

УДК 542.06:615.322

ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ТРАВЫ *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L. НА НАЛИЧИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП БАВ

© *И.О. Суина^{1*}, И.И. Тернинко¹, Ю.Э. Генералова¹, Е.В. Бурцева², Е.С. Базанова¹*

¹ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, ул. Профессора Попова, 14А, Санкт-Петербург, 197376 (Россия), e-mail: suina.irina@pharminnotech.com

² Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, пр. Академика Вернадского, 4, Симферополь, 295007 (Россия)

Цель работы – получение фракций из травы *Aristolochia clematitidis* L. и дальнейшее изучение состава различных групп биологически активных веществ (в том числе аристолохиевых кислот), которая достигалась с помощью предварительного ТСХ-анализа, ВЭЖХ-анализа фракций. Предложена схема фракционирования извлечения из травы кирказона. Получены четыре фракции с различным распределением биологически активных веществ (хлороформная, бутанольная, этилацетатная и водная). С помощью методов ТСХ и ВЭЖХ анализа определено наличие аристолохиевых кислот только в хлороформной фракции. Это позволяет предположить, что хлороформ является избирательным экстрагентом для аристолохиевых кислот и создает перспективность для их выделения и возможного получения стандартных образцов. Методом ВЭЖХ было установлено наличие гидроксикоричных кислот в исследуемых фракциях. Наибольшее содержание коричной кислоты отмечено в хлороформной фракции. Во всех остальных фракциях содержится ее следовые количества. Кофейная кислота найдена во всех фракциях, наибольшим содержанием характеризуется бутанольная фракция. Хлорогеновая кислота присутствует в этилацетатной и бутанольной фракциях, основное ее количество приходится на 96% этанольную подфракцию этилацетатной фракции и 20% этанольную подфракцию бутанольной фракции. Также в этилацетатной фракции идентифицированы азотсодержащие вещества, предположительно алкалоидной природы, которые не являются аристолохиевыми кислотами, что создает перспективы для дальнейшего изучения этилацетатных вытяжек.

Ключевые слова: *Aristolochia clematitidis* L., фракционирование сырья, гидроксикоричные кислоты, аристолохиевые кислоты, хроматографические методы.

Введение

Аналитические показатели фармацевтического рынка говорят о положительной динамике в сфере производства и реализации фитопрепаратов (как индивидуальных природных соединений, так и комплексных растительных препаратов). Так, по данным литературы [1, 2], в РФ доля растительных препаратов составляет 25% от всех зарегистрированных лекарственных средств (ЛС). В США за последние 13 лет потребление фитопрепаратов увеличилось на 41% [3]. Однако с учетом требования доказательной медицины «структура–действие» современные фитохимические работы имеют направленность к поиску и выделению отдельных биологически активных веществ (БАВ), которые определяют фармакологическую активность [4].

Суина Ирина Олеговна – ассистент кафедры фармацевтической химии,
e-mail: Suina.irina@pharminnotech.com

Тернинко Инна Ивановна – доктор фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры фармацевтической химии, начальник испытательной лаборатории центра контроля качества лекарственных средств,
e-mail: inna.terninko@pharminnotech.com

Генералова Юлия Эдуардовна – химик-аналитик испытательной лаборатории центра контроля качества лекарственных средств,
e-mail: Generalova.Yuliya@pharminnotech.com

Бурцева Елена Владимировна – ассистент кафедры медицинской и фармацевтической химии,
e-mail: burtsevaev2009@yandex.ru

Базанова Елизавета Сергеевна – студентка,
e-mail: bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

Особенно интересны с фитохимической точки зрения растения с доказанным профилем токсичности для обоснования перспективности их

* Автор, с которым следует вести переписку.

дальнейшего использования как со стороны выделения индивидуальных соединений и получения стандартных образцов (СО), так и применения для лечения сложных патологических состояний [5, 6].

Кирказон ломоносовидный (*Aristolochia clematitis* L.) является нефармакопейным видом, который нашел применение в народной медицине [7, 8], имеет локальную, но значительную и возобновляемую сырьевую базу на территории РФ. Однако из-за токсичности [9–15], обусловленной присутствием аристолохиевых кислот, его применение ограничено, а ЛС и БАДы на его основе запрещены в большинстве стран мира. Интерес к изучению аристолохиевых кислот во всем мире очень высок. Исследования ученых разных стран направлены в основном на изучение токсичности этих соединений [16]. В Российской Федерации кирказон ломоносовидный практически не изучен, информация о его химическом составе ограничена только азотсодержащими соединениями, к которым относятся аристолохиевые кислоты [17, 18]. Фитохимическая характеристика кирказона представлена в литературе [19] данными о содержании азотсодержащих соединений, что не дает возможность оценить остальные группы БАВ и обуславливает актуальность его изучения. Причем в литературе отсутствуют данные о количественном содержании аристолохиевых кислот в траве кирказона, а также информация об их химическом поведении и выборе растворителей для их изолирования.

Ранее нами были опубликованы [20] результаты изучения липофильных соединений травы кирказона. Основные компоненты липофильной фракции – линоленовая и пальмитиновая кислоты – наиболее частые представители жирных кислот в растительных объектах, а тетрагидропираниловый эфир цитронеллола характеризует терпеновую составляющую эфирного масла кирказона, компонентный состав которого также изучен нами и представлен в публикации [21].

Фракционирование комплексной вытяжки из сырья кирказона поможет изучить распределение отдельных групп БАВ в различных фракциях и обосновать способ очистки лекарственного растительного сырья (ЛРС) (в том числе растительных сборов) от аристолохиевых кислот, а также рекомендовать схему выделения аристолохиевых кислот для наработки СО отечественного производства.

Цель данной работы – получение фракции из травы *A. clematitis* L., их дальнейшее изучение на наличие различных групп БАВ (в том числе и аристолохиевых кислот) и выбор экстрагента для изолирования токсических соединений.

Экспериментальная часть

Траву кирказона ломоносовидного (надземные части цветущего растения длиной 30 см) заготавливали на территории Белгородской области (Новый Оскол) в июне–июле 2018 г. и высушивали методом воздушно-теневого сушки.

Сырье кирказона предварительно обезжиривали методом исчерпывающего экстрагирования гексаном в аппарате Сокслета и высушивали на открытом воздухе до исчезновения запаха экстрагента. Также обезжиривание сырья проводили с использованием дихлорэтана. Гексановая и дихлорэтановая фракции содержали преимущественно липофильные соединения, которые экстрагируются неполярными растворителями.

Обезжиренную траву кирказона настаивали методом мацерации при комнатной температуре в течение 24 ч этанолом 70% (соотношение сырье – экстрагент 1 : 10), декантировали извлечение. Экстракцию повторяли трижды. Спиртовые извлечения объединяли и упаривали в вакуумном ротационном испарителе до водного остатка, который в дальнейшем трижды подвергали последовательной жидкость-жидкостной экстракции (соотношение водного извлечения и экстрагента 3 : 1) хлороформом, этилацетатом, н-бутанолом. В результате экстрагирования были получены четыре фракции: хлороформная (ХФ), этилацетатная (ЭАФ), бутанольная (БФ) и водная (ВФ). ХФ и ЭАФ упаривали в вакуумном ротационном аппарате в три раза.

Фракции очищали и разделяли методом колоночной хроматографии. В качестве сорбента для ХФ использовали силикагель марки КСК с размером частиц от 0.25 до 0.75 мм, для очистки ЭАФ и БФ использовали полиамидный сорбент, суспендированный в метаноле. Элюирование проводили в три этапа, последовательно используя по 100 мл каждого элюента: бензол, смесь бензол–хлороформ (1 : 1), хлороформ (для ХФ); смесь хлороформ–этанол 96% (1 : 1), этанол 96% и 70% (для ЭАФ); вода, этанол 10%, этанол 20% (для БФ). Собирали 12 подфракций каждой фракции в следующей последовательности: по 10 и 40 мл половины каждого экстрагента (н/р, 1.1, 1.2 – 10 и 40 мл первой порции (50 мл) первого экстрагента 6.1, 6.2 – 10 и 40 мл второй порции (50 мл) третьего экстрагента). Также, предполагая диффузию гидроксикоричных кислот (ГКК) БФ в метанол, собрали «предварительную» подфракцию (1.1.1) объемом 10 мл (до выхода элюента). Во время выделения подфракций контроль за разрешением осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в различных системах растворителей [22]. Одинаковые по характеристике и составу веществ подфракции объединяли.

Предварительный ТСХ-анализ полученных подфракций и первичных (без разделения на колонке) фракций проводили в различных системах растворителей (табл. 1). Для идентификации ГКК фракции исследовали методом ТСХ в системе 15% уксусная кислота с использованием растворов СО ГКК: кофейной (CAS 331-39-5), хлорогеновой (CAS 327-97-9), феруловой (CAS 1135-24-6), *n*-кумаровой (CAS 501-98-4), синаповой (CAS 530-59-6), розмариновой (CAS 20283-92-5) ($C=0.1$ мг/мл) и коричной (CAS Number: 140-10-3) ($C=1$ мг/мл). Идентификацию ГКК в наиболее информативных подфракциях БФ и ЭАФ проводили методом бумажной хроматографии (БХ) путем сравнения значений факторов удерживания пятен фракции и СО в системе 15% уксусная кислота после визуализации их в УФ свете при длинах волн 254 нм и 365 нм. Идентификацию аристолохиевых кислот проводили с использованием систем растворителей: муравьиная кислота–вода–пропанол-1 (1 : 9 : 90) и муравьиная кислота – вода – этилацетат – толуол (3 : 3 : 30 : 60) [23] сравнивая значения R_f пятен фракции с пятнами СО смеси аристолохиевых кислот I и II (CAS 313-67-7 и CAS 475-80-9) с концентрацией $C=0.35$ мг/мл.

После предварительного ТСХ-исследования подфракции по 10 мл объединяли с оставшейся частью подфракций.

Для подтверждения результатов, полученных методами ТСХ и БХ, фракции исследовали на наличие ГКК методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе HPLC Shimadzu LC 20 Prominence (США). Хроматографические условия: подвижная фаза ацетонитрил–вода–муравьиная кислота; колонка Zorbax XDB C18 (4.6×250 мм), заполненная частицами сорбента 5 мкм (Agilent), режим градиента: от 15% до 35% ацетонитрила в 0.1% растворе кислоты муравьиной. Скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Детектирование проводили с помощью диодно-матричного детектора. Программное обеспечение LabSolution. Идентификацию отдельных веществ проводили путем сопоставления времен удерживания пиков на хроматограммах испытуемого и стандартных растворов. В качестве стандартов использовали СО розмариновой, *n*-кумаровой, коричной, хлорогеновой и кофейной кислот (EP CRS (Sigma)) с концентрацией 0.1 мг/мл.

Для подтверждения результатов ТСХ-анализа на содержание аристолохиевых кислот фракции исследовали методом ВЭЖХ по методике, указанной в Европейской фармакопее [23] в сравнении со СО смеси аристолохиевых кислот I и II (Sigma) $C=0.35$ мг/мл. Исследование проводили с использованием системы жидкостного хроматографа Flexag с УФ/ВИД и диодно-матричным детекторами (PerkinElmer, США). Разделение веществ осуществляли с использованием колонки размером (2.1 мм×0.15 м), заполненной октадецилсилильным силикагелем *R* с размером частиц сорбента 3.9 мкм. Хроматографические условия: температура – 40 °С, скорость потока подвижной фазы – 0.3 мл/мин, объем пробы – 20 мкл. Подвижная фаза (ПФ) подавалась в градиентном режиме (табл. 2): ПФ А : трифторуксусная кислота : вода (0.1 : 99.9); ПФ В : трифторуксусная кислота : ацетонитрил (0.1 : 99.9).

Таблица 1. Предварительный ТСХ-анализ полученных фракций

Название фракций	Системы растворителей ТСХ	Детекция зон (пятен)
Подфракции и первичная ХФ	бутанол–этилацетат (9 : 1) гексан–ацетон (7 : 3)	УФ-свет при 254 нм УФ-свет при 365 нм до и после обработки аммиака раствором 10%, алюминия хлорида спиртовым раствором 3%. Детекция в видимом свете после обработки реактивами Драгендорфа и Штала, фосфорно-молибденовой кислоты спиртовым раствором 10%, йода парами.
Очищенные подфракции ЭАФ и БФ	бутанол–уксусная кислота ледяная–вода (БУВ) (4 : 1 : 2) 15% уксусная кислота	УФ-свет при 254 нм УФ-свет при 365 нм до и после обработки парами аммиака, алюминия хлорида спиртовым раствором 3%. Детекция в видимом свете после обработки парами йода
Подфракции 1 и 3 ЭАФ первичные ХФ, ВФ и БФ	муравьиная кислота–вода–пропанол-1 (1 : 9 : 90) муравьиная кислота–вода–этилацетат–толуол (3 : 3 : 30 : 60)	УФ-свет и видимый свет после обработки реактивом Драгендорфа

Таблица 2. Градиентный режим подачи ПФ

Время анализа, мин	ПФ А (об%)	ПФ В (об%)
0–25	85→35	15→65
25–30	35→0	65→100
30–31	0→85	100→15

Обсуждение результатов

Схема фракционирования извлечений из травы кирказона представлена на рисунке 1.

Исследование очищенных подфракций ХФ методом ТСХ не дало результатов, так как на хроматограмме не были идентифицированы пятна веществ. Предпринятое исследование первичной ХФ методом ТСХ в системе, для которой в качестве растворителей были использованы бензол–хлороформ (1 : 1) (элюенты для очистки ХФ), показало отсутствие в ней веществ, способных извлекаться данными растворителями, поскольку пятно первичной ХФ оставалось на линии старта. Изучение первичной ХФ дало результаты только в системе бутанол–этилацетат (9 : 1). Результаты ТСХ-анализа ХФ представлены в таблице 3. При исследовании первичной ХФ на наличие ГКК было обнаружено одно пятно в УФ-свете при $\lambda=254$ нм, которое по значению $R_f (=0.54)$ соответствует коричневой кислоте.

Подфракции ЭАФ исследовались в двух системах: БУВ (4 : 1 : 2) и 15% уксусная кислота. Вторая система оказалась менее информативной, так как некоторые вещества оставались на линии старта. Наиболее информативными оказались 1–3 подфракции ЭАФ, так как все компоненты полностью выделялись на стадии элюирования этанолом 96%. Результаты ТСХ-анализа 1–3 подфракций ЭАФ представлены в таблице 4.

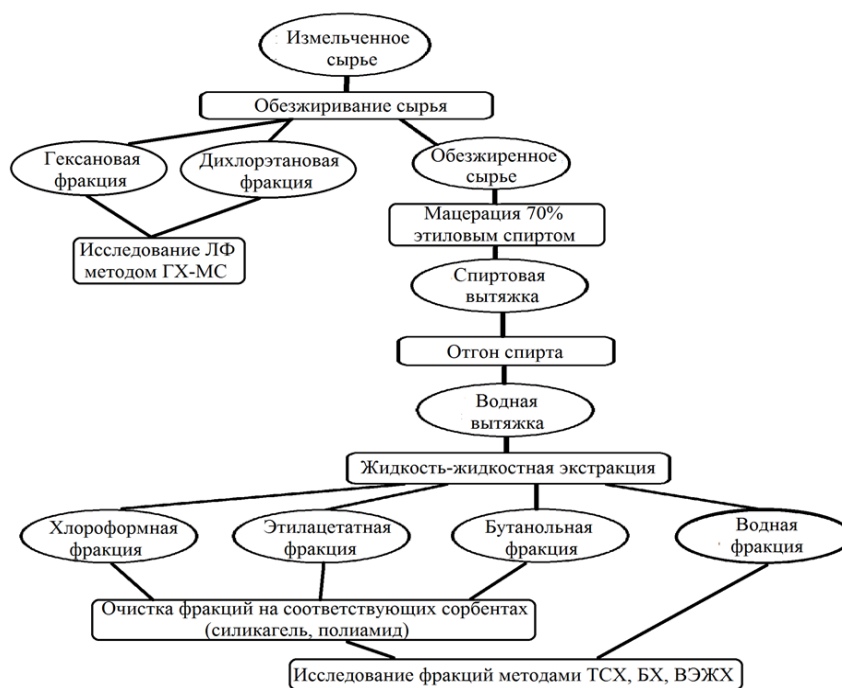


Рис. 1. Схема получения фракций из травы кирказона ломоносовидного

Таблица 3. Результаты ТСХ-анализа первичной хлороформной фракции

Видимый свет	Детекция			
	УФ-свет		После обработки реактивами	
	254 нм	365 нм	пары йода	реактив Драгендорфа
Окраска и значение R_f пятен				
желто-коричневое $R_f=0.57$	серо-коричневое $R_f=0.57$	фиолетовое $R_f=0.57$	желто-оранжевое $R_f=0.57$	оранжево-желтое $R_f=0.57$
зеленовато-желтое $R_f=0.02$	серо-коричневое $R_f=0.02$	красная флуоресценция $R_f=0.07$ и $R_f=0.87$	–	–

Таблица 4. Результаты ТСХ-анализа этилацетатной фракции

Детектирование	Системы растворителей					
	БУВ (4 : 1 : 2)			Уксусная кислота разведенная 15%		
	Подфракции					
	1	2	3	1	2	3
УФ-свет $\lambda=254$ нм	Голубая флуоресценция Rf=0.94	Голубая флуоресценция Rf=0.94	Голубая флуоресценция Rf=0.94	–	–	–
УФ-свет $\lambda=365$ нм	Голубая флуоресценция Rf=0.94	Голубая флуоресценция Rf ₁ =0.89 Rf ₂ =0.94	Голубая флуоресценция Rf ₁ =0.89 Rf ₂ =0.91 Rf ₃ =0.94	–	Голубая флуоресценция Rf ₁ =0.84	Голубая флуоресценция Rf=0.84 Rf=0.94
Пары аммиака Увеличение флуоресценции	Голубая флуоресценция Rf=0.94	Голубая флуоресценция Rf ₁ =0.89 Rf ₂ =0.94	Голубая флуоресценция Rf ₁ =0.89 Rf ₂ =0.91 Rf ₃ =0.94	–	Голубая флуоресценция Rf ₁ =0.84	Голубая флуоресценция Rf=0.84 Rf=0.94
Реактив Драгендорфа	–	–	–	На линии старта пятна красно-оранжевого цвета		

Компонентный состав ГКК в ЭАФ изучали методом БХ в системе уксусной кислоты 15%. В 3 подфракции ЭАФ в УФ-свете при длине волны $\lambda=254$ нм было обнаружено 1 пятно с желто-зеленой (Rf=0.20) и 1 пятно с голубой флуоресценцией (Rf=0.77). В сравнении со значением Rf, формой и окраской пятен СО установили наличие хлорогеновой (Rf=0.77) и/или кофейной кислот (Rf=0.75).

Результаты хроматографического анализа БФ приведены в таблице 5. Наиболее информативной оказалась подфракция 5.2, поэтому для дальнейших исследований выбрали именно ее. Также изучалась отдельная «предварительная» фракция (1.1.1). Подфракцию 5.2 и «предварительную» фракцию исследовали на наличие ГКК методом БХ в системе уксусной кислоты 15% в сравнении с растворами СО. В УФ-свете при $\lambda=254$ нм в «предварительной» подфракции идентифицировано пятно с сине-голубой флуоресценцией (Rf=0.71), в подфракции 5.2 – 1 пятно с голубой флуоресценцией (Rf=0.74). Путем сравнения расположения и окраски пятен подфракций и СО ГКК было установлено наличие хлорогеновой (Rf=0.73) и (или) кофейной кислот (Rf=0.72).

Таблица 5. Результаты ТСХ-анализа бутанольной фракции

Детектирование	Системы растворителей						
	БУВ (4 : 1 : 2)			Уксусная кислота разведенная 15%			
	Подфракции						
	1.1.1, 1.1, 1.2, 2.1, 2.2	3.1., 3.2, 4.1.	4.2, 5.1, 5.2	1.1.1, 1.1, 1.2, 2.1, 2.2	3.1., 3.2, 4.1.	4.2, 5.1, 5.2	
значение Rf пятен							
УФ- свет	$\lambda=254$ нм	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74; Rf=0.77	–	–	–
	$\lambda=365$ нм	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74 В подфракции 1.2: Желто-зеленая флуоресценция Rf=0.36 Голубая флуоресценция Rf=0.5	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74; Rf=0.91 В подфракции 1.2: Голубая флуоресценция Rf=0.2 Зеленоватая флуоресценция Rf=0.45	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74; Rf=0.8; Rf=0.91	Голубая флуоресценция Rf=0.62; Rf=0.74; Rf=0.8; Rf=0.91

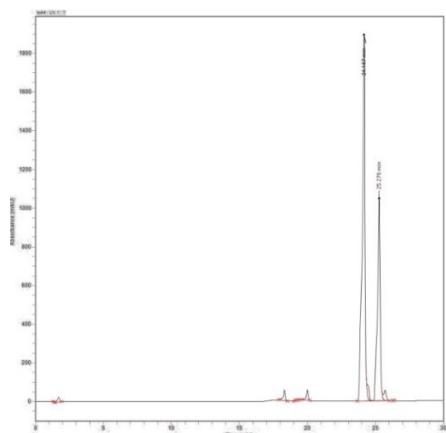
Примечание: *При увеличении номера подфракции интенсивность флуоресценции уменьшалась

При исследовании фракций на наличие аристолохиевых кислот наилучшие результаты показала система, рекомендованная Европейской фармакопеей. Пятно ХФ ($R_f=0.68$) совпадало с пятном СО по цвету и значению R_f . При обработке хроматограммы реактивом Драгендорфа, который используется для обнаружения азотсодержащих соединений, в составе которых есть третичный атом азота, пятно СО и фракции разделялись на два пятна (желто-оранжевое с $R_f=0.67$ и оранжево-коричневое с $R_f=0.7$ соответственно). Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что в ХФ присутствуют I и II аристолохиевые кислоты. В ЭАФ были идентифицированы два пятна на линии старта, которые при проявлении парами йода (который используется как для идентификации азотсодержащих соединений, так и для установления наличия двойных связей) окрашивались в оранжевый цвет. Путем сравнения с пятнами СО аристолохиевых кислот было доказано, что пятна ЭАФ не являются аристолохиевыми кислотами I и II. Данные азотсодержащие вещества обуславливают перспективность дальнейшего изучения ЭАФ в направлении поиска, выделения и установления структуры веществ, предположительно, алкалоидной природы. При исследовании БФ пятен, совпадающих с пятнами СО смеси аристолохиевых кислот, обнаружено не было.

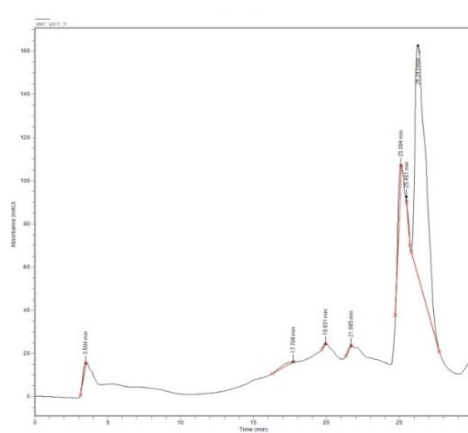
Результаты ВЭЖХ анализа, представленные в таблице 6, подтверждают результаты исследования фракций методом ТСХ: аристолохиевые кислоты присутствуют только в хлороформной фракции. Хроматограммы представлены на рисунке 2.

Таблица 6. Результаты ВЭЖХ анализа фракций на содержание аристолохиевых кислот

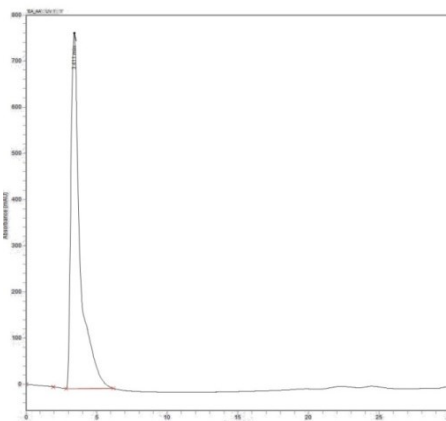
Испытуемый раствор	Время удерживания веществ, мин				
	Аристолохиевые кислоты	Другие пики			
		1	2	3	4
СО смеси аристолохиевых кислот I и II	24.27 25.28	–	–	–	–
Хлороформная фракция	25.09 26.24	3.50	17.71	19.93	21.69
Этилацетатная фракция	–	3.41	–	–	–
Бутанольная фракция	–	3.49	–	–	–



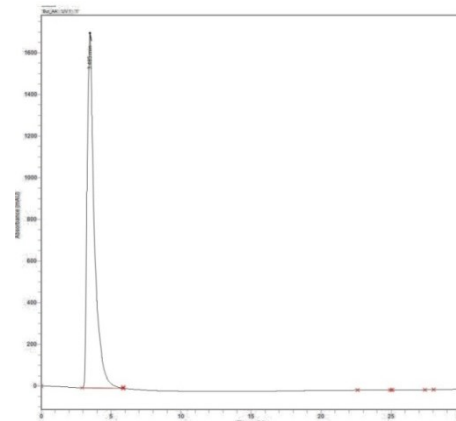
А – Хроматограмма СО аристолохиевых кислот



Б – Хроматограмма ХФ



В – Хроматограмма ЭАФ



Г – Хроматограмма БФ

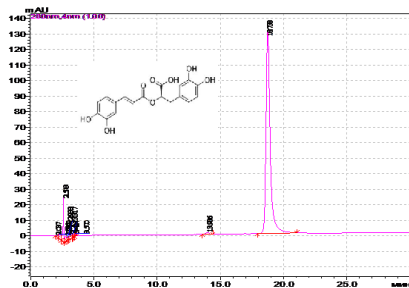
Рис. 2. Хроматограммы СО аристолохиевых кислот и отдельных фракций травы кирказона

Результаты ВЭЖХ-анализа ГКК в отдельных фракциях представлены в таблице 7.

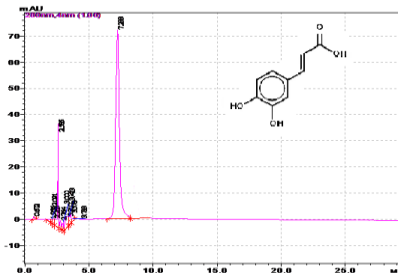
Методом ВЭЖХ во фракциях было идентифицировано 3 ГКК (рис. 3, 4): кофейная, хлорогеновая и коричневая. Эти результаты подтверждают данные полученные ранее методом ТСХ. Коричневая кислота во всех фракциях встречается в следовых количествах, наибольшее ее содержание в ХФ. Так как коричневая кислота водорастворима, наличие ее в ХФ можно объяснить, предположив, что она связывается в комплексы с липофильными соединениями, которые экстрагируются хлороформом. Хлорогеновая кислота присутствует практически во всех фракциях, основное ее количество приходится на 96% этанольную подфракцию ЭАФ и 20% этанольную подфракции БФ. Кофейная кислота встречается во всех фракциях, наибольшее содержание ее в БФ.

Таблица 7. Результаты ВЭЖХ-анализа ГКК в отдельных фракциях

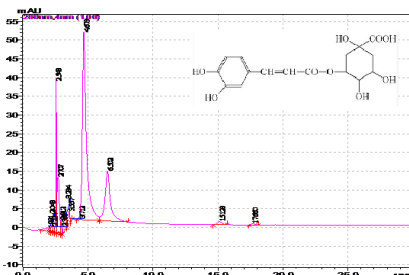
Пики	Время удерживания, мин			
	СО	ХФ	ЭАФ	БФ
Розмариновая	18.74	–	–	–
Кофейная	7.23	7.44	7.40	7.17
Хлорогеновая	4.68 и 6.50	–	6.62	4.92 и 6.48
<i>n</i> -кумаровая	11.30	–	–	–
Коричневая	27.31	27.30	27.24	27.30
Не идентифицированные пики	–	6.99; 9.62; 11.06; 12.97; 23.23; 23.98; 24.39; 28.03	5.80; 11.02; 12.92; 13.21	5.43; 5.98; 6.31; 8.13; 15.91



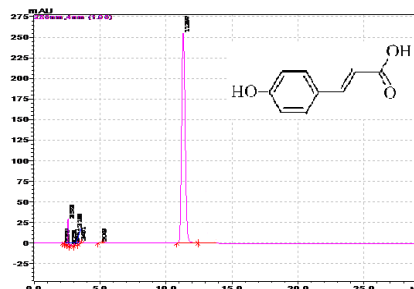
А – Хроматограмма СО розмариновой кислоты



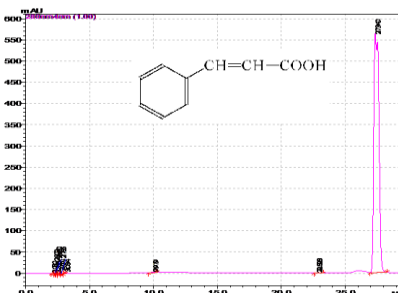
Б – Хроматограмма СО кофейной кислоты



В – Хроматограмма СО хлорогеновой кислоты

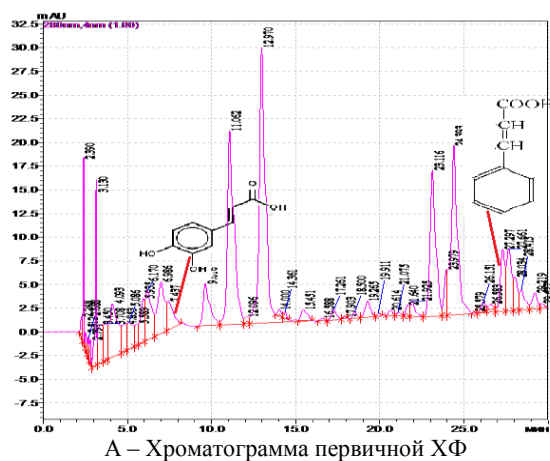


Г – Хроматограмма СО *n*-кумаровой кислоты

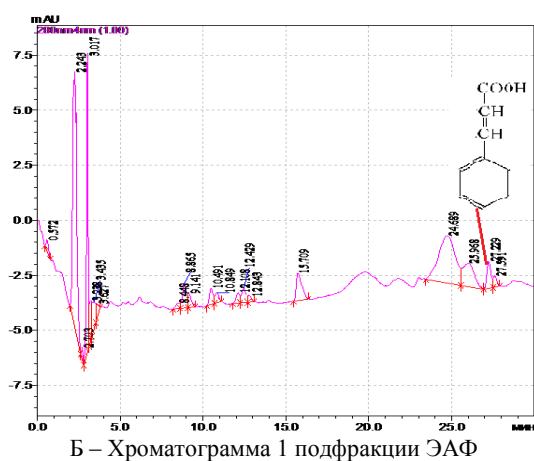


Д – Хроматограмма СО коричневой кислоты

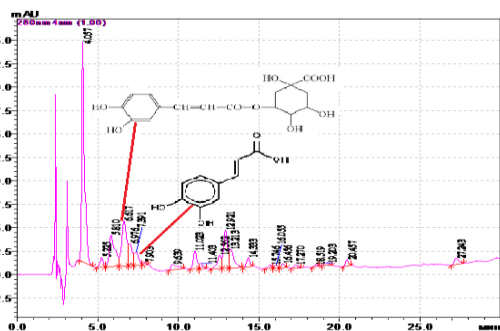
Рис. 3. Хроматограммы СО ГКК



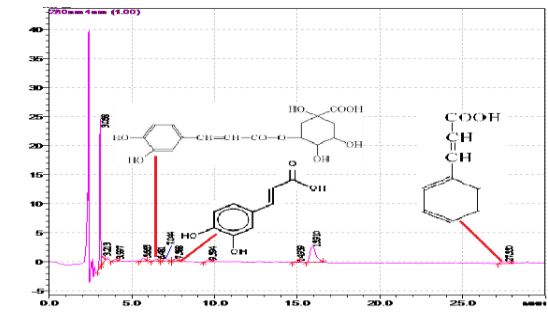
А – Хроматограмма первичной ХФ



Б – Хроматограмма 1 подфракции ЭАФ



В – Хроматограмма 3 подфракции ЭАФ



Выводы

Предложена схема фракционирования извлечения из травы кирказона, которая позволяет получить четыре фракции с различным распределением веществ. Методом ТСХ и ВЭЖХ во фракциях были идентифицированы хлорогеновая, кофейная и коричневая кислоты. В этилацетатной фракции также идентифицированы азотсодержащие вещества, предположительно алкалоидной природы, которые отсутствуют в остальных фракциях и не являются аристолохиевыми кислотами, что делает этилацетат растворителем выбора для извлечения других азотсодержащих соединений, а также обуславливает перспективность дальнейшего изучения данной фракции.

Аристолохиевые кислоты, которые определяют токсический профиль кирказона, были обнаружены только в хлороформной фракции. На основании полученных результатов можно предположить, что хлороформ является избирательным экстрагентом для извлечения аристолохиевых кислот и, как следствие, может быть использован для их избирательного извлечения и/или очистки травы кирказона.

Список литературы

1. Бойко Н.Н., Бондарев А.В., Жиликова Е.Т., Писарев Д.И., Новиков О.О. Фитопрепараты, анализ фармацевтического рынка Российской Федерации // Научный результат. Медицина и фармация. 2017. Т. 3. №4. С. 65–71.
2. Оленина Н.Г., Михеева Н.С., Крутикова Н.М. Особенности экспертизы «польза/риск» ЛРП // Ведомости «НЦЭСМП». 2018. Т. 8. №2. С. 84–91.
3. Широкова И. Рынок фитопрепаратов – тенденции, проблемы, прогнозы // Ремедиум. 2013. №4. С. 26–32.
4. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 // Journal of natural products. 2016. Vol. 79. N3. Pp. 629–661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
5. Лисяный Н.И. Иммуномодулирующее и противоопухолевое действие препаратов чистотела на опухоли головного мозга // Украинский нейрохирургический журнал. 2011. №1. С. 23–29.
6. Селимзянова Л.Р. Фитотерапия: современное состояние вопроса // Педиатрическая фармакология. 2016. Т. 13. №5. С. 488–493.
7. Kuo P.C., Li Y.C., Wu T.S. Chemical Constituents and Pharmacology of the Aristolochia species // Journal of traditional and complementary medicine. 2012. Vol. 2. N4. Pp. 249–266. DOI: 10.1016/s2225-4110(16)30111-0.
8. Heinrich M., Chan J., Wanke S., Neinhuis C. Local uses of Aristolochia species and content of nephrotoxic aristolochic acid1 and 2 – A global assessment based on bibliographic sources // Journal of Ethnopharmacology. 2009. N125. Pp. 108–144. DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.028.
9. Luciano R., Perazella M. Aristolochic Acid Nephropathy: Epidemiology, Clinical Presentation, and Treatment // Drug Safety. 2015. N38. Pp. 55–64. DOI: 10.1007/s40264-014-0244-x.
10. Bastek, H., Zubel T., Stemmer K., Mangerich A., Beneke S., Dietrich D. Comparison of Aristolochic acid I derived DNA adduct levels in human renal toxicity models // Toxicology. 2019. N420. Pp. 29–38. DOI: 10.1016/j.tox.2019.03.013.
11. Chan C., Liu Y., Pavlović N., Chan W. Aristolochic Acids: Newly Identified Exposure Pathways of this Class of Environmental and Food-Borne Contaminants and its Potential Link to Chronic Kidney Diseases // Toxics. 2019. Vol. 7. N1. P. 14. DOI: 10.3390/toxics7010014.
12. Xiong G., Yao L., Hong P., Yang L., Ci W., Liu L., He Q., Gong K., Li X., Zhou L. Aristolochic acid containing herbs induce gender-related oncological differences in upper tract urothelial carcinoma patients // Cancer management and research. 2018. Vol. 10. P. 6627. DOI: 10.2147/CMAR.S178554.
13. Hoang M.L., Chen C.H., Chen P.C., Roberts N.J., Dickman K.G. Aristolochic acid in the etiology of renal cell carcinoma // Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers. 2016. Vol. 25. N12. Pp. 1600–1608. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0219.
14. Ye J., Qian Z., Xue M., Liu Y., Zhu S., Li Y., Liu X., Cai D., Rui J., Zhang L. Aristolochic acid I aggravates renal injury by activating the C3a/C3aR complement system // Toxicology letters. 2019. Vol. 312. Pp. 118–124. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.04.027.
15. Zhang H.M., Zhao X.H., Sun Z.H., Li G.C., Liu G.C., Sun L.R., Hou J.Q., Zhou W. Recognition of the toxicity of aristolochic acid // Journal of clinical pharmacy and therapeutics. 2019. Vol. 44. N2. Pp. 157–162. DOI: 10.1111/jcpt.12789.
16. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 82. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. World Health Organization: Lyon, France, 2002. 601 p.
17. Самсонова О.Е. Биоэлементы Mn, Cu, Zn в некоторых полезных и ядовитых растениях Ставрополя // Вестник Оренбургского государственного университета. 2006. №12. С. 215–217.
18. Самсонова О.Е., Белоус В.Н., Дударь Ю.А. Фармакогностическое изучение кирказона ломоносвидного *Aristolochia clematitidis* L. флоры Ставропольского края // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. №4. С. 23–24.
19. Zhou Q. Worldwide research trends on aristolochic acids (1957–2017): Suggestions for researchers // PloS one. 2019. Vol. 14. N5. Article e0216135. DOI: 10.1371/journal.pone.0216135.

20. Ванга Е.Л., Суина И.О. Получение и фитохимическое изучение отдельных фракций травы кирказона ломоносовидного, содержащих различные группы БАВ // Сборник материалов VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург, 2018. С. 570–574.
21. Terninko I.I., Suina I.O., Terninko T.M. Estimation of dynamics of accumulation of organic acids and component composition of essential oil of herb *Aristolochia clematitis* L. // 22nd International Congress «Phytopharm 2018». Horgen, Switzerland, 2018. Pp. 95–96.
22. Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. Natural products isolation. Humana Press: Totowa, New Jersey, 2006. 529 p.
23. European pharmacopoeia. Council of Europe, 2010. Vol. 1.
24. Тернинко И.И., Суина И.О., Генералова Ю.Э., Ванга Е.Л. Исследование водной фракции из травы *Aristolochia clematitis* L. на наличие гидроксикоричных кислот // Международная научная конференция «Перспективы Лекарственного Растениеводства». М.: ВИЛАР, 2018. С. 553–557.

Поступила в редакцию 24 сентября 2019 г.

После переработки 5 декабря 2019 г.

Принята к публикации 14 февраля 2020 г.

Для цитирования: Суина И.О., Тернинко И.И., Генералова Ю.Э., Бурцева Е.В., Базанова Е.С. Изучение отдельных фракций травы *Aristolochia clematitis* L. на наличие различных групп БАВ // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 197–207. DOI: 10.14258/jcrpm.2020026462.

Suina I.O.^{1}, Terninko I.I.¹, Generalova Yu.E.¹, Burtseva Ye.V.², Bazanova Ye.S.¹* STUDY OF SEPARATE FRACTIONS OF *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L. HERB FOR THE PRESENCE OF DIFFERENT GROUPS OF BAS

¹ St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy, ul. Professora Popova, 14A, St. Petersburg, 197376 (Russia), e-mail: suina.irina@pharminnotech.com

² Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky, pr. Akademika Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007 (Russia)

The objective of the work was generation of *Aristolochia clematitis* L. herb fractions and their further study for the presence of different groups of biologically active substances (including aristolochic acids), which was achieved by addressing the following tasks: obtaining fractions from *A. clematitis* L. herb, preliminary TLC test, HPLC fraction analysis. Fractionation scheme for *A. clematitis* L. herb extracts was proposed. 4 fractions with different distribution of biologically active substances (chloroform, butanol, ethylacetate and water) were obtained. Using the TLC method and HPLC analysis the aristolochic acids were detected in the chloroform fraction only, suggesting that chloroform is a selective extractant for aristolochic acids. Presence of hydroxycinnamic acids in fractions was defined by HPLC method. Trace quantities of cinnamic acid were found in all fractions, with the highest content noted in the chloroform fraction. Caffeic acid is seen in all fractions, the highest content of butanol is typical of butanol fraction. Chlorogenic acid is present in almost all fractions, its basic amount accounted for 96% ethanol sub-fraction of ethyl-acetate fraction and 20% ethanol sub-fraction of butanol fraction. Some nitrogen-containing substances were identified in ethyl-acetate fraction, presumably of alkaloid type, but not the aristolochic acids, which makes possible further study of ethyl-acetate extracts.

Keywords: *Aristolochia clematitis* L., fractionation of raw materials, hydroxycinnamic acids, aristolochic acids, chromatographic method.

* Corresponding author.

References

1. Boyko N.N., Bondarev A.V., Zhilyakova Ye.T., Pisarev D.I., Novikov O.O. *Nauchnyy rezul'tat. Meditsina i farmatsiya*, 2017, vol. 3, no. 4, pp. 65–71. (in Russ.).
2. Olenina N.G., Mikheyeva N.S., Krutikova N.M. *Vedomosti «NTSESMP»*, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 84–91. (in Russ.).
3. Shirokova I. *Remedium*, 2013, no. 4, pp. 26–32. (in Russ.).
4. Newman D.J., Cragg G.M. *Journal of natural products*, 2016, vol. 79, no. 3, pp. 629–661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
5. Lisyanyy N.I. *Ukrainskiy neyrokhirurgicheskiy zhurnal*, 2011, no. 1, pp. 23–29. (in Russ.).
6. Selimzyanova L.R. *Pediatriceskaya farmakologiya*, 2016, vol. 13, no. 5, pp. 488–493. (in Russ.).
7. Kuo P.C., Li Y.C., Wu T.S. *Journal of traditional and complementary medicine*, 2012, vol. 2, no. 4, pp. 249–266. DOI: 10.1016/s2225-4110(16)30111-0.
8. Heinrich M., Chan J., Wanke S., Neinhuis C. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, no. 125, pp. 108–144. DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.028.
9. Luciano R., Perazella M. *Drug Safety*, 2015, no. 38, pp. 55–64. DOI: 10.1007/s40264-014-0244-x.
10. Bastek, H., Zubel T., Stemmer K., Mangerich A., Beneke S., Dietrich D. *Toxicology*, 2019, no. 420, pp. 29–38. DOI: 10.1016/j.tox.2019.03.013.
11. Chan C., Liu Y., Pavlović N., Chan W. *Toxics*, 2019, vol. 7, no. 1, p. 14. DOI: 10.3390/toxics7010014.
12. Xiong G., Yao L., Hong P., Yang L., Ci W., Liu L., He Q., Gong K., Li X., Zhou L. *Cancer management and research*, 2018, vol. 10, p. 6627. DOI: 10.2147/CMAR.S178554.
13. Hoang M.L., Chen C.H., Chen P.C., Roberts N.J., Dickman K.G. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2016, vol. 25, no. 12, pp. 1600–1608. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0219.
14. Ye J., Qian Z., Xue M., Liu Y., Zhu S., Li Y., Liu X., Cai D., Rui J., Zhang L. *Toxicology letters*, 2019, vol. 312, pp. 118–124. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.04.027.
15. Zhang H.M., Zhao X.H., Sun Z.H., Li G.C., Liu G.C., Sun L.R., Hou J.Q., Zhou W. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 2019, vol. 44, no. 2, pp. 157–162. DOI: 10.1111/jcpt.12789.
16. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 82. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*. World Health Organization: Lyon, France, 2002, 601 p.
17. Samsonova O.Ye. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2006, no. 12, pp. 215–217. (in Russ.).
18. Samsonova O.Ye., Belous V.N., Dudar' Yu.A. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 23–24. (in Russ.).
19. Zhou Q. *PloS one*, 2019, vol. 14, no. 5, article e0216135. DOI: 10.1371/journal.pone.0216135.
20. Vanag Ye.L., Suina I.O. *Sbornik materialov VIII Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiyem «Molodaya farmatsiya – potentsial budushchego»*. [The collection of materials of the VIII All-Russian scientific conference of students and graduate students with international participation «Young pharmacy – the potential of the future»]. St. Petersburg, 2018, pp. 570–574. (in Russ.).
21. Terninko I.I., Suina I.O., Terninko T.M. *22nd International Congress «Phytopharm 2018»*. Horgen, Switzerland, 2018, pp. 95–96.
22. Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. *Natural products isolation*. Humana Press: Totowa, New Jersey, 2006, 529 p.
23. *European pharmacopoeia*. Council of Europe, 2010, vol. 1.
24. Terninko I.I., Suina I.O., Generalova Yu.E., Vanag Ye.L. *Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya «Perspektivy Lekarstvennogo Rasteniyevedeniya»*. [International Scientific Conference «Prospects for Medicinal Plant Growth»]. Moscow, 2018, pp. 553–557. (in Russ.).

Received September 24, 2019

Revised December 5, 2019

Accepted February 14, 2020

For citing: Suina I.O., Terninko I.I., Generalova Yu.E., Burtseva Ye.V., Bazanova Ye.S. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 2, pp. 197–207. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020026462.

