАВ из растительной матрицы проводились кинетические исследования. При описании этих процессов использовали уравнение кинетики псевдопервого порядка, исходя из посылки, что исходная концентрация аналита в образце априори не может быть установлена. Были рассчитаны константы скорости экстракции БАВ из трав зверобоя и шалфея в различных условиях их извлечения (таблица 3). Полученные значения констант варьировались от 0.02 до 0.67 для фенольных соединений в различных условиях их извлечения из лекарственных трав семейств Зверобойные и Яснотковые. Установлено, что вещества, относящиеся к одному классу фенольных соединений и присутствующие в одном ЛРС, дают близкие по значениям константы скорости их экстракции. Для всех компонентов зверобоя и шалфея константы скоростей экстракции максимальны при использовании способа IV, что свидетельствует о его относительно большей эффективности. Путем введения стабилизатора в экстракционную систему удалось получить константы скорости экстракции карнозоловой кислоты из ЛРС. Данный подход, по-видимому, может быть применен в процессе извлечения других, существенно неустойчивых дитерпенов из представителей семейства Яснотковых.

Таблица 2 – Содержание БАВ в зверобое продырявленном при различных вариантах их извлечения

Соединение	Способ извлечения БАВ из зверобоя					
	Ia	Iб	IIa	IIб	III	IV
	Содержание БАВ, мг/г СС* ($n=5, p=0,95$)					
Фурогиперфорин	0.64±0.05	0.58±0.07	0.48±0.03	0.43±0.04	0.95±0.20	0.71±0.10
Гиперфорин	12±1	11±3	8±2	9±1	11±1	13±1
Адгиперфорин	1.9±0.8	1.5±0.3	1.3±0.3	1.5±0.1	1.50±0.03	1.97±0.04
Псевдогиперицин	0.51±0.02	0.42±0.08	0.26±0.02	0.24±0.04	0.45±0.05	0.50±0.03
Гиперицин	0.24±0.03	0.23±0.05	0.10±0.01	0.09±0.02	0.25±0.03	0.25±0.03
Протокатеховая кислота	0.22±0.02	0.17±0.03	0.133±0.008	0.130±0.005	0.21±0.02	0.208±0.004
5-О-кофеилхинная кислота	2.3±0.1	1.9±0.3	1.63±0.08	1.6±0.2	2.0±0.1	2.2±0.2
3-О-кофеилхинная кислота	1.15±0.07	1.0±0.2	0.85±0.03	0.8±0.1	0.97±0.06	1.1±0.1
(-)-Эпикатехин	0.71±0.07	0.53±0.06	0.50±0.06	0.50±0.08	0.7±0.1	0.88±0.08
Рутин	14±1	12±1	9.9±0.3	10±1	13±1	14±1
Гиперозид	7.3±0.4	6.2±0.6	5.4±0.1	5.4±0.6	6.8±0.4	7.3±0.5
Изокверцитрин	2.6±0.1	2.1±0.2	1.9±0.1	1.9±0.2	2.38±0.04	2.6±0.1
Кверцитрин	1.48±0.08	1.4±0.1	1.15±0.04	1.1±0.2	1.4±0.2	1.4±0.1
Кверцетин	2.9±0.2	2.3±0.4	1.2±0.2	1.1±0.1	2.8±0.3	3.3±0.3
I3,II8-биапигенин	0.095±0.002	0.09±0.03	0.089±0.009	0.085±0.003	0.09±0.02	0.10±0.03

*масса представлена в пересчёте на сухое сырье (СС)

Таблица 3 – Константы скорости экстракции БАВ из ЛРС для различных способов извлечения ($Sr \leq 0,15$)

Соединение*	IV	Ia	Ia + АК 5%	IIa	IIa + АК 5%
<i>Звербой продырявленный</i>					
Производные коричной кислоты					
3-О-КХК	0.26	0.08	0.09	0.05	0.04
5-О-КХК	0.26	0.08	0.08	0.06	0.04
Флавоноиды					
КВ	0.23	0.05	0.05	0.05	0.06
ЭК	0.25	0.06	0.04	0.06	0.06
Гликозиды флавоноидов					
ГЗД	0.25	0.08	0.08	0.05	0.04
ИКВ	0.25	0.08	0.08	0.05	0.04
КВН	0.26	0.08	0.09	0.06	0.05
РТ	0.25	0.08	0.08	0.04	0.03
Флороглюцинолы					
АГФ	0.23	0.04	0.02	0.11	0.09
ГФ	0.31	0.04	0.02	0.09	0.09
Нафтодиантроны					
ГП	0.24	0.05	0.03	0.04	0.05
ППП	0.36	0.05	0.01	0.04	0.05
Бифлавоноиды					
БиАП	0.60	0.08	0.08	0.22	0.22
Фенолкарбоновые кислоты					
ПК	0.24	0.05	0.08	0.07	0.07
<i>Шалфей лекарственный</i>					
Производные коричной кислоты					
КофК	0.33	0.04	0.05	0.06	0.06
РК	0.51	0.11	0.10	0.05	0.04
Гликозиды флавоноидов					
ЛГЛ	0.46	0.06	0.14	0.03	0.03
Дигликозиды флавоноидов					
ЛГРД	0.43	0.09	0.06	0.02	0.02
Дитерпены					
КК	0.67	–	0.13	–	0.20

* 3-О-КХК – 3-О-кофеилхинная кислота; 5-О-КХК – 5-О-кофеилхинная кислота; КВ – кверцетин; ЭК – (-)-эпикатехин; ГЗД – гиперозид; ИКВ – изокверцитрин; КВН – кверцитрин; РТ – рутин; АГФ – адгиперфорин; ГФ – гиперфорин; ГП – гиперицин; ППП – псевдогиперицин; БиАП – I3,II8-биапигенин; ПК – протокатеховая кислота; КофК – кофейная кислота; РК – розмариновая кислота; ЛГЛ – лютеолин-7-О-глюкозид; ЛГРД – лютеолин-7-О-бета-D-глюкуронид; КК – карнозоловая кислота

Идентификация и определение БАВ в экстрактах ЛРС

Для определения БАВ фенольного ряда различных растений семейств Яснотковые и Зверобойные часто используют методы суммарного определения фенольных кислот и флавоноидов или метод жидкостной хроматографии с детектированием в УФ и видимой области без привлечения других способов их детальной идентификации. Перспективным представляется использование обращенно-фазовой ВЭЖХ в совокупности с несколькими вариантами детектирования (УФ, ИК, ЯМР, МС). Однако с расширением возможностей качественного анализа растительного сырья возникают вопросы, ставящие под сомнение накопленные ранее данные и усложняющие процесс получения новых данных, характеризующихся высокой степенью достоверности. Это связано с многообразием БАВ натурального происхождения и требует систематизации разработанных ранее подходов и установлению новых принципов идентификации фитокомпонентов.

Идентификация и определение БАВ в экстрактах трав семейства Зверобойные

Качественный анализ компонентов в экстракте зверобоя осуществляли на основе УФ- и масс-спектров индивидуальных соединений, полученных для 12 стандартных веществ, и с учетом литературных данных. Установлено (рисунки 3, 4), что хроматографический профиль зверобоя носит ряд отличительных признаков и включает в себя, в основном, производные кверцетина (рутин, гиперозид, изокверцитрин, кверцитрин), которые представляют собой различные гликозиды данного флавонола, а также протокатеховую кислоту, (-)-эпикатехин, I3,II8-биапигенин и производные хлорогеновой кислоты. Также подтверждено присутствие в его составе производных нафтодиантронов и флороглюцинолов, которые и обеспечивают его андидепрессантную активность: гиперфорина, адгиперфорина, гиперидина, псевдогиперидина, а также фуругиперфорина как продукта деградации флороглюцинола.

Как видно на МС-хроматограмме (рисунок 3), использование колонки с привитой октадецильной фазой не позволяет элюировать производные гиперидина (m/z 503 и m/z 519). Поэтому разделение и определение компонентов в экстрактах зверобоя нами проводилось по двум хроматографическим схемам: «система 1» обеспечивала определение фенолкарбоновых кислот и флавоноидов

и осуществлялась на колонке с привитой октадецильной фазой, «система 2» – определение гиперцинов и гиперфоринов с использованием подвижной фазы с большим содержанием ацетонитрила (80%-100%) и относительно высокой скоростью потока (0.6 мл/мин) на колонке с монолитной структурой сорбента (рисунок 4). Разделение гиперцинов осуществляется в течение 10 мин в совокупности с гиперфоридами с достаточной воспроизводимостью измерений (0.2 мкг/мл – 6%, 10 мкг/мл – 1.2%, 20 мкг/мл – 0.6%).

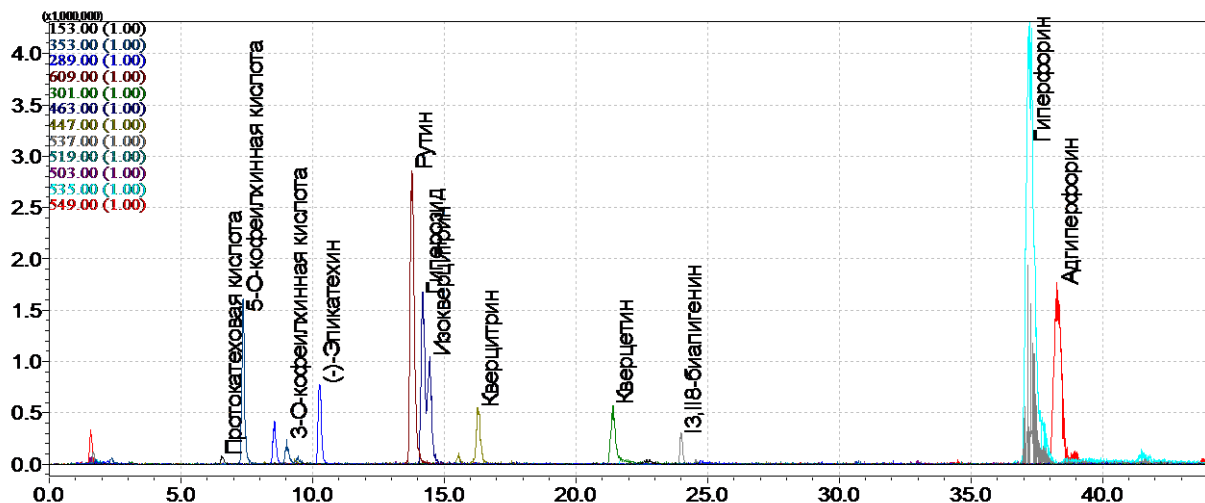


Рисунок 3 – Хроматограмма экстракта зверобоя, полученная методом ВЭЖХ-МС («система 1»)

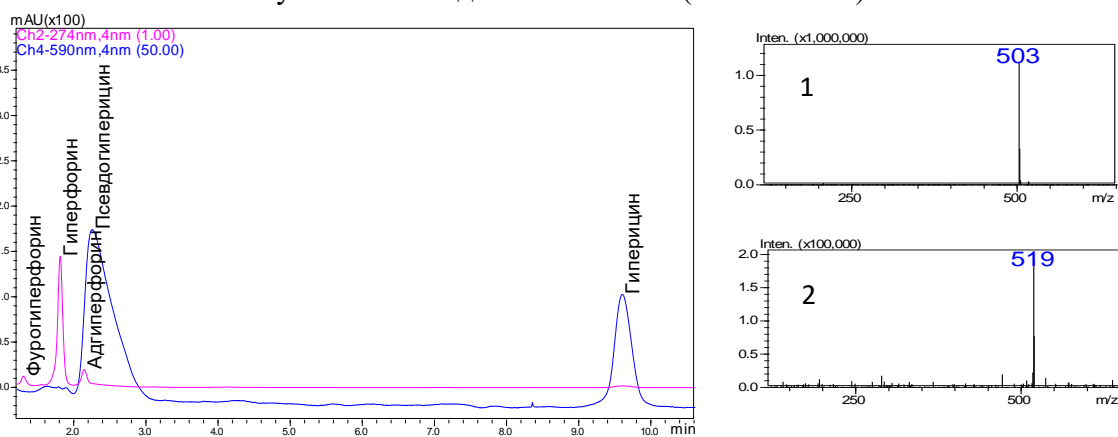


Рисунок 4 – Хроматограмма экстракта зверобоя, полученная методом ВЭЖХ-ДМД, и МС-спектры гиперцицина (1) и псевдогиперцицина (2) («система 2»)

Гиперцицин и псевдогиперцицин поглощают в области 590 ± 2 нм, при этом регистрируются основные молекулярные ионы m/z 503 и m/z 519 соответственно. Адгиперфорин и фурогиперфорин проявляют те же максимумы поглощения в УФ-области, что и гиперфорин, при 272 ± 2 нм. Основные молекулярные ионы имели значения m/z 549 и m/z 553 соответственно.

Идентификация и определение БАВ в экстрактах трав семейства Яснотковые

Идентификацию компонентов экстрактов трав Яснотковых также осуществляли на основе УФ- и масс-спектров. Установлено, что представители семейства Яснотковых характеризуются наличием различных по свойствам и структуре соединений. Как видно из таблицы 4, в экстрактах шалфея, чабреца, душицы и мяты присутствуют фенолкарбоновые и коричные кислоты, производные лютеолина и апигенина, а также разнообразные агликоны флавоноидов и производные терпенов. Причем, кофейная и розмариновая кислоты присутствуют во всех образцах трав, а в мяте отсутствует лютеолин-7-О-бета-D-глюкуронид. Производные карнозоловой кислоты обнаружены только в двух представителях, что может способствовать дифференциации трав внутри данного семейства.

Для идентификации галловой, транс-феруловой, ванилиновой, p-кумаровой, 4-гидроксибензойной и коричной кислот в экстрактах растений проводили хроматографирование экстрактов в системе ВЭЖХ-ДМД-МС с использованием стандартных образцов этих соединений: в градиентном режиме с увеличением доли ацетонитрила от 5 до 90% в элюенте, а также с содержанием водной фазы 100% на первой ступени градиентного режима элюирования. Поиск данных соединений показал их отсутствие в составе экстрактов трав семейства Яснотковых.

Условия определения БАВ семейства Яснотковых были аналогичны условиям хроматографирования и детектирования компонентов трав семейства Зверобойные. Отличием является градиентный режим элюирования, учитывающий специфику анализируемых растительных образцов: программа градиентного элюирования удлиняется на 5 мин ввиду необходимости разделения карнозоловой кислоты и ее производных (карнозола, метилкарнозата и других). Причем, элюирование данных компонентов происходит при снижении объемной доли водной фазы до 10% («система 3»).

Таблица 4 – Идентификация БАВ в лекарственных травах семейства Яснотковые

Соединение	Шалфей (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Чабрец (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	Душица (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Мелисса (<i>Melissa officinalis</i> L.)
Хинная кислота	+	+	+	+
3,4-дигидроксифенилмолочная кислота (<i>Danshensu</i>)	+	+	+	+
Протокатеховая кислота	+	+	+	+
5-О-кофеилхинная кислота	–	+	–	–
Цикориевая кислота	+	–	–	–
Протокатеховый альдегид	+	+	+	+
Кафтаровая кислота	–	–	–	+
3-О-кофеилхинная кислота	–	+	+	–
4-О-кофеилхинная кислота	–	+	–	–
Кофейная кислота	+	+	+	+
Лютеолин-7-О-бета-D-рутинозид	+	+	–	–
Производное сальвианоловой кислоты	–	–	–	+
Рутин	–	+	–	–
Лютеолин 7-О-глюкозид	+	+	–	+
Лютеолин-7-О-бета-D-глюкуронид	+	+	+	–
3,5-дикофеилхинная кислота	–	+	–	–
Апигенин-7-глюкозид	+	–	–	+
Розмариновая кислота	+	+	+	+
Апигенин-7-глюкуронид	+	+	+	–
Литоспермовая кислота и ее производные	–	–	–	+
Лютеолин	+	+	+	+
Апигенин	+	+	+	–
Гиспидулин	+	–	–	–
Карнозол	+	+	–	–
Карнозоловая кислота	+	+	–	–
Метилкарнозат	+	+	–	–

Содержания БАВ обоих семейств устанавливали с использованием метрологических характеристик их хроматографирования методом ВЭЖХ-ДМД, представленных в таблице 5.

Таблица 5 – Метрологические характеристики методики определения БАВ в ЛРС

Соединение	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	C_{\min}^* , мкг/мл	C_d^{**} , мкг/мл
Протокатеховая кислота	0.8–100	0.78	0.13
5-О-кофеилхинная кислота	0.5–100	0.49	0.10
3-О-кофеилхинная кислота	0.6–100	0.60	0.10
Кофейная кислота	0.2–100	0.24	0.12
(-)-Эпикатехин	0.5–100	0.49	0.07
Рутин	0.4–200	0.43	0.10
Гиперозид	0.7–100	0.73	0.10
Изокверцитрин	0.3–100	0.34	0.07
Кверцитрин	0.3–100	0.32	0.10
Лютеолин 7-О-глюкозид	0.4–100	0.36	0.19
Лютеолин-7-О-β-D-глюкуронид	0.5–200	0.48	0.30
Кверцетин	1.2–100	1.2	0.20
Розмариновая кислота	0.3–200	0.25	0.16
ІЗ,ІІ8-Биапигенин	0.3–100	0.29	0.05
Карнозоловая кислота	0.8–100	0.75	0.28
Гиперфорин	0.2–125	0.24	0.16
Гиперицин	0.3–20	0.30	0.10

C_{\min}^* – минимально определяемая концентрация;

C_d^{**} – минимально детектируемая концентрация.

По результатам проведенных исследований нами предложена комплексная схема идентификации и хроматографического определения БАВ в ЛРС и препаратах на основе ЛРС, представленная на рисунке 5.

Основным этапом анализа ЛРС и препаратов является предварительная жидкостная экстракция компонентов. ВЭЖХ-УФ-МС-анализ полученных извлечений целесообразно проводить с учетом специфики компонентного состава растительных образцов. Этап концентрирования аналитов необходим, например, при значительных потерях на стадии извлечения или с целью поиска новых, ранее не идентифицированных соединений. Выбранная схема позволяет не только идентифицировать, но и устанавливать содержания БАВ в составе ЛРС и препаратов на его основе.

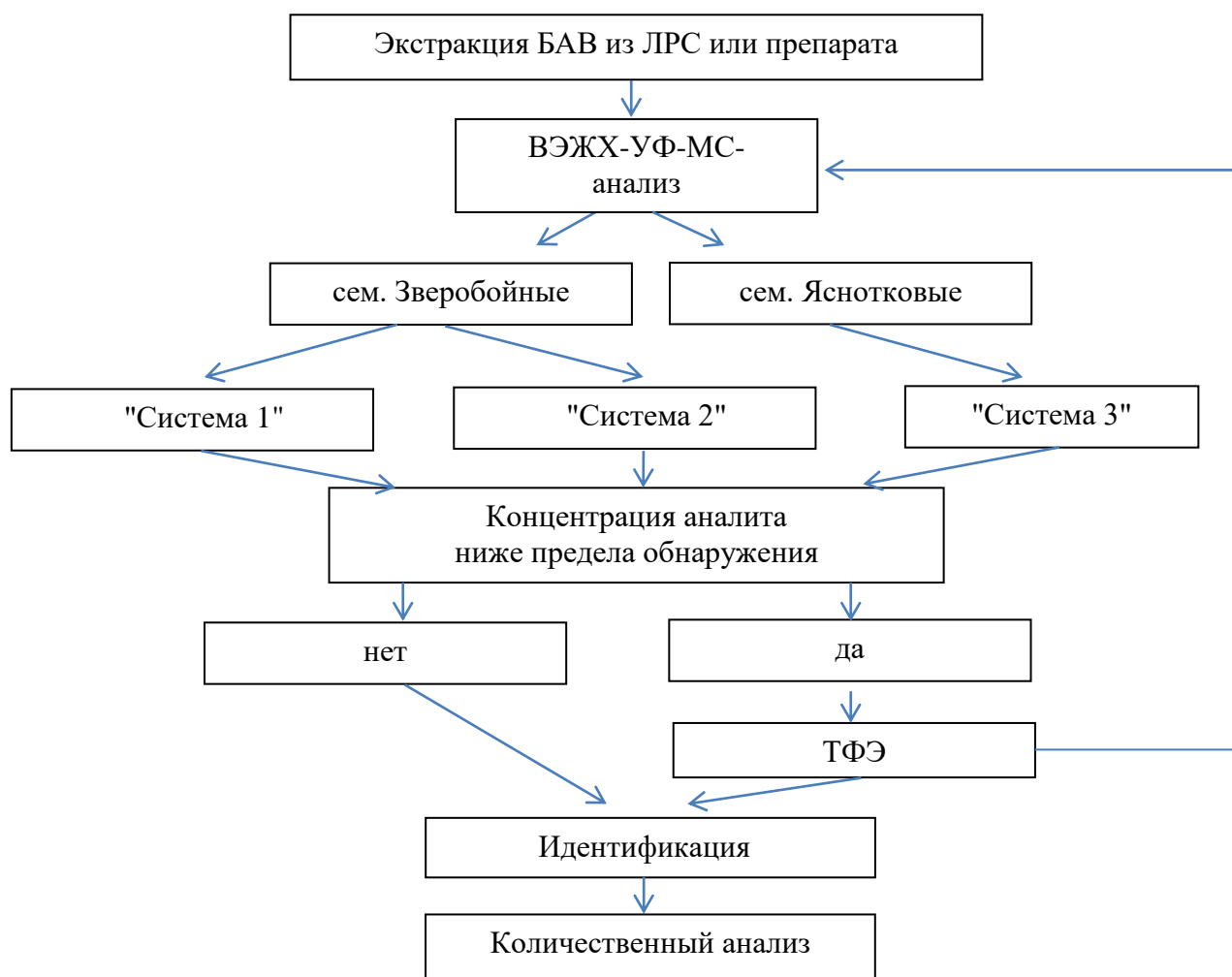


Рисунок 5 – Комплексная схема идентификации и хроматографического определения БАВ в ЛРС и препаратах на основе ЛРС

Анализ образцов ЛРС семейств Зверобойные, Яснотковые и препаратов на их основе

С учетом наибольшей эффективности субкритического экстракционного способа были проанализированы различные образцы зверобоя, шалфея, чабреца, душицы и мелиссы с целью установления содержания БАВ (таблица 6).

Как видно из таблицы 6, в изученных образцах обоих семейств присутствуют протокатеховая кислота и производные хлорогеновой кислоты. Для всех представителей семейства Яснотковых характерно наличие кофейной и розмариновой кислот, последняя из которых является маркером данного семейства. В образцах шалфея лекарственного, чабреца ползучего и душицы обыкновенной наблюдается сопоставимое с розмариновой кислотой содержание лютеолина-7-О-бета-D-глюкуронида. Мажорными компонентами зверобоя продырявленного являются производное кверцетина – рутин и гиперфорин.

Таблица 6 – Содержания БАВ в ЛРС, мг/г СС ($n = 5, P = 0.95$)

Соединение	Зверобой продырявленный	Шалфей лекарственный	Чабрец ползучий	Душица обыкновенная	Мелисса лекарственная
ПК	0.208±0.004	н.о.*	н.о.	0.68±0.06	0.10±0.01
5-О-КХК	2.2±0.2	н.о.	0.10±0.02	н.о.	н.о.
3-О-КХК	1.1±0.1	н.о.	0.7±0.2	0.3±0.1	н.о.
КофК	н.о.	0.52±0.05	0.19±0.01	0.62±0.01	0.5±0.1
ЭК	0.88±0.08	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
РТ	14±1	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ГЗД	7.3±0.5	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ИКВ	2.6±0.1	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
КВН	1.4±0.1	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ЛГД	н.о.	0.55±0.05	0.20±0.03	н.о.	0.31±0.02
ЛГРД	н.о.	6.0±0.4	4.0±0.7	19±1	н.о.
КВ	3.3±0.3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
РК	н.о.	6.5±0.1	4.0±0.7	23±2	14±2
КК	н.о.	4±2	0.07±0.04	н.о.	н.о.
ГФ	13±1	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

н.о. – компонент не обнаружен

Важным аспектом исследования ЛРС является оценка степени деградации компонентов, неустойчивых в процессе хранения и/или извлечения из растительных образцов под влиянием различных факторов. Данная проблема мало изучена, но она крайне актуальна, т.к. это связано с качеством растительного материала. Помимо производных коричной кислоты и кверцетина в зверобое содержатся флороглюцинолы и нафтодиантроны, что является отличительной особенностью представителей данного семейства. При анализе зверобоя различных торговых наименований было установлено, что содержание гиперфорина связано с содержанием рутина, а соотношение данных соединений в сырье находится в пределах единицы (таблица 7). Исключение составил образец травы зверобоя с истекшим сроком годности. Данный показатель может использоваться для подтверждения сроков хранения и качества сырья.

При проведении анализа ЛРС по предложенной схеме представляется возможным выявить продукты деградации активных веществ, в частности, гиперфорина в зверобое, который неустойчив на свету и под воздействием кислорода воздуха переходит в окисленное производное – фуругиперфорин, обладающий более низкой фармакологической активностью.

Таблица 7 – Содержание БАВ и их соотношения в зверобое различных торговых наименований ($Sr \leq 0.07$)

Торговая марка	Адрес производства	Содержание РТ, ммоль/кг	Содержание ГФ, ммоль/кг	Отношение содержаний РТ/ГФ
ООО "Травы Кавказа"	Краснодарский край, г. Горячий Ключ	22.7	21.5	1.1
ОАО "Красногорсклексредства"	Московская обл., г. Красногорск	13.2	13.3	1.0
ПКФ ООО "ФитоФарм"	Краснодарский край, г. Анапа	25.6	21.7	1.2
ЗАО "Иван-чай"	г. Москва, пос. Горки-Ленинские	5.6	6.8	0.8
ООО "Фарос-21"	Краснодарский край, г. Краснодар	9.7	10.3	0.9
Самостоятельный сбор	Краснодарский край п. Молькино	18.7	21.1	0.9
ООО "Травы Кавказа"*	Краснодарский край, г. Горячий Ключ	31.2	10.0	3.1

*с истекшим сроком годности

Дальнейшие исследования соотношения гиперфорин/фурогиперфорин в образцах зверобоя разных производителей в зависимости от условий экстракции БАВ и хранения экстракта позволят оценить фармактивность зверобоя с учетом региональной принадлежности исходного лекарственного растительного сырья.

Предложенная хроматографическая схема идентификации и определения БАВ была апробирована при анализе этанольного экстракта препарата "Деприм" и эликсира "Доппельгерц Нервотоник". В таблетках "Деприм" большая часть гиперфорина подверглась деградации в фармпрепарате даже на момент, когда его срок годности еще не истек. В эликсире флороглюцинолы и нафтодиантроны не были обнаружены, т.е. на момент анализа подверглись разложению, несмотря на актуальность срока годности.

ВЫВОДЫ

1. Изучены и оптимизированы способы экстракции БАВ из ЛРС в условиях различных способов их извлечения для целей их идентификации и определения методами хроматографии. Наибольшая эффективность извлечения БАВ из растительных объектов достигается с учетом химического «средства»

экстрагента и извлекаемого компонента, а также экстрагировании ЛРС при повышенных температуре и давлении в динамических условиях.

2. Проведен скрининг БАВ фенольного происхождения в ЛРС в условиях различных способов их извлечения, идентифицированы 17 соединений в составе образцов трав семейств Зверобойные и 26 соединений в образцах трав семейства Яснотковые.

3. Изучены способы жидкофазного и твердофазного концентрирования анализов. Показано, что при сверхкритической флюидной экстракции БАВ из сырья зверобоя в CO₂-экстракт переходят лишь незначительные количества гиперфорина, рутина и кверцетина. При твердофазной экстракции с использованием патронов на основе октадецилсилана происходит концентрирование фитокомпонентов из экстрактов ЛРС, а также очистка извлечений от соэкстрактивных веществ.

4. Проведены кинетические исследования процессов извлечения БАВ из сырья на основе анализа кривых выхода компонентов от времени. Показана возможность дифференциации веществ по классам фенольных соединений на основе анализа их констант скоростей экстракции. Показано, что для получения констант скорости экстракции нестабильных БАВ из ЛРС требуется введение стабилизатора в экстракционную систему.

5. Разработаны хроматографические методики определения БАВ в экстрактах трав Зверобойных и Яснотковых с учетом их структурного и химического разнообразия. На основе этих методик разработаны аналитические схемы идентификации и определения биологически активных веществ в исследуемых образцах. Показано, что для анализа травы зверобоя оптимально определение БАВ по двум различным схемам: первая обеспечивает определение фенолкарбоновых кислот и флавоноидов и проводится на колонке с привитой октадецильной фазой, вторая – гиперцинонов и гиперфоринов на колонке с монолитной структурой сорбента. Установлены метрологические характеристики разработанных методик определения БАВ в лекарственных растениях и препаратах на их основе.

6. Проведен анализ лекарственных растений антидепрессантного и противовоспалительного действия, а также препаратов на их основе

с применением разработанных аналитических схем идентификации и определения аналитов, установлены их содержания и соотношения. Показана возможность использования соотношений содержаний рутин/гиперфорин и гиперфорин/фурогиперфорин для установления качества и подлинности ЛРС.

Основное содержание диссертационной работы изложено в публикациях:

1. Сорбционно-хроматографическое определение галловой, кофейной кислот, рутина и эпикатехина в лекарственных растениях / З.А. Темердашев, В.В. Милевская, Н.В. Киселева, Н.А. Верниковская, В.А. Коробков // Аналитика и контроль. – 2013. – Т.17. – №2. – С. 211.

2. Способы экстрагирования биологически активных веществ из лекарственных растений на примере компонентов зверобоя / В.В. Милевская, М.А. Статкус, З.А. Темердашев, Н.В. Киселева, Н.А. Верниковская // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т.70. – № 12. – С. 1255.

3. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе / В.В. Милевская, М.А. Статкус, З.А. Темердашев, Н.В. Киселева, Т.С. Бутыльская, Е.А. Шилько // Журнал аналитической химии. – 2016. – Т.71. – № 7. – С. 768.

4. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях семейства яснотковых / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, Т.С. Бутыльская, Н.В. Киселева // Журнал аналитической химии. – 2017. – Т.72. – № 3. – С. 273.

5. Кинетика извлечения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья разными способами экстракции / В.В. Милевская, Т.С. Бутыльская, З.А. Темердашев, М.А. Статкус, Н.В. Киселева // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 2017. – Т. 58. – № 6. – С.281.

6. Способ экстракции биологически активных веществ из зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) / В.В. Милевская, М.А. Статкус, З.А. Темердашев // Патент РФ на изобретение № 2568912.

7. Способ установления подлинности и качества зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, Т.С. Бутыльская // Патент РФ на изобретение № 2614200.

8. Сорбционное извлечение и ВЭЖХ - определение фенольных веществ в растительных материалах / Н.В. Киселева, В.В. Милевская, Н.А. Верниковская // Современные проблемы химической науки и образования: сб. материалов Всерос. конф. с междунар. участием, посвященной 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева: в 2 т. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – Т. II. – С. 167.

9. Сорбционно-хроматографическое определение фенольных веществ в лекарственных растениях / З.А. Темердашев, В.В. Милевская, Н.В. Киселева, Н.А. Верниковская // Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – 2013. – С. 117.

10. Эффективность экстракционного извлечения компонентов ЛРС для их хромато-масс-спектрометрического определения / З.А. Темердашев, В.В. Милевская, Н.В. Киселева, Н.А. Верниковская, М.А. Статкус // Материалы IV Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». – 2014 – С.255.

11. ВЭЖХ-ДМД-МС определение компонентов зверобоя в исходном сырье и препаратах на его основе / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, М.А. Статкус, Т.С. Бутыльская, Е.А. Шилько // II Всероссийская конференция с международным участием по аналитической спектроскопии. – 2015. – С.129.

12. Особенности хромато-масс-спектрометрического определения гиперфорина, гиперидина и их производных в зверобое / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, М.А. Статкус, Н.В. Киселева, Н.А. Верниковская // II Всероссийская конференция с международным участием по аналитической спектроскопии. – 2015. – С.130.

13. Хромато-масс-спектрометрический анализ лекарственного растения рода *Hypericum* с применением микроволнового экстрагирования / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, Н.В. Киселева, Е.А. Шилько // II Всероссийская конференция с международным участием по аналитической спектроскопии. – 2015. – С.131.

14. ВЭЖХ-ДМД-МС определение БАВ с использованием субкритического экстрагирования из шалфея лекарственного / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, М.А. Статкус, Н.В. Киселева, Т.С. Бутыльская // II Всероссийская конференция с международным участием по аналитической спектроскопии. – 2015. – С.132.

15. Исследование содержания биологически активных компонентов в шалфее лекарственном в условиях различных мест его произрастания / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, Т.С. Бутыльская, Е.А. Шилько // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – 2016. – Т.4. – С.371.

16. ВЭЖХ-ДМД-МС-идентификация биологически активных компонентов чабреца ползучего, Melissa лекарственной и душицы обыкновенной / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, Т.С. Бутыльская // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – 2016. – Т.4. – С.372.

17. Кинетические параметры экстракционного извлечения компонентов зверобоя продырявленного и шалфея лекарственного / В.В. Милевская, Т.С. Бутыльская, З.А. Темердашев, Н.В. Киселева // III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием. – 2017. – С. 166.

18. Концентрирование и определение биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье антидепрессантного и противовоспалительного действия / В.В. Милевская, Т.С. Бутыльская, Е.А. Шилько, З.А. Темердашев, Н.В. Киселева // III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием. – 2017. – С. 141.

19. Стабильность вещественного состояния некоторых БАВ лекарственных растений как показатель их качества / В.В. Милевская, З.А. Темердашев, Т.С. Бутыльская, Е.А. Шилько, Л.П. Рябоконь // Третий съезд аналитиков России. – 2017.

Автор выражает глубокую признательность к.х.н., с.н.с. ФГБОУ ВО "МГУ им. М.В. Ломоносова" М.А. Статкусу, а также сотрудникам кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «КубГУ» за оказанную помощь и поддержку в проведении диссертационного исследования.