

УДК 616.36] 002 - 099.3 / 098

©Коллектив авторов

## УСКОРЕННАЯ ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ.

А.А. Маркарян<sup>1</sup>, Т.Д. Даргаева<sup>2</sup>, Р.Н.Аляутдин<sup>1</sup>, В.Л. Бурков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московская медицинская академия имени И.М.Сеченова, 119881 Москва, ул.М.Трубецкая,8; т. 245-86-50; эл.почта: markaria@rol.ru;

<sup>2</sup>Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН, Москва;

<sup>3</sup>Институт химической физики им.Н.Н.Семенова РАН, Москва.

Предложен простой метод выделения и очистки суммарной фракции полифенолов из препаратов сухих экстрактов лекарственных растений ("Фитопрост"), основанный на комбинации каскадной ультрафильтрации на мембранах с пределами эксклюзии 1,0 и 5,0 кДа и полупрепаративной быстрой хроматографии на фенил-сефарозе 4В-CL. Разработанная процедура впервые позволила получить высокоочищенную (содержание примесей ароматических и гетероциклических компонентов не более 0,5-0,6%) фракцию растительных полифенолов в количестве, достаточном для фармакологического/биохимического тестирования ( $0,85 \pm 0,06$  А<sub>280</sub>/г сухого экстракта), в течении 8-9 часов непрерывного эксперимента.

**Ключевые слова:** полифенолы, фенил-сефароза, "Фитопрост".

**ВВЕДЕНИЕ.** Исследования последних лет убедительно показали способность полифенолов растительного происхождения играть роль модуляторов метаболических реакций, зависящих от свободнорадикальных процессов *in vivo* [1]. Так, полифенолы корней лимонника активно ингибируют перекисное окисление липидов в микросомах, изолированных из стареющих культур клеток HeLa и L3 [2], а вещества этой группы из листьев зеленого чая замедляют развитие химического канцерогенеза у мышей, вызванного этилтиомочевинной, и сопровождающегося избыточным формированием супероксид-радикалов в митохондриях [3].

Получение высокоочищенных препаратов полифенолов из лекарственных растений, необходимость которого диктуется возрастающим интересом к биологической активности этих соединений [4], является задачей, решение которой невозможно без создания эффективных и, насколько возможно, простых, то есть исключаящих многоступенчатые хроматографические процедуры, методик. В рамках программы по их разработке нами предложен подход, основанный на быстрой гидрофобной хроматографии низкополимерных компонентов отечественного фитопрепарата "Фитопрост", представляющего собой сухой экстракт, полученный из листьев толокнянки, ортосифона, травы горца птичьего, корней солодки, цветков календулы [5].

## ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

**МЕТОДИКА.** Экстракцию полифенол-содержащей фракции препарата "Фитопрост" осуществляли в течении 1 часа при 40°C, используя 80% водный раствор этилацетата (1: 100, вес/объем). Из полученного экстракта выделяли пул компонентов с молекулярными массами, превышающими 1,0 кДа, с помощью ультрафильтрации растворов на мембранах Diaflo YM-1,0 ("Amicon B.V.", Голландия), 800 p.s.i. Фильтраты отбрасывали, а удержанный мембранами материал растворяли в 60% этилацетате (15мл/мембрана) и подвергали повторной ультрафильтрации, помещая в ячейки аппарата Amicon MMC 600 ("Amicon Corp.", США) мембраны Diaflo YM 5,0 ("Amicon B.V.", Голландия), 600 p.s.i. Полученные фильтраты, содержащие вещества со значениями молекулярных масс в пределах 1,0-5,0 кДа, упаривали в роторном испарителе до конечных объемов 1,5-2,0 мл и затем наносили на колонку 1,0x8,0 см с фенил-сефарозой 4В-С1., содержащей 12-агомный эпокси-спейсер, фиксирующий на агарозной матрице фенил-радикал эфирной связью ("Pharmacia", Швеция), уравновешенную буфером 10 мМ HEPES (рН 7,6)-НС1/0.4М NaCl. Разделение компонентов образца начинали, используя уравновешивающий буфер в качестве элюата в первые 10 мл элюции при скорости 0,2 мл/мин (20-25°C), после чего на колонку подавали нисходящий линейный градиент концентрации NaCl (0,3-0,05 М, 0,35 мл/мин, 20-25°C). Профиль элюции регистрировали и по оптической плотности при 280 нм в проточной СФ-камере Uvicord-IV ("LKB", Швеция), градиент элюции программировали и формировали в системе SL-016 SOREQ ("Shimadzu", Япония). Порции элюата, собранные последовательно по 2,0 мл, анализировали с целью идентификации содержащихся в них компонентов, с помощью газ-хроматомасс-спектрометрии ионизации/десорбции поля (Field Desorption/Ionization Gas Chromato-Mass - Spectrometry, FDI-GCMS) по методу Leder и соавт. [6] в установке Dorwatt 4000 DXL ("Varian", США).

Для автоматизированной расшифровки масс-спектров применяли программу Sigma MS 430 Dataflow ("Orion Instruments", Англия), адаптированную для аналитического блока HP 9815 ("Hewlett Packard", США) в соответствии с рекомендациями Rattenau и Thornwall [7].

УФ-спектры первичных этилацетатных экстрактов, а также коммерческого стандарта полифенола,  $n = 150-200$  ("Sigma", США) и хроматографически выделенной полифенольной фракции регистрировали с помощью спектрофотометра Hitachi RG 220- ScanLab ("Hitachi", Япония).

В работе приведены средние величины 8-ми экспериментов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Предлагаемый нами метод позволяет достичь полного выделения фракции полифенолов (рис.1), расходуя не более 9 часов на проведение всего непрерывного цикла препаративных процедур. Итоговый выход выделяемой фракции составлял  $0,85 \pm 0,06 A_{280}$  на 1 мг сухого растительного экстракта, что говорит о 90-95%-ном извлечении полифенольных соединений [5]. Сравнительная УФ-спектрофотометрия нефракционированного препарата, его хроматографически очищенной полифенольной фракции и полифенол-стандарта (рис.2) говорит о высокой степени очистки растительных полифенолов, допускающей присутствие незначительных, до 0,5-0,6%, примесей ароматических и гетероциклических компонентов [8].

Полученные данные (рис.1,2) хорошо согласуются с ранее опубликованными сведениями о составе и спектральных характеристиках препарата "Фитопрост", указывающими на наличие пиков поглощения при 250-290 и 320-380 нм, что давало основание для предположения о сосуществовании фракций полифенолов, флавонов и флавоноидов [5]. Этим обстоятельством объясняется, по-видимому, неудовлетворительные результаты работы Milic и Kudrja, предпринявших попытку выделения растительных флавонов и полифенолов на колонках с гидроксиапатитом [9]. Известно, что качественное хроматографическое разделение флавонов, флавоноидов, полигетероциклических и полифенольных веществ представляет весьма непростую в техническом отношении задачу [1,9]. Эта задача решена нами благодаря использованию фенил-сефарозы-агарозного

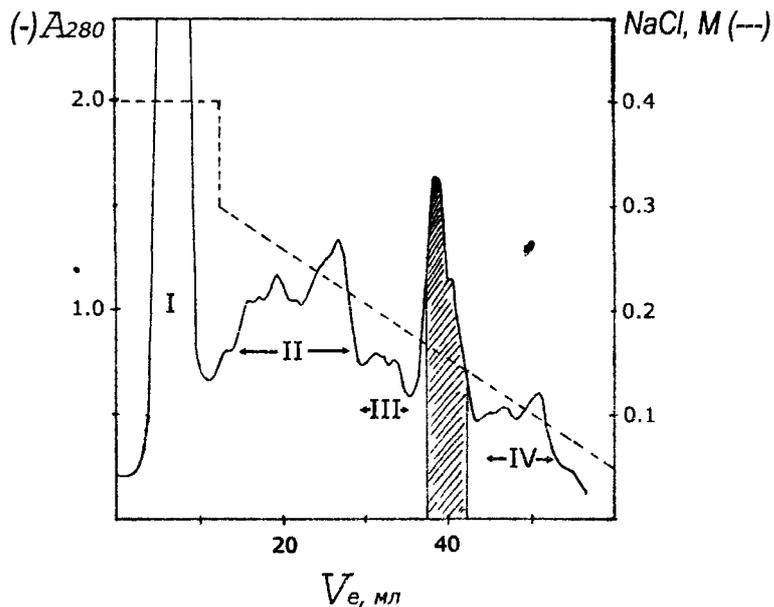


Рисунок 1

Гидрофобная хроматография фракции низкополимерных (1,0-5,0 кДа) компонентов этилацетатного экстракта препарата "Фитопрост" на колонке с фенил - сефарозой 4В - СL. Защищенная область соответствует порциям элюата, содержащим полифенольные соединения. I - суммарная фракция пептидов, олигонуклеотидов и олигогексозаминов; II - фрагменты протеогликанов; III - гистидин - богатые пептиды; IV - оксипролин / пролин - богатые пептиды. Идентификация компонентов осуществлена хроматомасс - спектрометрически (см. "Методика")

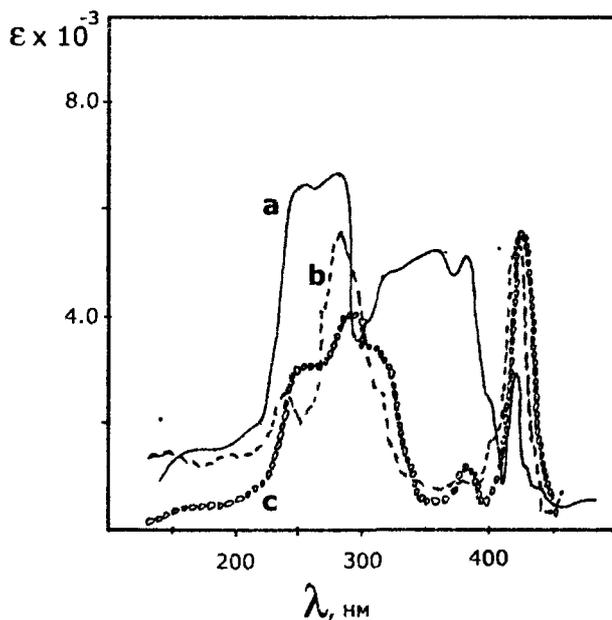


Рисунок 2.

УФ - спектры грубого этилацетатного экстракта препарата "Фитопрост" (а), его хроматографически очищенной полифенольной фракции (в) и коммерческого стандарта полифенола (с). Спектры регистрировались для образцов, содержащих 80% этилацетат, 0,5-0,8  $A_{280}$  / мл, 22-25°C, pH 5,8.

## ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

носителя, крупнопористый матрикс которого содержит высокую концентрацию иммобилизованных фенилгрупп, ранее применявшегося исключительно для фракционирования белков и нуклеиновых кислот. Мы полагаем, что методика, предложенная нами, будет полезна как инструмент дальнейших исследований биологически активных полифенолов лекарственных растений.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Allbright, K.D., Wilczarek, S.L.* (2001) *Biopharmacy and Plant Polyphenols*. Alba Regia Publ.: Szeged - Budapest.
2. *Barthels, O., Darnell, J.E., Dubuque, S., Rallstrom, S., Sorensen, K.L.* (1998) *Progr. Mol. Pharmacol. Toxicol. Res.*, **18**, 21-36.
3. *Wang, Z.Y., Lee, P.K., Thorwaldsen, D., Lebreu, N.M.* (1989) *Carcinogenesis*, **10**, 411-415.
4. *Namura, S., Ohta, K., Katoh, J., Ueda, Y.* (2003) *J. Pharm. Soc. Japan*, **48**, 211-230.
5. *Маркарян А.А., Даргаева Т.Д., Николаев С.М., Николаева Г.Г.* (2003) *Мат.науч.конф. "Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов"*. Москва, с.225.
6. *Leder, O.H., Schmidt, K., Sarcar, J.* (1998) *Mass Spec. Res.*, **19**, 298-309.
7. *Rattenau, V., Thornwall, L.* (2000) *Computat. Chem. Biochem.*, **6**, 91-114.
8. *Warrenbaum, K.* (1999) *UV - Spectrometry in Biopharmacy and Forensic Studies*. Ehrlich Schaumitter: Heidelberg.
9. *Milic, M., Kudrja, M.* (2001) *Acta Biol. Med. Slovenica*, **10**, 811-820

Поступила 09.10.2003.

### THE ACCELERATED HYDROPHOBIC CHROMATOGRAPHY OF PLANT EXTRACTS: A PROMISING TOOL FOR STUDY OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPHENOLS.

*A.A. Markarian<sup>1</sup>, T.D. Dargaeva<sup>2</sup>, R.N. Alyautdin<sup>1</sup>, V.L. Bourkov<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, Russia ( 119881, Moscow, M. Trubetskaya, 8; tel. 245-86-50, e-mail: markaria@rol.ru );

<sup>2</sup> Russian Institute of Herbal and Aromatic Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, Russia;

<sup>3</sup> Semenov Institute for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

A simple and efficient technique for fast isolation and purification of a total polyphenol fraction from dry herbal plant extract ("Phytoprost" preparation) has been developed. The method is based on sequential cascade of 1,0-5,0 kDa ultrafiltration and the following subsequent column chromatography of resultant oligo/polymeric compounds on Phenyl-Sepharose 4B-CL. This novel procedure allows to obtain a highly purified (not more than 0,5-0,6 % of aromatic and heterocyclic impurities) fraction of plant polyphenols in amounts required for pharmacological/biochemical screening (0,85±0,06 A<sub>280</sub> /g dry extract) within 8-9 hours.

**Key words:** polyphenols, phenyl-Sepharose, Phytoprost.