УДК 547.972

А.М. Жаркеева, А.С. Шевченко, Д.Ю. Корулькин, Р.А. Музычкина
Казахский Национальный университет, факультет химии и химической технологии, г. Алматы

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЛАВАНОВ ИЗ ТРАВЫ ГОРЦА ПЕРЕЧНОГО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В данной статье представлены результаты работ по выделению полифлаванов из травы горца перечного (лат. Polygonum hydropiper L.), который является распространенным дикорастущим растением в том числе и произрастающим на территории Казахстана, и являющийся очень перспективным сырьем для выделения полифлаванов. Так же дано описание оптимальных методов выделения полифлаванов, выбор наилучшего осадителя и количества осадителя для наибольшего выхода.
Ключевые слова: *полифлаваны, биологически активные вещества, фитопрепарат.*

Введение. Богатая и разнообразная флора Республики Казахстан может быть источником доступного и дешевого сырья для производства жизненно важных фитопрепаратов широкого спектра действия. Однако, ее недостаточная изученность приводит к тому, что основное количество лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе завозится в Казахстан из стран ближнего и дальнего зарубежья.

Изучение биологической активности полифлаванов, содержащихся в растительном сырье, а также полученных на их основе производных, выявило их высокую противоопухолевую, противовоспалительную, ранозаживляющую, гепатопротекторную, противовирусную и антибактериальную активность, малую токсичность, а также отсутствие аллергизирующих и кумулятивных свойств [1-4]. Поэтому химическое исследование полифлаванов казахстанских растений, технологии их выделения и направленной модификации, создание фитопрепаратов на их основе является актуальным как в теоретическом, так и в практическом отношении.

Достаточные для промышленного извлечения количества полифлаванов содержат казахстанские растения семейств: Salicaceae, Fagaceae, Polygonaceae, Geraniaceae, Anacardiaceae и др., однако, наиболее перспективными источниками полифлаванов являются растения рода горец (Polygonum L.) [5-7].

В связи с этим, целью исследования был поиск эффективных методов селективного извлечения полифлаванов из травы горца перечного (Polygonum hydropiper L.).

Материалы и методы. Для выделения суммы полифлаванов использовали последовательную экстракцию высушенной и измельченной травы горца перечного, бензолом (для удаления хлорофилла, неполярных веществ, смол), эфиром, этилацетатом и этиловым спиртом. Экстракты концентрировали в мягких условиях (температура не выше 40^0С, вакуум водоструйного насоса).

Концентрат этилацетатного экстракта был рехроматографирован на колонке с сефадексом LH-20, элюируя компоненты экстракта водно-спиртовыми смесями состава от 1:9 до 1:1.

Спиртовый концентрат повторно рехроматографировали на колонке с сефадексом HW-40, используя в качестве элюента водный метанол (10→20→30→40→50% MeOH) и метанол-вода-ацетон (7:1:2).

Контроль за разделением растительных веществ осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol UV-254 в системах: бензол - этиловый спирт (1:1) и бензол-ацетон (1:3) [8], элюаты объединяли и концентрировали. Полифлаваны выделяли обработкой полученных фракций 10% раствором свинца ацетата с последующим отделением осадка их солей центрифугированием и гидролизом солей 5% кислотой серной. Сернокислый маточник нейтрализовали насыщенным раствором натрия бикарбоната, концентрировали.

Дополнительную очистку и анализ полифлаванов осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии в системах: LiChrospher-100 RP_{18} (5 мкм), подвижная фаза - 0.01М фосфорная кислота - 0.01М дигидрофосфат калия - ацетонитрил (47.5:47.5:5), с использованием УФ-детектора (254 нм) и при повышении концентрации ацетонитрила в 0.1М орто-форфорной кислоте от 0 до 15% за 180 минут, с дальнейшим элюированием смесью ацетонитрила и муравьиной кислоты при повышении концентрации ацетонитрила от 0 до 30% 80 мин при расходе подвижной фазы 1 мл/мин и использовании УФ-детектора (280 нм) [8].

Количественное определение полифлаванов в полученных экстрактах проводили по методике [9].

Результаты и обсуждение. Фитохимический анализ растительного сырья показал наличие в его составе 8.82% полифлаванов, в пересчете на абсолютно сухое сырье. При выделении целевой группы БАВ из 100 г. травы горца перечного, произведенного по приведенной методике, удалось выделить 4.59 г очищенной суммы полифлаванов, при влажности растения 6.34%, что составляет лишь 52.95% от их общего содержания в объекте исследования. Т.е. анализ методики извлечения полифлаванов показал ее недостаточную эффективность.

Для повышении селективности выделения полифлаванов были изучены: влияние природы реэктрагента (в базовом методе) на их максимальное извлечение, влияние соотношения растительное сырье – реэкстрагент; влияние типа и концентрации осадителя для седиментации.

Подбор оптимального экстрагента осуществляли при соотношении сырье-экстрагент 1:3 по объему, в условиях термической экстракции при температуре кипения растворителя в течение 2 часов (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты исследования экстрактов на содержание полифлаванов, в % от количественного содержания в растении

Реэкстрагент	Выход полифлаванов	Реэкстрагент	Выход полифлаванов
Вода (pH 6)	45.24	50% ацетон	62.51
Вода (pH 7)	49.12	Ацетон	58.14
Вода (pH 8)	51.53	Диэтиловый эфир	35.80
50% этиловый спирт	57.78	Диоксан	29.56
Этиловый спирт	53.19	Этилацетат	61.63

Данные таблицы 1 показывают, что по эффективности извлечения целевой группы БАВ, для селективного выделения полифлаванов, экстрагенты можно расположить в следующий ряд: 50% ацетон > этилацетат > ацетон > 50% спирт этиловый > этанол > подщелоченная вода (pH 8) > вода очищенная > подкисленная вода (pH 6) > диэтиловый эфир > диоксан. Таким образом, даже однофакторная модификация методики с заменой реэкстрагента, дает повышение выхода полифлаванов на 9.56%.

Для выбранного оптимального реэкстрагента определяли его оптимальное объемное соотношение. Исследование проводилось при соотношениях сырье-реэкстрагент от 1:3 до 1:10 по объему, в условиях термической экстракции при температуре кипения растворителя в течение 2 часов (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты анализа экстрактов для извлечения полифлаванов при различном соотношении сырье-реэкстранент, в % от содержания в растении

Реэкстрагент / соотношение	Выход полифлаванов	Реэкстрагент / соотношение	Выход полифлаванов
50% ацетон 1:3	62.52	50% ацетон 1:7	66.76
50% ацетон 1:5	65.74	50% ацетон 1:10	67.72

Анализ представленных в таблице данных показывает, что оптимальным соотношением сырье:реэкстрагент для максимального извлечения полифлаванов, при использовании 50% ацетона, является - 1:5, увеличение выхода целевой группы БАВ при большем содержании реэкстрагента незначительно, и, как следствие, экономически не эффективно.
Для повышения селективности осаждения полифлаванов из общих экстрактов, исследовали возможности их дробной седиментации – антипирином, нитрозометилуретаном, солями одно- и двухвалентной меди (таблица 3).

Таблица 3 - Выход суммы полифлаванов при дробной седиментации, в % от содержания в растении

Осадитель / соотношение	Выход полифлаванов	Осадитель / соотношение	Выход полифлаванов
Антипирин 3%	77.81	CuCl 5%	79.08
Антипирин 5%	79.35	CuCl 10%	82.74
Антипирин 7%	82.54	CuCl 15%	86.62
Антипирин 10%	84.70	CuCl 20%	87.27
Нитрозометилуретан 3%	74.92	$CuSO_4$ 5%	76.40
Нитрозометилуретан 5%	77.48	$CuSO_4$ 10%	78.11
Нитрозометилуретан 7%	79.83	$CuSO_4$ 15%	80.34
Нитрозометилуретан 10%	80.72	$CuSO_4$ 20%	83.59

Данные таблицы 3 доказывают, что по эффективности седиментации полифлаванов можно вывести следующий ряд: нитрозометилуретан > соли двухвалентной меди > антипирин > соли одновалентной меди, причем, если для всех изученных осадителей, в целом выполняется общая закономерность, что при увеличении концентрации осадителя, степень извлечения целевой группы также возрастает, то оптимальные концентрации осадителей в каждом случае были различны – для нитрозометилуретана – 7%, для медного купороса – 20%, для антипирина – 10% и для хлорида закисной меди – 15%. Оптимальным седиментационным агентом для селективного осаждения полифлаванов в растительных экстрактах следует признать - CuCl 15%.
Выводы. Была проведена оптимизация метода селективного извлечения растительных полифлаванов для последующего использования в фармпромышленности. Установлено, что при использовании 50% водного ацетона в качестве реэкстрагента, в объемном соотношении 1:5 и использовании 15% раствора хлорида закисной меди, как седиментационного агента, извлечение комплекса растительных полифлаванов удается повысить в 1.64 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 R.W.Hemingway, J.J.Karchesy. Chemistry and significance of condensed tannins. - New York: Plenum Press, 1989.- 538 p.- ISBN 978-1-4684-7511-1.
2 S.K.Talapatra. Chemistry of plant natural products: stereochemistry, conformation, synthesis, biology and medicine. - London: Springer, 2015.- 1180 p.- ISBN 978-3-642-45410-3.
3 G.Brahmachari. Chemistry and pharmacology of naturally occurring bioactive compounds. - New York: CRC Press, 2013.- 582 p. ISBN 978-1-4398-9167-4.
4 В.А.Куркин. Фармакогнозия.- Самара: Офорт, 2007.- 1238 с.- ISBN 978-5-473-00307-9.
5 М.К.Кукенов. Лекарственные растения Казахстана и их использование.- Алматы: Ғылым, 1996.- 344 с.- ISBN 5-628-01906-2.
6 G.G.Nikolaeva, M.V.Lavrenteva, I.G.Nikolaeva. Phenolic compounds from several Polygonum species // Chem. Natur. Comp. – 2009. - N. 5.- P. 735-738.
7 А.В.Лазарев, С.В.Недопекина. Обзор рода Polygonum L. // Научные ведомости.- 2009.- Т. 11.– С. 18-24.
8 Р.А.Музычкина, Д.Ю.Корулькин. Методология исследования растительных метаболитов.- Алматы: MV-Print, 2012. – 324 с.- ISBN 9965-784-85-X.
9 Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Алматы: Жибек Жолы.– 2008. – Т.1. - С. 233-234.- ISBN 9965-759-97-9.

А.М. Жаркеева, А.С. Шевченко, Д.Ю. Корулькин, Р.А. Музычкина
Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті
Химия және химиялық технология факультеті

ФАРМАЦЕВТИКАЛЫҚ ӨНДІРІСТЕ ҚОЛДАНУ ҮШІН ПОЛИФЛАВАНДАРДЫ POLYGONUM HYDROPIPER L. ШӨБІНЕН БӨЛІП АЛУ

Түйін: Бұл мақалада Polygonum hydropiper шөбінен полифлавандарды бөліп шығару нәтижелері жайында баяндалған. Бұл шөп Қазақстан аумағында жабайы өсетін және көп таралған өсімдік болып табылатындықтан ол полифлавандарды бөліп алуға ыңғайлы шикізат болып табылады. Сонымен қатар барынша ыңғайлы әдістерді тандап, ең қолайлы тұндырғыш пен оның көлемін анықтадық.

Түйінді сөздер: полифлавандар, биологиялық белсенді заттар, фитопрепарат

A.M.Zharkeeva, A.S.Shevchenko, D.YU.Korulkin, R.A.Muzychkina
Al-Farabi Kazakh National University
Department of Chemistry and Chemical Technology

EXTRACTION OF POLYFLAVANS OF POLYGONUM HYDROPIPER L. HERB FOR USE IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Resume: Results of works on extraction of polyflavans of Polygonum hydropiper L. herb, which is a widespread wild-growing plant including growing in the territory of Kazakhstan, and being very perspective raw materials for extraction of polyflavans are presented in this article. The description of optimum methods of extraction of polyflavans, the choice of the best precipitator and quantity of a precipitator for the greatest exit is also given.
Keywords: polyflavans, biologically active substances, phytopreparation