

УДК 547.918+547.597

**ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ
ЛОМОНОСА ВИНОГРАДОЛИСТНОГО С ПОМОЩЬЮ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ,
КОМБИНИРОВАННОЙ ДЕТЕКТОРОМ ПО СВЕТОРАССЕИВАНИЮ**

Зайцев Г.П.

*Национальный Институт Винограда и Вина “Магарач”, Ялта, Украина
E-mail: gorg-83@mail*

Показано, что ВЭЖХ вместе с ELSD детектированием успешно используется в разделении и очистке тритерпеновых гликозидов Ломоноса виноградолистного. Также продемонстрировано, что ВЭЖХ вместе с ELSD детектированием – эффективный метод отделения компонентов от естественных продуктов не поглощающих свет в ультрафиолетовой области.

Ключевые слова: Ломонос виноградолистный, тритерпеновые гликозиды, гликозиды А-С.

ВВЕДЕНИЕ

Во флоре Крыма род *Clematis* представлен четырьмя видами *Clematis vitalba*, *C. flammula*, *C. integrifolia* и *C. orientalis*. Наибольшее распространение имеет Ломонос виноградолистный (*Clematis vitalba*). Последние три дикорастущих вида клематиса встречаются редко.

Растение используется в народной медицине для лечения различных воспалительных заболеваний, ревматизма, простатита, гонореи, хронических кожных заболеваний и варикозного расширения вен. Химический состав мало изучен. Различными авторами констатировалось наличие тритерпеновых гликозидов [1, 2] и описаны вещества фенольной природы [3]. В связи с этим мы продолжим исследование химического состава Ломоноса виноградолистного. Основное внимание было уделено установлению структуры, изучению распределения и динамики накопления тритерпеновых гликозидов в различных органах этого растения.



Рис. 1. Ломоноса виноградолистный в природных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал Ломоноса виноградолистного (рис. 1) был собран в Бахчисарайском районе близ реки Альма в феврале, марте, июле и сентябре 2009 года. Части растения высушивали и измельчили.

Тритерпеновые гликозиды извлекали 50%-ным раствором этанола в воде из измельченного сырья. Водно-этанольные экстракты концентрировали в вакууме, переосаждали ацетоном из водных растворов, рекстрагировали *n*-бутиловым спиртом и высушивали в вакууме роторного испарителя. Суммарную фракцию тритерпеновых гликозидов подвергали препаративному хроматографическому разделению на сорбенте с обращенной фазой.

В исследовании использовалось оборудование фирмы Agilent Technologies – высокоэффективный жидкостный хроматограф модель Agilent 1100 укомплектованный 4-х канальным насосом градиента низкого давления, вакуумным дегазатором, автоматическим инжектором проб, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором на диодной матрице, детектором по светорассеиванию ELSD Agilent G4218A и масс-детектором Agilent 6410 с ионизационным источником – электроспрей.

Аналитическое ВЭЖХ разделение тритерпеновых гликозидов производили на хроматографической колонке ZORBAX-SB-C18 (150×2.1 мм) с зернением сорбента 3,5 мкм в градиентном элюировании 20 % метанолом, 20 % ацетонитрилом, 60 % 0,01 5 % водной трифторуксусной кислотой до 100 % метанола за 18 мин. Температура термостата колонок 40 °С, поток подвижной фазы 0,25 мл/мин. Объем инъекции 2 мкл. Спектрофотометрическое детектирование 206 нм и 254 нм, на детекторе по светорассеиванию (ELSD) при давлении азота 3,0 атм, температуре 100 °С. Масс-спектрометрический анализ проводился аналогично описанному в [4]. Препаративное разделение суммы гликозидов производили на хроматографической колонке Supelcosil C18 (210×21 мм) с зернением сорбента 5 мкм. Аналитическое разделение моносахаридов, образующихся при гидролизе гликозидов производили на колонке Supelcogel C610-H (300×7,8×9мм) с элюированием 0,1% H₃PO₄. Температура термостата 30 °С, поток подвижной фазы 0,5 мл/мин. Объем инъекции 5 мкл. Детектирование производилось на рефрактометрическом детекторе.

Кислотный гидролиз тритерпеновых гликозидов проводили в смеси диоксана и 4 н водной трифторуксусной кислоты (1:1) в запаянной ампуле при 100 °С в течение 5 часов, содержимое ампул концентрировали в вакууме, разбавляли водой и центрифугировали. После гидролиза гидрофильную составляющую анализировали на состав углеводов методом ВЭЖХ, а липофильную фракцию анализировали на состав агликонов методом ТСХ. Щелочной гидролиз проводили в растворе содержащем 4 н КОН в 50 % метаноле в запаянной ампуле при 100 °С в течение 2 часов. Осадок после щелочного гидролиза промывали водой и подвергали кислотному гидролизу по вышеописанной схеме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования в составе тритерпеновых гликозидов Ломоноса виноградолистного обнаружены три основных компонента названные нами по степени уменьшения полярности гликозидами А, В и С (рис. 2).

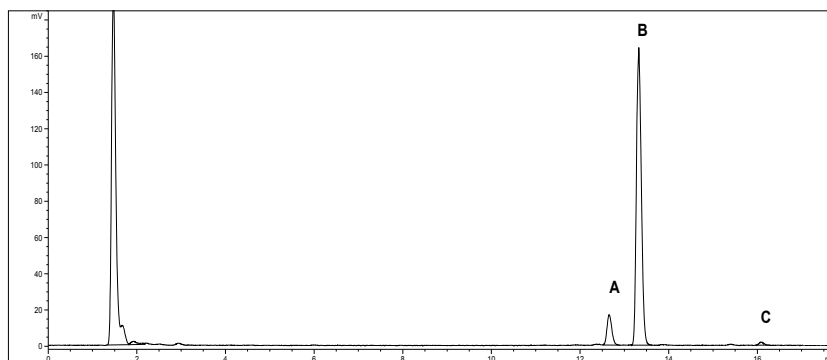


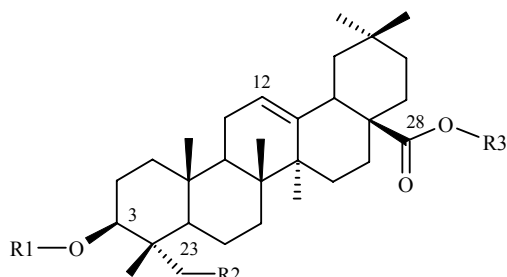
Рис. 2. Хроматограмма фракции тритерпеновых гликозидов корней Ломоноса виноградолистного, собранных в феврале 2009 г., полученная на детекторе по светорассеиванию ELSD.

По результатам исследования Табл. 1, гликозиды А и В содержат по 6 моносахаридов и имеют в качестве агликона хедерагенин. Гликозид С – также содержит 6 моносахаридов, но в качестве агликона содержит олеаноловую кислоту.

Таблица 1.

Масс–спектрометрические данные гликозидов А-С

Соединение	Молекулярная масса иона $[M-H]^-$ m/z , (-ESI-MS)	Молекулярная масса иона $[M+NH_4]^+$ m/z , (+ESI-MS)	Расчетная формула иона $[M-H]^-$
Гликозид А	1351	1370	$C_{64}H_{103}O_{30}$
Гликозид В	1351	1370	$C_{64}H_{103}O_{30}$
Гликозид С	1335	1354	$C_{64}H_{103}O_{29}$



	Моносахариды R1	R2	Моносахариды R3
Гликозид А	Rib, Rha, Ara, Glc	OH	Rha, Glc
Гликозид В	Rib, Rha, Ara	OH	Rha, Glc, Glc
Гликозид С	Rib, Rha, Ara	H	Rha, Glc, Glc

Рис.3. Химический состав тритерпеновых гликозидов Ломоноса виноградолистного.

В рамках исследования нами получены сведения о распределении идентифицированных веществ в органах растения и динамике их накопления в корнях. Установлено, что гликозиды накапливаются в корнях к периоду покоя, а в вегетационный период они концентрируются в листьях и молодых побегах (табл. 2). Данные получены с помощью ELSD детектора, калибровка производилась по выделенному гликозиду В.

Таблица 2.

Содержание гликозидов А-С

Содержание в % сух. веса	корни 02.09	корни 03.09	корни 07.09	корни 09.09	листья 07.09	соцветия 07.09	лоза 07.09
Гликозид А	0,313	0,587	0,028	0,027	1,097	0,260	0,000
Гликозид В	2,982	1,115	0,687	0,356	0,474	0,701	0,039
Гликозид С	0,399	0,133	0,018	0,020	0,034	0,062	0,027
Сумма	3,694	1,835	0,733	0,403	1,605	1,023	0,066

ВЫВОД

Изучен состав тритерпеновых гликозидов Ломоноса виноградолистного, выделены три основных компонента гликозиды А, В и С. Благодаря способности детектора по светорассеиванию в равной степени регистрировать нелетучие компоненты экстрактов, была изучена динамика накопления гликозидов в корнях Ломоноса виноградолистного и распределение в вегетативной части растения в летний период.

Список литературы

1. Chirva V.Ya. Ribose in the triterpene glycosides of *Clematis vitalba* / V.Ya. Chirva, P.K. Kintya, V.N. Mel'nikov // Chemistry of Natural Compounds. – 1971. – № 3. – Vol. 7. – P.284–286.
2. Kintya P.K. Structure of vitalboside D from *Clematis vitalba* / P.K. Kintya, V.M. Mel'nikov, V.Ya. Chirva // Chemistry of Natural Compounds. – 1974. – № 6. – Vol. 10. – P. 833.
3. Yesilada E. *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects / E. Yesilada, E. Kupeli // Journal of Ethnopharmacology. – 2007. – Vol. 110 – P. 504–515.
4. Multi-stage massspectrometric studies of triterpenoid saponins in crude extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms / M. Cui, W.X. Sun, F.R. Song [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1999. – № 13. – P. 873–879.

Зайцев Г.П. Препаративне виділення тритерпенових глікозидів Ломоносу виноградолистного за допомогою високоефективної рідинної хроматографії комбінованої детектором по світлорозсіюванню / Г.П. Зайцев // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – № 1. – С. 172-176.

Показало, що ВЕРХ разом з ELSD детектуванням успішно використовується в розділенні й очищенні тритерпенових глікозидів Ломоносу виноградолистного. Також продемонстровано, що ВЕРХ разом з

ELSD детектуванням – ефективний метод розділення компонентів від природних продуктів не поглинаючих світло в ультрафіолетовій області.

Ключові слова: Ломонос виноградолистный, тритерпенові глікозиди, глікозиди А-С.

Zaytsev G.P. Preparative isolation of triterpene glycosides from *Clematis vitalba* by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector / G.P. Zaytsev // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 1. – P. 172-176.

The study indicated that HPLC coupled with ELSD was successfully used in the isolation and purification of triterpene glycosides from *Clematis vitalba*. It also demonstrated that HPLC coupled with ELSD is an effective method to isolate components without UV absorption from natural products.

Keywords: *Clematis vitalba*; Triterpenoid glycosides, glycosides A-C

Поступила в редакцию 04.03.2010 г.