

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ЗРІДЖЕНОГАЗОВИХ ЕКСТРАКТІВ ІЗ КОРЕНІВ BERBERIS VULGARIS

© Д. В. Дем'яненко

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: проведено якісний аналіз зрідженогазових екстрактів з коренів *Berberis vulgaris* методом тонкошарової хроматографії та обґрунтовано вибір оптимальної мобільної фази залежно від марки ТШХ – пластин. Показано, що фреони у суміші з певними кількостями аміаку ефективно і досить селективно екстрагують алкалоїди з коренів барбарису.

Ключові слова: тонкошарова хроматографія, екстракція, корені барбарису, алкалоїди, зріджені гази, фреон, аміак.

Вступ. На сьогодні однією з найважливіших проблем сучасного фітохімічного виробництва є стандартизація препаратів рослинного походження. Загальновідомо, що навіть зараз, у XXI сторіччі, коли наукова фармація розвивається стрімкими темпами, багато видів лікарської рослинної сировини (ЛРС) та одержаних з них субстанцій і препаратів або зовсім не мають відповідних фармакопейних монографій, або аналізуються за методиками, що є не завжди об'єктивними чи раціональними. Причинами цього є різноманітність якісного та значна варіабельність кількісного складу біологічно активних речовин (БАР) в рослинах [4]. Яскравим прикладом є корені барбарису, які добре вивчені протягом десятиріч фармакогностами та хіміками, відомі БАР, що відповідають за певну фармакологічну активність, але при цьому дана ЛРС й досі не внесена до жодної з фармакопей розвинутих країн, зокрема до Української, Європейської та Британської. Винятком можна умовно вважати Японську фармакопею JP XV [10], яка містить монографії лише на кристалічні берберину гідрохлорид та берберину таннат, проте описані в них методики аналізу придатні лише для очищених індивідуальних субстанцій на відміну від ЛРС та одержаних з неї первинних екстрактів.

Враховуючи, що корені барбарису містять комплекс алкалоїдів, при дослідженні витягів, отриманих з цієї сировини, доцільно застосовувати методи тонкошарової та/або колонкової хроматографії як безпосередньо для якісного аналізу, так і з метою очистки первинних витягів при підготовці їх до подальшого кількісного визначення БАР.

Так, наприклад, автори [3] використовували аналогічний методологічний підхід при ідентифікації алкалоїдів чистотілу, які є близькими за

складом та хімічною будовою до алкалоїдів барбарису.

Не менш важливою задачею фітохімічного виробництва при впровадженні нових технологій екстрагування БАР, у тому числі з використанням зріджених газів та надкритичних флюїдів, є одержання кінцевого продукту, найбільш близького за складом БАР до вихідної сировини, принаймні за якісними показниками [4].

Відомо багато публікацій стосовно аналізу алкалоїдів різних видів *Berberis* методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) [6, 7, 8, 11, 12]. В монографії [14] вказується на те, що загальним принципом вибору мобільних фаз при хроматографуванні алкалоїдів на пластинках із силікагелем є застосування сумішей полярного розчинника (метанолу, етанолу) з малополярним ділюентом – хлороформом, дихлорметаном, етилацетатом, рідше бензолом або толуолом.

Етап підготовки проби передбачає виділення з досліджуваного зразку алкалоїдів у формі солей або основ з наступною рідинною реекстракцією [5, 14]. Так, наприклад, автори [5, 9] застосовують 5–10 % водні розчини хлористоводневої або сірчаної кислоти як екстрагенти, а очистку здійснюють шляхом нейтралізації кислото середовища розчином аміаку та реекстракції суми алкалоїдів хлороформом. Проте, як було встановлено в наших попередніх дослідженнях [1], водні та спиртові розчини кислот екстрагують велику кількість баластних речовин, які адсорбують на собі алкалоїди та значно утруднюють розділення фаз при подальшій рідинній екстракції. Тому в аналітичній практиці більш доцільно виділяти протоберберінові алкалоїди органічними розчинниками [2].

Для тонкошарового хроматографування вищезазначених БАР використовується значний

діапазон мобільних фаз. В роботі [6] показано можливість розділення ятрорицину, берберину та магнофлорину на пластинках із силікагелем фірми «Merck» у високополярних системах: етанол – вода – аміак (7:2:1) та метанол – діетиламін (4:1).

Іншими полярними системами, придатними для ТШХ – аналізу алкалоїдів барбарису та чистотілу, є пропанол – мурашина кислота – вода (90:1:9) [3, 8, 13] та бутанол – етилацетат – мурашина кислота – вода (30:50:10:10).

Автори [7] використовували для хроматографування суми алкалоїдів *Berberis vulgaris* малополярну систему розчинників бензол – метанол (8:2), при цьому хроматографічну камеру попередньо насичували парами аміаку. В дослідженнях [11] також вказується на застосування аміаку для часткової дезактивації силікагельного шару та покращення умов розділення протоберберінових алкалоїдів з коренів *Coptidis*.

В усіх проаналізованих літературних джерелах стосовно зазначених алкалоїдів вказувало, що стадії їх виділення та очистки проводили за традиційними методами. Нами вперше були одержані БАР з коренів барбарису за новою технологією з використанням зріджених газів та їх сумішей. Тому виникає необхідність у дослідженні якісного складу виділених екстрактів.

Таким чином, метою даної роботи є проведення якісного аналізу зрідженогазових екстрактів з коренів *Berberis vulgaris* методом ТШХ та обґрунтування вибору оптимальної мобільної фази і марки ТШХ – пластини.

Методи дослідження. У даних дослідженнях вихідною сировиною були 2 серії коренів барбарису звичайного (*Berberis vulgaris*), заготовлені на півдні України в 2008 й 2009 роках (відповідно серія 1 та 2). Вказану ЛРС з вологістю 8,5–11,0 % подрібнювали до розмірів часток 0,5–1,4 мм та завантажували наважки по 100–150 г у два паралельно з'єднані перколятори створеної нами дослідної установки для екстрагування докритичними зрідженими газами або їх сумішами.

Екстракти одержували так. На першій стадії проводили видалення супутніх ліпофільних сполук при температурі 10 °С, перколюючи наважки сировини серії 1 зрідженим дифторхлорметаном (фреоном-22) 4 рази по 2 години. Потім конденсатор з фреоном-22 охолоджували агрегатом до -40 °С та заправляли туди із балона зріджений аміак з розрахунку 2 % (мас.) останнього у суміші.

Після цього здійснювали 5-ступеневу екстракцію шроту, що містився в перколяторах, одержаною сумішшю, послідовно комбінуючи на кожному ступені мацерацію протягом 60–120 хв (за

винятком першого ступеня, де вказана операція не проводилася) з перколяцією тривалістю 45–90 хвилин. Температура в екстракторах становила +35–45 °С, крім 5-го ступеня, на якому підтримували кімнатну температуру. Після завершення кожного етапу одержані у випарнику кубові залишки (зразки 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, відповідно, етапам екстракції) розчиняли у 70 % етанолі, переносили в ділільну лійку, додавали 100 мл 5 % сірчаної кислоти, тричі очищали гексаном (порціями 20, 20 і 10 мл). Органічні шари відкидали, кислотний – підлужували 25 % розчином аміаку до рН≈9, екстрагували основи алкалоїдів хлороформом три рази порціями по 15 мл, після чого додавали 10 мл 40 % розчину натрію гідроксиду та екстрагували ще трьома порціями по 15 мл хлороформу. Об'єднані хлороформні фази випарювали насухо. Відбирали по 0,01 г залишків, розчиняли кожний з них в 1 мл хлороформу. По 10 мкл одержаних розчинів використовували для аналізу методом ТШХ на присутність алкалоїдів.

Видалення ліпофільних сполук з наважок сировини серії 2 здійснювали, як описано вище. Потім з конденсатора дослідної установки передавлювали в балон зріджений фреон-22, вакуумували весь контур і заправляли фреоном-410А та рідким аміаком, взятими в еквівалентних масових співвідношеннях (1:1). Шрот екстрагували вказаною фреоно-аміачною сумішшю 5-ступеневу, причому мацерацію проводили без циркуляції екстрагента при температурах +20–30 °С, варіюючи тривалість даної операції на різних етапах від 2 до 48 годин, а екстракти зливали, поперемінно створюючи градієнт температури та тиску між перколяторами та забезпечуючи циркуляцію рідинної фази (за винятком 1 етапу). На ТШХ – аналіз відбирали кубові залишки, одержані на першому, другому, а для деяких систем й на третьому етапах (зразки 2-1, 2-2, 2-3 відповідно), і розчиняли їх у 70 % етанолі. Далі діяли, як описано вище для зразків серії 1, починаючи зі слів „... переносили в ділільну лійку ...”.

В експериментах також використовували екстракт коренів барбарису, одержаний з наважки сировини масою 400 г надкритичним CO₂ при температурі 50 °С, тиску 400 атм, тривалості етапів мацерації та перколяції 60 і 30 хв відповідно (зразок 3).

Аналіз суми алкалоїдів у сировині здійснювали так.

Точну наважку близько 1 г коренів барбарису, подрібнених до розмірів часток 0,5 мм, поміщали в колбу місткістю 100 мл та екстрагували тричі по 20 мл 10 % розчину льодяної оцтової кислоти в ацетоні, 2 год кожен раз. Витяги

фільтрували, об'єднували та випарювали до об'єму приблизно 10 мл. Подальші операції проводили, як описано вище для зразків серії 1, починаючи зі слів „... переносили в ділильну ліжку ...”. Одержували розчин зразка С.

Для приготування робочого стандартного зразка (РСЗ) використовували берберину сульфат з чистотою 98 % (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.; Nihonbashi-Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023 Japan), наважку якого масою 0,02 г розчиняли у 20 мл 5 % сірчаної кислоти, поміщали в ділильну ліжку, додавали туди 40 % розчин натрію гідроксиду до рН≈10 та екстрагували основу берберину хлороформом трічі порціями по 20 мл. Об'єднані хлороформні фази випарювали, після чого берберин висушували до постійної маси 0,01 г сухого залишку розчиняли в 1 мл хлороформу. По 10 мкл одержаного розчину РСЗ наносили на хроматографічні пластини.

Хроматографування проводили на пластинках із силікагелем «Silufol UV254» (Чехія), «Sorbfil - ПТСХ» та «Sorbfil - ВЭТСХ» (Росія) у наступних системах розчинників: А – етанол – вода – 25 % аміак (7:2:1); Б – бутанол – етилацетат – мурашина кислота – вода (30:50:10:10); В – пропанол – мурашина кислота – вода (90:1:9); Г – хлороформ – метанол – діетиламін (80:20:0,5) [2]; Д – толуол – етилацетат – діетиламін (70:20:10); Е – бензол – метанол (8:2) в камері, насиченій парами аміаку.

Після проходження фронту на висоту 12 см пластини виймали з камер, сушили на повітрі, переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 366 нм, потім обприскували реактивом Драгендорфа.

Результати й обговорення. Схему тонкошарових хроматограм досліджуваних зразків у полярних системах А, Б, В наведено на рисунку 1.

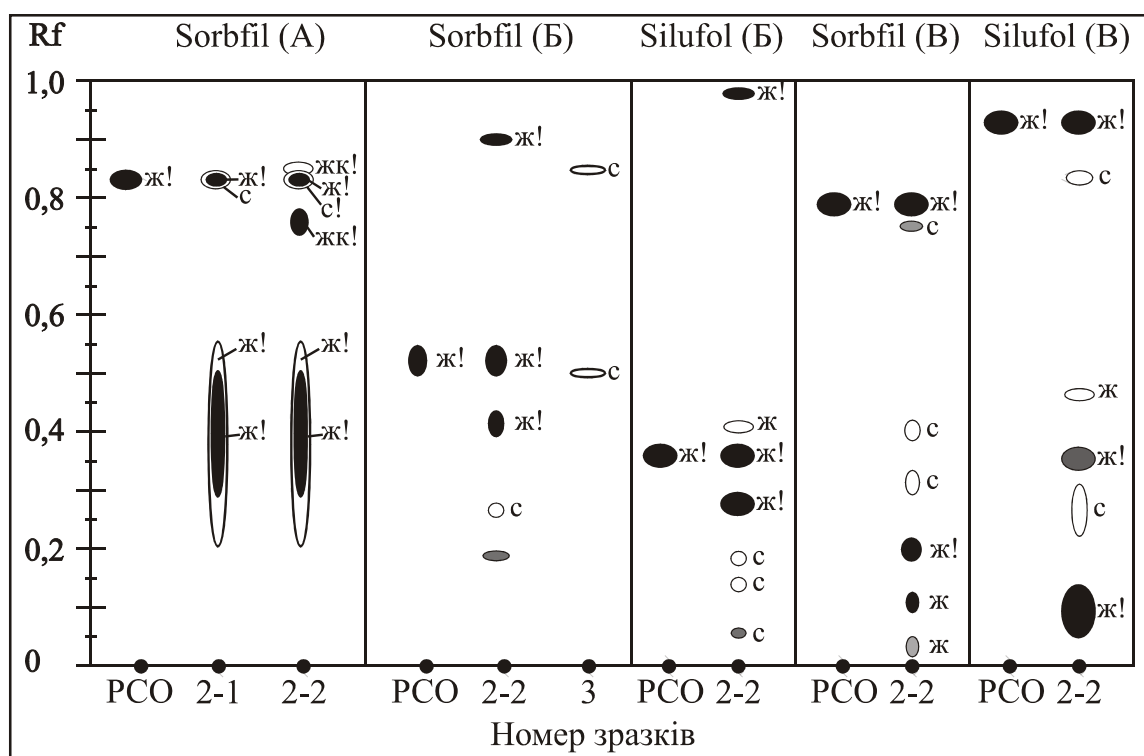


Рис. 1. Схema тонкошарових хроматограм зрідженогазових та надкритичного екстрактів коренів барбарису в полярних системах розчинників А, Б, В:

ступінь заливки плям відповідає інтенсивності забарвлення при проявленні реактивом Драгендорфа; кольори флуоресценції позначені таким чином:

ж – жовтий, с – синій, жк – жовто-коричневий; інтенсивна флуоресценція умовно відмічена знаком «!».

З одержаних даних видно, що при хроматографуванні зразків 2-1 та 2-2 в полярних системах розчинників виявили до трьох основних алкалоїдів, які давали плями з інтенсивною жовтою флуоресценцією в УФ – світлі та насиченим забарвленням при проявленні реактивом Драгендорфа, причому одна з речовин відповіда-

ла берберину. Слід зазначити, що на другому ступені одержувалися екстракти з більшим якісним складом, ніж на першому: на ТШХ- пластинках з'являлися 2-3 додаткові плями із синьою, жовтою та/або жовто-коричневою флуоресценцією, які не забарвлювалися реактивом Драгендорфа, що, ймовірно, свідчить про наявність

фенольних сполук; також в системі А виявлялася додаткова пляма алкалоїду з інтенсивною жовто-коричневою флуоресценцією ($R_f \approx 0,76$). В системах Б, В спостерігали схожу ситуацію, тому наводимо тільки схему хроматограм зразка 2-2.

При аналізі надкритичних вуглекислотних екстрактів коренів барбарису в полярних системах (А–В) не було виявлено жодного алкалоїду, з'являлися лише 2 плями зі слабкою синьою флуоресценцією в УФ-світлі (зразок 3).

Аналіз порівняння ефективності розділення речовин у зазначених мобільних фазах доводить, що в системі Б кращі результати досягали на пластині «Silufol UV254», а в системі В – на «Sorbfil-ПТСХ», причому в останньому випадку додатково виявили мінорний алкалоїд з $R_f \approx 0,03$.

Встановлено також, що значення R_f для всіх виявлених БАР й навіть послідовність розташування плям при хроматографуванні в однаковій системі значно відрізнялися одні від одних залежно від марки пластин. Крім того, згідно з літературними даними [6, 13], в системах А, Б та В на пластині «Silicagel G Merck» берберин проявляється у вигляді плям з R_f 0,53, 0,45–0,5 і 0,2–0,25, відповідно, що помітно розходиться з нашими результатами. Отже, при розробці певної ТШХ - методики необхідно зазначити марку пластини, яку передбачається застосовувати.

Враховуючи ймовірність неповного розділення алкалоїдів коренів барбарису в полярних мобільних фазах, нами було проведено хроматографування в середньополярній системі Г. Результати представлено на рисунку 2.

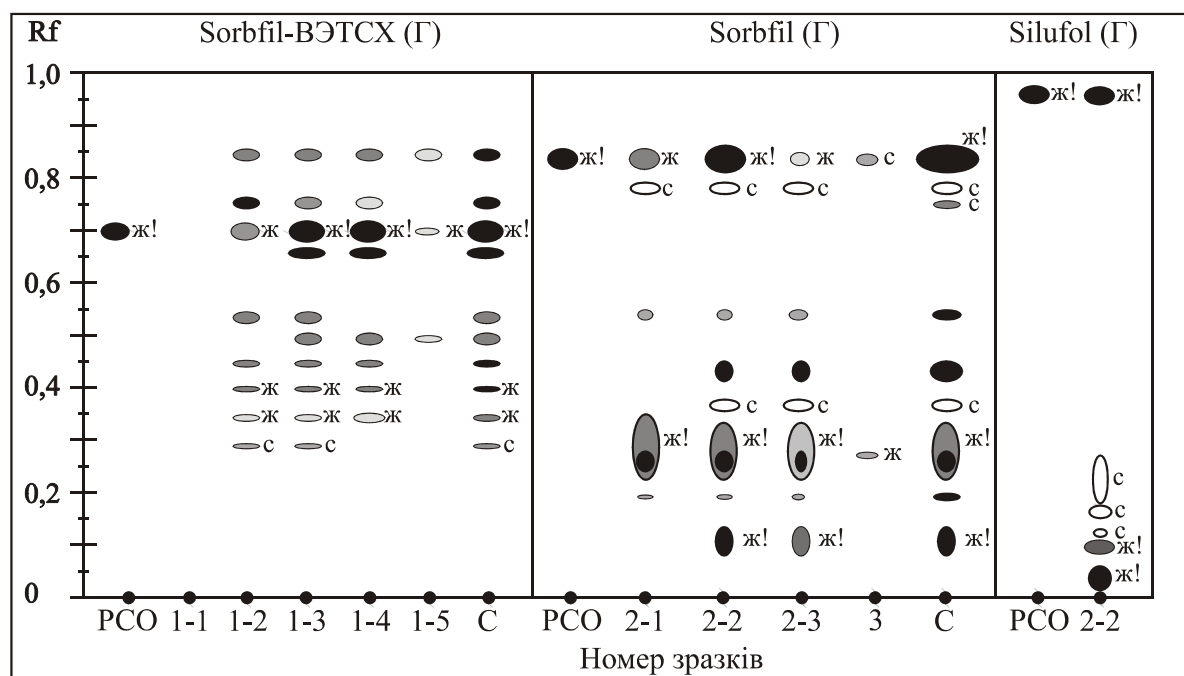


Рис. 2. Схема тонкошарових хроматограм зрідженогазових та надкритичного екстрактів коренів барбарису в системі розчинників Г: всі умовні позначення є аналогічними таким, що відображені на рисунку 1.

Встановлено, що при використанні пластин «Sorbfil-ВЭТСХ» (м. Краснодар, Росія) у зазначеній системі розчинників на хроматограмах екстрактів, одержаних з коренів барбарису сумішшю фреону-22 з додаванням 2 % аміаку (зразки 1-1–1-5), виявлялися 4-5 основних та 4-5 мінорних алкалоїдів, які за якісним складом відповідали БАР вихідної сировини (зразок С). При цьому зазначені БАР починали з'являтися на другому ступені екстракції, а їх більшість потрапляла у третій та четвертий зливи (рис. 2).

Екстракти, одержані сумішшю фреону-410А та аміаку (1:1 мас.) (зразки 2-1–2-3), містили 5 основних та 2 мінорних алкалоїди, які також відпо-

відали якісному складу вихідної сировини, причому переважна кількість даних БАР переходила у другий злив, хоча деякі алкалоїди з'являлися й у першому. Використання пластин «Silufol UV 254» замість «Сорбфілу» при хроматографуванні в системі Г призводило до значно гіршого розділення алкалоїдів (див. рис. 2).

В надкритичному CO_2 -екстракті виявлялися 2 маленькі плями зі слабкою жовтою і синьою флуоресценцією та R_f 0,25 й 0,83 відповідно, які давали слабопозитивну реакцію Драгендорфа.

При хроматографуванні в малополярних системах розчинників було встановлено (рис. 3), що застосування толуолу – етилацетату – діети-

ламіну (70:20:10) як мобільної фази (система Д) на пластинах «Sorbfil-ПТСХ» не дозволяє досягти ефективного розділення алкалоїдів барбарису: на хроматограмі з'являлася суцільна сму-

га в зоні з Rf від 0,1 до 0,45, хоча в монографії [13] вказується на придатність цієї системи для ТШХ-аналізу більшості алкалоїдів на пластинах фірми Merck.

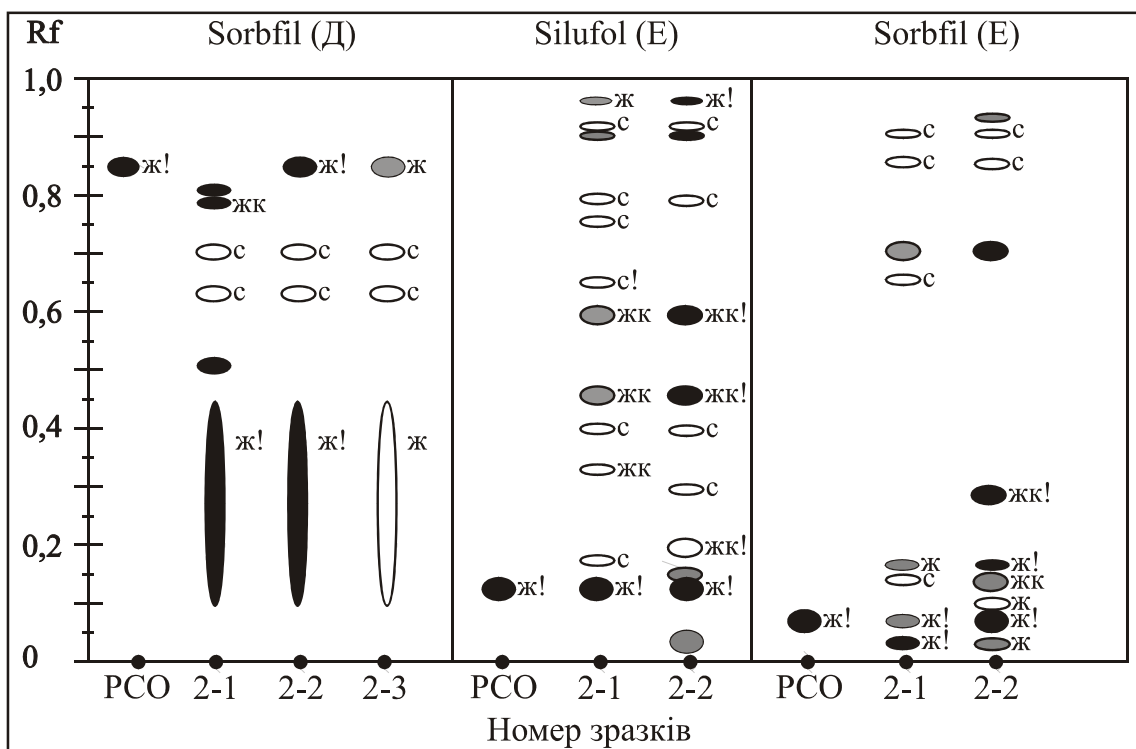


Рис. 3. Схема тонкошарових хроматограм зрідженогазових екстрактів коренів барбарису в системах розчинників Д та Е: всі умовні позначення є аналогічними таким, що відображені на рисунку 1.

З рисунка 3 видно, що в системі Е спостерігається чітке розділення не тільки алкалоїдів, але й мінорних кількостей супутніх сполук, ймовірно фенольної природи. Покращення умов хроматографування досягали за рахунок попереднього насичення камери парами аміаку [7, 11]. Так, на пластинах «Silufol» виявляли до 7 плям, що давали позитивну реакцію Драгендорфа, а також до 6 плям із синьою флуоресценцією, які відповідають кумаринам та/або фенолокислотам, і одна пляма з жовто-коричневою флуоресценцією, яка свідчить про можливу наявність флавоноїду. На пластинах «Sorbfil» також спостерігалось до 7 зон алкалоїдів, але вони були розташовані менш рівномірно, ніж на «Силуфолі».

Отже, на основі проведених експериментів можна зробити висновок, що при хроматографуванні суми алкалоїдів барбарису на пластинах «Sorbfil» найоптимальнішою мобільною фазою є система Г, а в разі використання пластин «Silufol» доцільніше обирати систему Е з попереднім насиченням камери парами аміаку. За даних умов можливо виявити до 8 алкалоїдів

як домінуючих, так і мінорних, а на пластинах «Sorbfil-ВЭТСХ» – навіть до десяти.

Висновки. 1. Методом тонкошарової хроматографії проведено якісний аналіз екстрактів з коренів *Berberis vulgaris*, одержаних сумішами зріджених газів, а також надкритичним CO₂.

2. Обґрунтовано вибір оптимальних мобільних фаз та марки ТШХ – пластин при аналізі алкалоїдів барбарису. Показано, що для пластин «Sorbfil» найоптимальнішою системою розчинників є хлороформ – метанол – діетиламін (80:20:0,5), а для пластин «Silufol» – бензол – метанол (8:2).

3. В екстрактах, одержаних сумішшю фреону-22 з додаванням 2 % аміаку, виявлено 5 домінуючих та до 5 мінорних алкалоїдів, більшість з яких вилучали на третьому та четвертому етапах екстракції. Екстракти, одержані сумішшю фреону-410А та аміаку (1:1 мас.), містили 5 основних та 2 мінорних алкалоїди, причому найбільш збагаченим був другий злив.

4. Встановлено, що надкритичний CO₂ в досліджуваному режимі екстрагував дуже незначну кількість алкалоїдів з коренів барбарису.

Література

1. Демьяненко В. Г. Разработка методик стандартизации корней барбариса / В.Г. Демьяненко, Самер Жехжах, Д. В. Демьяненко // Тези доп. II Міжнародної науково-практичної конференції «Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономічні дослідження лікарських засобів та біологічно активних добавок», 12-13 жовтня 2006 р., м. Харків. – Х.: Вид-во НФаУ, 2006. – С. 48–49.
 2. Жехжах Самер. Разработка технологии липофильного фитоконцентра противоспалительного действия и суппозиторий на его основе: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.01 / Жехжах Самер. – Х., 2007. – 170 с.
 3. Ідентифікація алкалоїдів чистотілу у м'якій лікарській формі / Ю. С. Прокопенко, В. А. Георгіянц, С. М. Губарь [та ін.] // Вісник фармації. – 2009. – Т. 57, № 1. – С. 15–18.
 4. Смалюх О. Г. Оцінка складу та вмісту біологічно активних речовин рослинних екстрактів, отриманих за різними технологіями / О. Г. Смалюх, С. В. Сур // Фармацевтичний часопис. – 2010. – № 4. – С. 13–19.
 5. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species / E. Kupeli, M. Kosar, E. Yesilada [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 72. – P. 645–657.
 6. Brazdovicova B. Phytochemical research of the species Berberis julianae C. K. Schneider / B. Brazdovicova, D. Kostalova, A. Zubakova // Cesk. Farm. – 1977. – Vol. 26, № 4. – P. 131–132.
 7. Dunnschichtchromatographische untersuchungen der alkaloiden von Berberis vulgaris / M. Pitea, P. Petcu, T. Goina [et al.] // Planta Med. – 1972. – Vol. 21, № 2. – P. 177–181.
 8. Govindan M. A convenient method for the determination of the quality of goldenseal / M. Govindan, G. Govindan // Fitoterapia. – 2000. – Vol. 71. – P. 232–235.
 9. Isoquinoline alkaloids from Berberis vulgaris subsp. australis / R. Suau, R. Rico, J.M. Lopez-Romero [et al.] // Phytochemistry. – 1998. – Vol. 49. – P. 2545–2549.
 10. Japanese Pharmacopoeia XV. – 15th ed. – Tokyo, 2006. – 1654 p.
 11. Peishan X. Optimization of the TLC of protoberberine alkaloids and fingerprint evaluation of the coptidis rhizome / X. Peishan, Y. Yuzhen, L. Qiaoling // J. Planar Chromatogr. – 1992. – № 5. – P. 302–307.
 12. Protoberberine alkaloids from Fissistigma balansae / J. C. Chia, F. R. Chang, C. M. Li [et al.] // Phytochemistry. – 1998. – Vol. 48. – P. 367–369.
 13. Wagner H. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2nd ed. / H. Wagner, S. Bladt. – Muenchen, 2001. – 384 p.
- Waksmundzka-Hajnos M. Thin layer chromatography in phytochemistry / Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. – Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. – 874 p.

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА СЖИЖЕННОГАЗОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ КОРНЕЙ BERBERIS VULGARIS**Д. В. Демьяненко***Национальный фармацевтический университет, Харьков*

Резюме: проведен качественный анализ сжиженногазовых экстрактов из корней *Berberis vulgaris* методом тонкослойной хроматографии и обоснован выбор оптимальной мобильной фазы в зависимости от марки ТСХ – пластин. Показано, что фреоны в смеси с определенными количествами аммиака эффективно и достаточно селективно экстрагируют алкалоиды из корней барбариса.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, экстракция, корни барбариса, алкалоиды, сжиженные газы, фреон, аммиак.

STUDY OF THE QUALITATIVE COMPOSITION OF CONDENSED GAS EXTRACTS FROM BERBERIS VULGARIS ROOTS**D. V. Demyanenko***National Pharmaceutical University, Kharkiv*

Summary: qualitative analysis of condensed gas extracts from roots of *Berberis vulgaris* was carried out by the method of thin-layer chromatography and the choice for optimal mobile phase was made depending on the grade of TLC – plates. It was found out that Freons mixed with certain quantities of liquid ammonia can extract alkaloids from barberry roots efficiently and selectively enough.

Key words: thin-layer chromatography, extraction, barberry roots, alkaloids, condensed gases, Freon, ammonia.