

УДК 615.322:54.05

Н. А. КОВАЛЕНКО¹, А. В. ЯНЦЕВИЧ², Г. Н. СУПИЧЕНКО¹, В. Н. ЛЕОНТЬЕВ¹**ВЛИЯНИЕ ВИДА СЫРЬЯ И УСЛОВИЙ ОБРАБОТКИ НА СОДЕРЖАНИЕ ГИПЕРИЦИНА В ЭКСТРАКТАХ ТРАВЫ ЗВЕРБОБОЯ (*HYPERICUM*)**¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, e-mail: chembstu.rambler.ru,²Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 02.10.2014)

Введение. Растения семейства *Hypericum* и препараты из них широко используются в современной медицине в качестве антибактериальных, противовоспалительных, антидепрессантных и фотосенсибилизирующих лекарственных средств [1].

Основными биологически активными веществами травы зверобоя являются флавоноиды, производные антрацена, флюороглюцины, дубильные вещества, эфирное масло [2]. Уникальные и наиболее ценные биологически активные соединения травы зверобоя – производные антрацена, представленные гиперипицином и его изомерными формами. По литературным данным [3–6], содержание гиперипицина в растениях семейства *Hypericum* L. в существенной степени зависит от вида зверобоя, климатических и географических условий их произрастания и ряда других факторов. Поскольку трава зверобоя широко распространена на территории Республики Беларусь, она может служить доступным и дешевым сырьем для извлечения гиперипицина.

Цель настоящей работы – изучение влияния вида растительного сырья и условий экстракции на степень извлечения гиперипицина из травы зверобоя.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы воздушно-сухие образцы надземной части зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. (сорт Янтарь), зверобоя олимпийского *Hypericum olympicum* L., зверобоя густоцветкового *Hypericum densiflorum* L. Растительное сырье было получено на интродукционных участках Центрального ботанического сада НАН Беларуси в 2012 г. Сбор надземной части образцов травы зверобоя осуществляли в фазу цветения в период с июня по август с соблюдением общих правил сбора лекарственных растений.

Экстракты получали с применением двухфазной системы растворителей при комнатной температуре и непрерывном перемешивании в течение 90 мин. В качестве экстрагирующей системы использовали смесь растворителей – хлороформ : этанол : вода (8 : 10 : 10) [6]. Подготовку и очистку растворителей осуществляли по традиционным методикам [7]. Дубильные вещества из экстрактов зверобоя осаждали добавлением 1%-ного водного раствора желатины (Serva).

Качественный и количественный анализ гиперипицина в экстрактах проводили методами электронной спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В качестве стандартного образца использовали гиперипицин производства Carl Roth GmbH (Германия). Спектрофотометрический анализ проводили на приборах ПЭ-5400УФ и Solar CM2203, ВЭЖХ-анализ – с использованием хроматографа Accela, оснащенного диодно-матричным детектором.

Результаты и их обсуждение. С целью выявления наиболее перспективного растительного сырья отечественного происхождения было проведено спектрофотометрическое изучение экстрактов из травы зверобоя различных видов.

Анализ литературных данных [4–6, 8] и полученных нами электронных спектров поглощения показал, что спектры стандартного раствора гиперипицина и растворов экстрактов зверобоя носят сходный характер. В спектрах присутствуют полосы поглощения в УФ и видимой областях, однако интенсивность этих полос в стандартном растворе гиперипицина и образцах экстрактов различается.

В спектре стандартного раствора наиболее интенсивной является полоса с максимумом $\lambda \approx 590$ нм. Интенсивное поглощение экстрактов в УФ-области представляет собой наложение полос поглощения как гиперического, так и сопутствующих соединений. Поэтому при расчете концентрации гиперического в экстрактах зверобоя использовали в качестве аналитической длину волны $\lambda \approx 590$ нм.

На основании значения молярного коэффициента поглощения стандартного раствора гиперического при $\lambda \approx 590$ нм были рассчитаны концентрации антраценпроизводных в полученных извлечениях в расчете на гиперичесин (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Содержание гиперического в экстрактах некоторых видов *Hypericum L.* по данным электронной спектроскопии ($\lambda \approx 590$ нм)

Вид зверобоя	Содержание гиперического, мас.%
<i>Hypericum perforatum L.</i>	0,84
<i>Hypericum olympicum L.</i>	0,15
<i>Hypericum densiflorum L.</i>	0,06

Согласно данным табл. 1, наибольшее содержание гиперического наблюдается в траве зверобоя продырявленного. Остальные виды зверобоя существенно уступают по этому показателю *Hypericum perforatum L.*

С целью получения препаратов с более высоким содержанием гиперического проведены исследования по выбору и оптимизации условий последующей очистки экстракта зверобоя продырявленного.

Известно [9], что дубильные вещества, входящие в состав экстрактов зверобоя, можно удалять обработкой различными растворителями с последующим выпариванием экстрактов и обработкой последних ацетатом меди или свинца, хлоридом натрия и другими реагентами. Однако тяжелые металлы являются токсичными и их использование для обогащения экстрактов зверобоя гиперичесином недопустимо.

С целью очистки экстракта нами предложен эффективный способ удаления дубильных веществ с использованием водных растворов желатины. Проведенные исследования позволили выбрать оптимальные условия обработки, включающие обработку экстракта 1%-ным раствором желатины в объемном соотношении 8–25 : 1. Выпавший осадок комплекса дубильных веществ впоследствии удаляют центрифугированием. Эффективность удаления подтверждается изменениями электронных спектров поглощения растворов экстрактов до и после обработки раствором желатины, в частности снижением поглощения в коротковолновой области спектра (рис. 1).

По литературным данным [10], гиперичесин растворим в большинстве органических растворителей, в воде растворяется только при высоких значениях pH.

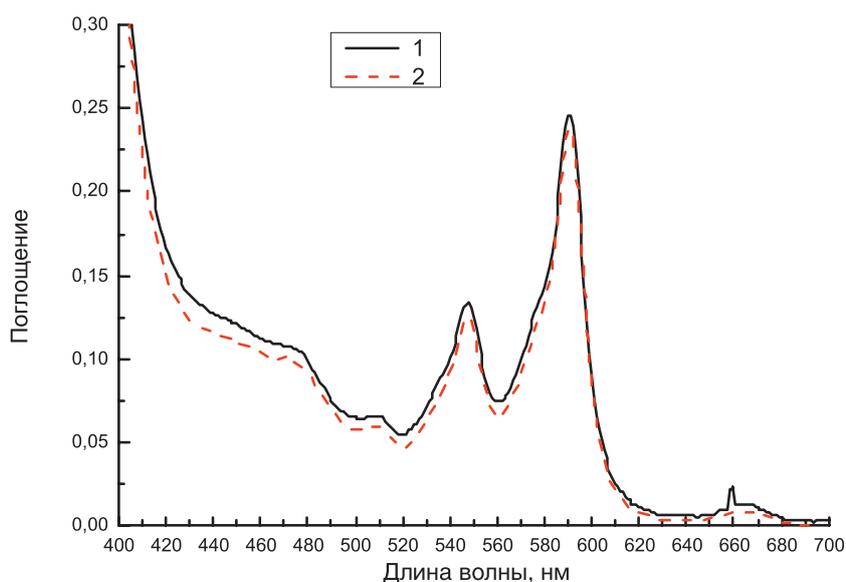
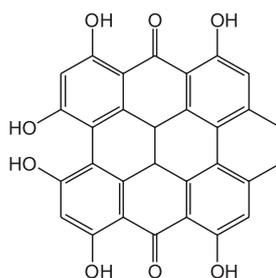


Рис. 1. Электронные спектры поглощения экстракта до (1) и после обработки раствором желатины (2)

В молекуле гиперидина присутствуют как кислотные, так и основные функциональные группы. При этом значения pK_a гидроксильных групп зависят от их положения:



Для соседних групп $pK_a = 1,8$, в то время как для гидроксильных, располагающихся в соседних с карбонилем положениях, $pK_a = 9,2$. Поэтому соседние гидроксильные группы обладают более высокой способностью к отщеплению протонов и образуют в щелочной среде соответствующие анионы гиперидина.

Исходя из различий кислотно-основных свойств гиперидина и примесных компонентов, мы предложили схему дальнейшего обогащения экстракта гиперидином, заключающуюся в следующем.

После удаления комплекса дубильных веществ и вакуумной концентрации раствора при температуре ниже $45\text{ }^\circ\text{C}$ экстракт зверобоя продырявленного растворяли в 0,2%-ном водном растворе аммиака. После центрифугирования окрашенный фильтрат, содержащий гиперидин, обрабатывали муравьиной кислотой до $pH = 2-3$. Темно-синий осадок гиперидина после повторного переосаждения отделяли центрифугированием и к сухому остатку добавляли хлористый метилен, в котором гиперидин не растворяется. Для контроля содержания гиперидина продукты, полученные на каждой стадии обработки, растворяли в этаноле (табл. 2) и регистрировали их электронные спектры поглощения (рис. 2).

Т а б л и ц а 2. Характеристика экстракта на различных стадиях обработки

Номер фракции	Вид обработки экстракта
1	Этанольный раствор после отделения дубильных веществ
2	Этанольный раствор аммиачного экстракта
3	Фильтрат в этаноле после обработки муравьиной кислотой
4	Раствор осадка в этаноле после осаждения муравьиной кислотой
5	Фильтрат в этаноле после повторного переосаждения из аммиачного раствора
6	Этанольный раствор осадка после обработки хлористым метиленом

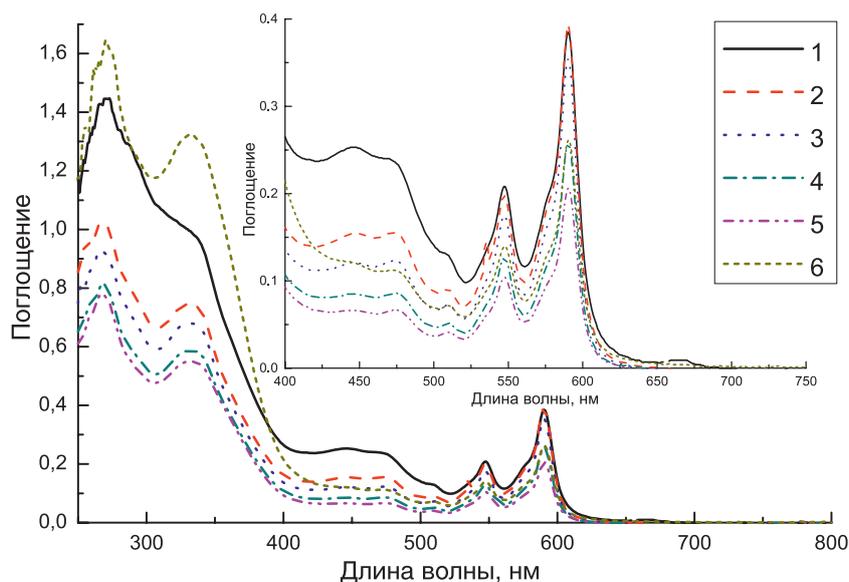


Рис. 2. Электронные спектры поглощения экстракта (табл. 2) после различных обработок

На основании значения молярного коэффициента поглощения стандартного образца гиперидина при $\lambda \approx 590$ нм в полученных фракциях были рассчитаны концентрации этого соединения (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Влияние вида обработки на содержание гиперидина в экстракте

Номер фракции	Вид обработки	Содержание гиперидина, мас. %
1	После обработки раствором желатины	1,07
2	После экстракции раствором аммиака	2,98
6	После обработки раствором муравьиной кислоты и хлористым метиленом	5,91

Подтверждением спектрофотометрических данных являются результаты ВЭЖХ экстракта зверобоя до (рис. 3, а) и после проведения очистки (рис. 3, б). Пики со временем удерживания

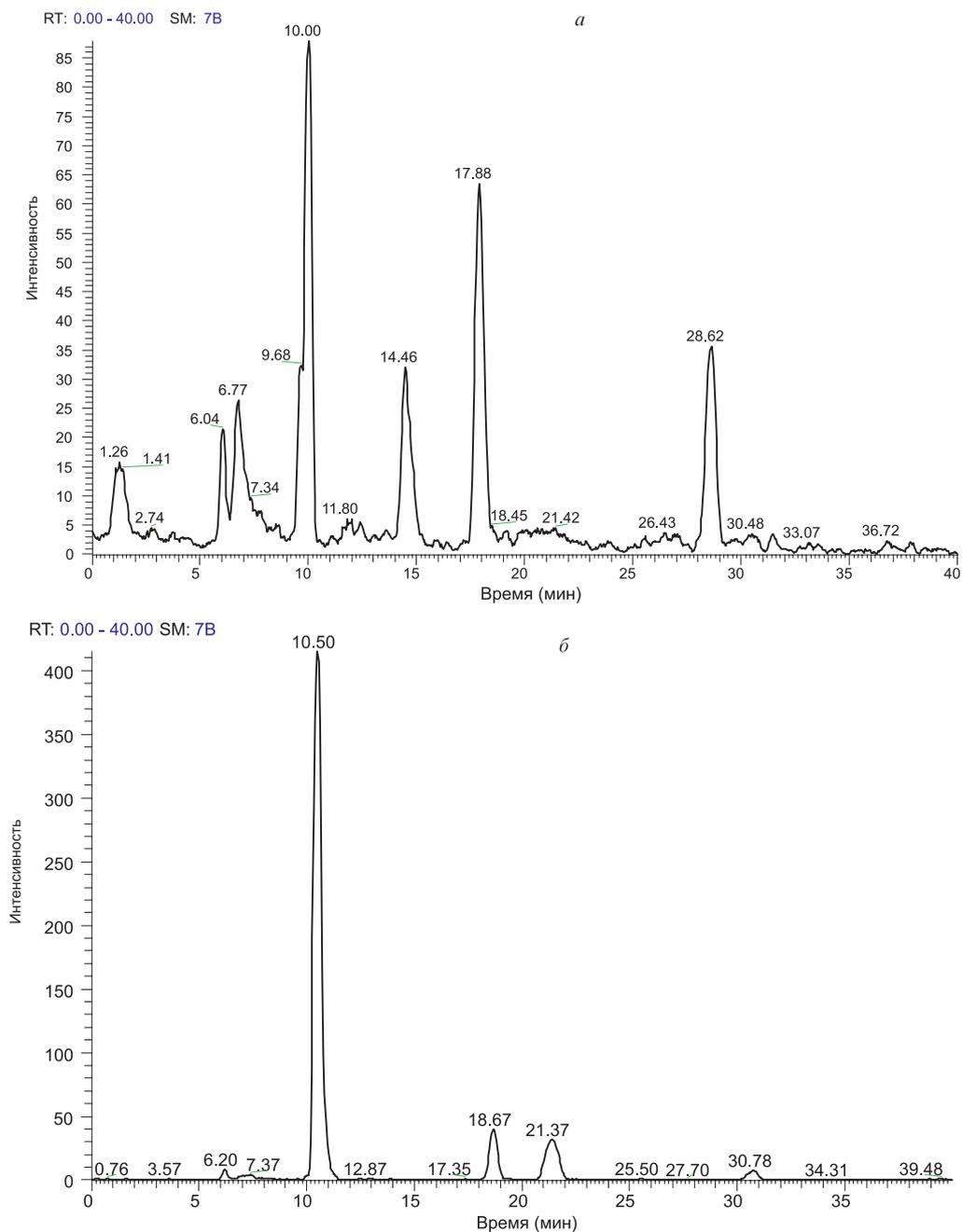


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограммы этанольных растворов неочищенного экстракта (а) и после его очистки (б)

около 10 мин (длина волны детекции 590 нм) соответствуют гиперину. Сравнение ВЭЖХ-хроматограмм показывает высокую эффективность предложенной схемы очистки экстракта зверобоя продырявленного.

Заключение. Наиболее перспективным растительным сырьем отечественного происхождения является трава зверобоя продырявленного. Обработка экстрактов *Hypericum perforatum* L. по предложенной схеме позволяет получать препараты с содержанием гиперина не менее 5 мас.%.

Литература

1. Георгиевский В. П., Комиссаренко Н. Ф., Дмитрук С. Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск, 1990. С. 238–242.
2. Куркин В. А. Фармакогнозия: Учебник для фармац. вузов. 2-е изд., перераб. и доп. Самара, 2007.
3. Bruni R., Sacchetti G. // *Molecules*. 2009. Vol. 14. P. 682–725.
4. Правдивцева О. Е., Куркин В. А. // *Химия растит. сырья*. 2009. № 1. С. 79–82.
5. Kitapon M. K. // *Biochem. Syst. Ecol.* 2001. Vol. 29. P. 171–178.
6. Сорокин В. В., Каухова И. Е., Вайнштейн В. А. // *Фармация*. 2007. № 4. С. 34–35.
7. Perrin D. D., Armarego W. L. F., Perrin D. R. Purification of laboratory chemicals. Oxford, etc.: Perg. Press, 1986.
8. Куркин В. А., Правдивцева О. Е., Зимица Л. Н. // *Фармация*. 2007. № 4. С. 12–14.
9. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармац. вузов / Е. Я. Ладыгина и др.; под ред. Н. И. Гринкевич. М., 1983. С. 70–81.
10. Vano G. // *J. Phys. Chem. B*. 2011. Vol. 115, N 10. P. 2417–2423.

N. A. KAVALENKA, A. V. YANTSEVICH, H. M. SUPICHENKA, V. N. LEONTIEV

THE INFLUENCE OF RAW MATERIAL TYPE AND TREATMENT CONDITIONS ON THE HYPERICIN CONTENT IN ST. JOHN' WORTH EXTRACTS

Summary

It was found that the most promising raw materials of domestic origin for the isolation of hypericin is the herb St. John's worth. An effective scheme of purification of *Hypericum perforatum* extracts, allowing in optimal conditions to obtain drugs with hypericin content of not less than 5 wt.% , was proposed.