

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-3-61-67>

ХРОМАТОГРАФИЯ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ РОДА КОПЕЕЧНИК НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОРБЕНТАХ SEPHAROSE CL

ФЁДОРОВА Ю.С.^{1*}, СУХИХ А.С.¹, СУСЛОВ Н.И.^{2,3}, ЗАХАРОВА Ю.В.¹, СОБОЛЕВА О.М.¹

¹ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

³«Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Резюме

Цель. Изучение хроматографической эффективности модифицированных сорбентов Sepharose CL-4B для разделения, очистки и препаративного накопления доминирующих компонентов из экстрактов корней *Hedysarum theinum* Krasnob. и *Hedysarum neglectum* Ledeb.

Материалы и методы. В режимах изократического и градиентного элюирования изучены сорбционная способность нативных матриц сефарозы, а также их химически модифицированного аналога. В качестве лиганда модификатора сорбента использовано производное 4-пиридинкарбоновой кислоты [(4-гидрокси-3-метоксифенил)метилени]гидразид (фтивазид). В работе рассмотрены хроматографические свойства сорбентов: Sepharose CL-4B, Sepharose CL-6B, а также азоэпоксидсорбента Sepharose CL-4-БЭП-п-нитробензгидразид-фтивазид.

Результаты. Проведенное хроматографическое исследование показало высокую эффективность применения сорбента Sepharose CL-4B и его химически модифицированного аналога в качестве носителей для жидкост-

ной колоночной хроматографии водно-этанольных экстрактов, полученных из растений рода *Hedysarum*. Установлено, что полное элюирование биологически активных веществ исследуемых экстрактов достигается только с применением в качестве элюента насыщенного раствора натрия тетрабората. В полученных хроматографических фракциях определены флавоноиды и таниды различной степени конденсированности.

Заключение. Сравнительное хроматографирование биологически активных веществ экстрактов корней растений рода *Hedysarum* на сорбентах Sepharose CL-4B и Sepharose CL-6B в равных условиях элюции показало наиболее эффективное разделение компонентов на Sepharose CL-4B. При применении химически модифицированного аналога – азоэпоксидсорбента Sepharose CL-4-БЭП-п-нитробензгидразид-фтивазид показана лучшая эффективность разделения танидов и флавоноидов.

Ключевые слова: растения рода *Hedysarum*, конденсированные танины, хроматографические сорбенты, азоэпоксидсорбенты.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Федорова Ю.С., Сухих А.С., Суслов Н.И., Захарова Ю.В., Соболева О.М. Хроматография экстрактов растений рода копеечник на модифицированных сорбентах Sepharose CL // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019. Т. 4, №3. С. 61-67.

ORIGINAL RESEARCH

CHROMATOGRAPHY OF HEDYSARUM EXTRACTS ON MODIFIED SEPHAROSE CL SORBENTS

YULIA S. FEDOROVA^{1*}, ANDREY S. SUKHIKH¹, NIKOLAY I. SUSLOV^{2,3}, YULIA V. ZAKHAROVA¹, OLGA M. SOBOLEVA¹

¹Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056), Russian Federation

²Siberian State Medical University (2, Moskovskiy Trakt, Tomsk, 634050), Russian Federation

³Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia (3, Lenina Prospekt, 634028, Tomsk) Russian Federation

English ▶

Abstract

Aim. To study the chromatographic efficiency of modified Sepharose CL-4B sorbents for separation, purification, and preparation of major components from *Hedysarum theinum* Krasnob. and *Hedysarum neglectum* Ledeb. root extracts.

Materials and Methods. Sorption capacity of the native and modified sepharose was evaluated in both isocratic and gradient elution modes. 4-pyridinecarboxylic acid derivative [(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylene]hydrazide (ftivazide) was used as a sorbent modifier ligand. We studied chromatographic properties of Sepharose CL-4B, Sepharose CL-6B, and azoepoxyadsorbent Sepharose CL-4B-DEP-p-nitrobenzohydrazide-ftivazide, a chemically modified analogue of Sepharose CL-4B.

Results. Sepharose CL-4B and Sepharose

CL-4B-DEP-p-nitrobenzohydrazide-ftivazide were found efficient carriers for liquid column chromatography of water-ethanol *Hedysarum* extracts. Complete elution of bioactive substances has been achieved exclusively by using sodium tetraborate as an eluent. We were able to identify flavonoids and tannins of different condensation in chromatographic fractions.

Conclusion. Comparative chromatography of bioactive substances from *Hedysarum* root extracts is more efficient if employing Sepharose CL-4B instead of Sepharose CL-6B as a sorbent. Sepharose CL-4B-DEP-p-nitrobenzohydrazide-ftivazide demonstrates excellent separation capacity for tannins and flavonoids.

Keywords: *Hedysarum*, condensed tannins, chromatographic sorbents, azoepoxyadsorbents.

Conflict of Interest: the authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

For citation:

Yulia S. Fedorova, Andrey S. Sukhikh, Nikolay I. Suslov, Yulia V. Zakharova, Olga M. Soboleva. Chromatography of *Hedysarum* extracts on modified Sepharose CL sorbents. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019; 4 (3): 61-67.

Введение

Род копеечник (*Hedysarum*, сем. *Fabaceae*) является ценным лекарственным растением [1]. Для выделения биологически активных веществ (БАВ) из растений данного рода широко используются различные хроматографические методы [1–3]. Метод жидкостной колонной хроматографии успешно применяется как в России, так и в зарубежных странах. Для разделения, выделения и очистки БАВ из растительных экстрактов используются сорбенты на основе – Sepharose, Sephadex, полиамид, Silicagel [1,4]. Использование оригинальных сорбентов при сочетании тандемных вариантов хроматографии в исследовании БАВ копеечников позволило выделить уникальные

вещества с ранее не описанными химическими структурами и биологическими свойствами [5–7]. Агарозные сорбенты (Sepharose 4B, Sepharose 6B) очень гидрофильны, в условиях хроматографии химически неактивны, но уязвимы при действии кислот, щелочей и окислителей, а также подвержены разрушению при высыхании. Химически модифицированные агарозные сорбенты (Sepharose CL-4B, Sepharose CL-6B) обладают большей жесткостью, устойчивы в широком диапазоне pH среды и способны выдерживать длительный контакт со многими органическими растворителями.

В настоящее время применение жестких агарозных сорбентов в колонной хроматографии превалирует, а мягкие сорбенты практиче-

ски не применяются. Ограничено использование эпоксимодифицированных (сверхсшитых) гелей [1]. По данным работ [8–10] показано, что модифицированные полисахаридные сорбенты являются универсальными для разделения, выделения и очистки различных БАВ. Таким образом, возможность практического применения эпоксимодифицированных сорбентов в колоночной хроматографии для аналитических и препаративных задач делает исследование в этой области крайне актуальным.

Цель исследования

Изучение хроматографической эффективности модифицированных сорбентов Sepharose CL-4B для разделения, очистки и препаративного накопления доминирующих компонентов из экстрактов корней *Hedysarum theinum* Krasnob. и *Hedysarum neglectum* Ledeb.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись водно-этанольные экстракты, полученные известным способом из растительного сырья малоизученных видов копеечника – корней копеечника чайного (*Hedysarum theinum* Krasnob.) и копеечника забытого (*Hedysarum neglectum* Ledeb.). Заготовка сырья, его сушка и экстракция проводились согласно известным подходам, описанным в литературе [1].

Колоночную хроматографию осуществляли на сорбентах: Sepharose CL-4B, Sepharose CL-6B («Pharmacia», Швеция), азоэпоксиадсорбент Sepharose CL-4-БЭП-*n*-нитробензгидразид-фтывазид (ЦНИЛ, КемГМУ). В качестве модифицирующего лиганда использован 4-пири-

динкарбоновой кислоты [(4-гидрокси-3-метоксифенил)метил]гидразид – далее обозначаемый как фтывазид. Детектирование проводили на длине волны 270 нм. Хроматографирование изучаемых объектов осуществляли в режиме колоночной хроматографии с применением различных режимов элюирования:

1) Режим А – элюент 0,01MNaOH;

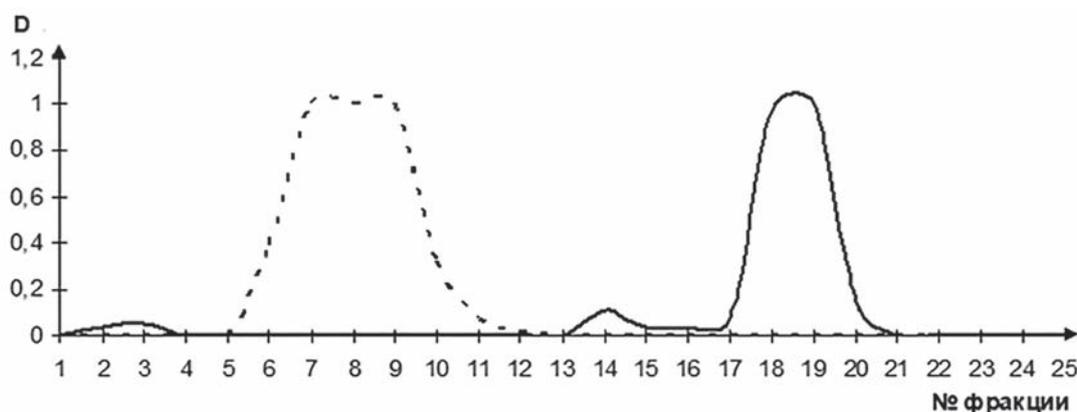
2) Режим Б – вода очищенная, спирт этиловый (1:1), 0,01MNaOH;

3) Режим В – вода очищенная, спирт этиловый (1:1), 0,01MNaOH, насыщенный раствор тетрабората натрия, 0,1MNaOH.

Антибактериальную активность экстрактов определяли по отношению к условно-патогенным микроорганизмам: *Escherichia coli hly+*, *E. Coli lac-*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* на среде Мюллер-Хинтон (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Чистые культуры бактерий высевали на питательную среду методом «газона», затем капельным методом наносили экстракты копеечников. Посевы инкубировали 18 часов при 37°C. Положительным считали результат при отсутствии роста микроорганизмов в месте нанесения экстрактов растений.

Результаты и обсуждение

Хроматографическое разделение экстрактов копеечников в режиме гелепроникающей хроматографии на сорбенте Sepharose CL-4B с применением однокомпонентной системы элюирования (режим А) показало наличие только одного ключевого пика. В экстракте копеечника забытого отмечено наличие одного ключевого и двух минорных компонентов (рисунок 1).



— экс тракт корней *Hedysarum neglectum* Ledeb. - - - экс тракт корней *Hedysarum theinum* Krasnob.

Рисунок 1.

Хроматографическое разделение экстрактов копеечников на Sepharose CL-4B (режим элюции А).

Figure 1.

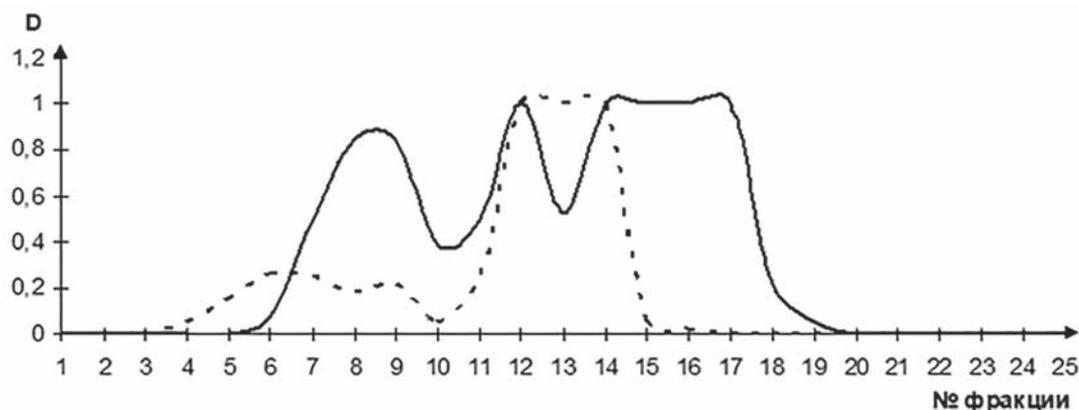
Chromatographic separation of *Hedysarum* root extracts on Sepharose CL-4B (elution mode A).

Рисунок 2.

Хроматографическое разделение экстрактов копеечников на Sepharose CL-4B (режим элюции Б).

Figure 2.

Chromatographic separation of Hedysarum root extracts on Sepharose CL-4B (elution mode B).



— экстракт корней Hedysarum neglectum Ledeb. - - - экстракт корней Hedysarum theinum Krasnob.

Таким образом, данный вариант элюции не позволяет получить полное разделение БАВ экстрактов копеечников, поэтому было опробовано несколько режимов градиентного элюирования. При хроматографировании БАВ исследуемых экстрактов в режиме Б наблюдалось наличие трех ключевых пиков и отсутствие минорных компонентов (рисунок 2).

Ультрафиолетовые (УФ)-спектры пиковых фракций исследуемых экстрактов при хроматогра-

фическом режиме Б подобны УФ-спектрам танинов конденсированного типа (рисунок 3). Это также подтверждается положительной пробой с 1% раствором желатина (выпадение осадка), реакции с FeCl₃ (черно-зеленое окрашивание) и др. [1].

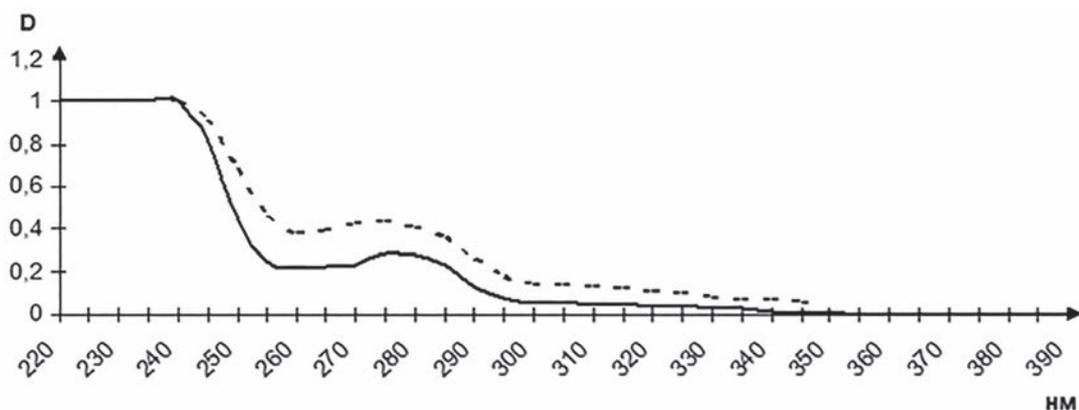
Таким образом, при хроматографировании с применением режима элюции А не происходит разделения основной группы БАВ исследуемых экстрактов Hedysarum theinum Krasnob. и Hedysarum neglectum Ledeb. – конденсированных та-

Рисунок 3.

УФ-спектр ключевых пиковых фракций, полученных на Sepharose CL-4B (режим элюции Б).

Figure 3.

Ultraviolet spectrum of major peak fractions from Hedysarum root extracts obtained on Sepharose CL-4B (elution mode B).



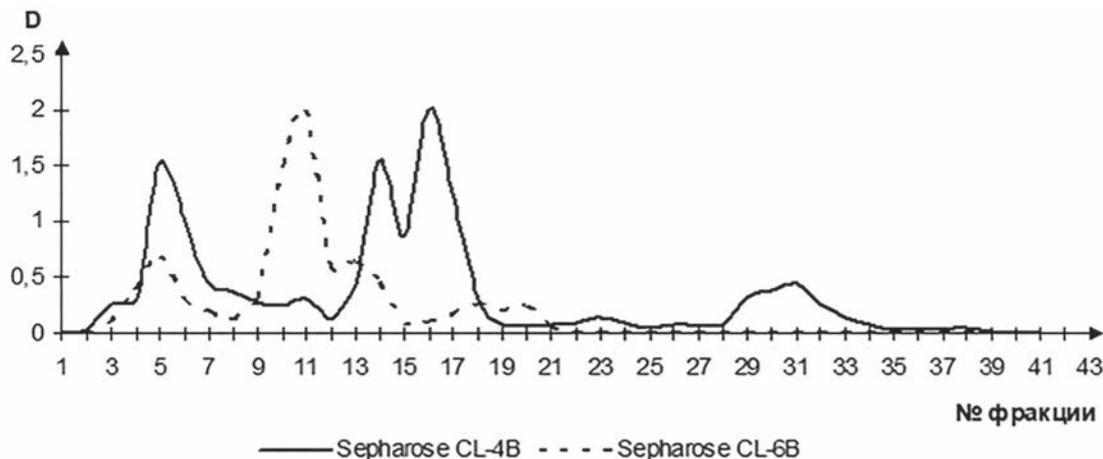
— экстракт корней Hedysarum neglectum Ledeb. - - - экстракт корней Hedysarum theinum Krasnob.

Рисунок 4.

Хроматографическое разделение экстракта корней копеечника забытого на сорбентах Sepharose CL-4B и Sepharose CL-6B (режим элюции Б).

Figure 4

Chromatographic separation of the Hedysarum neglectum root extract on Sepharose CL-4B and Sepharose CL-6B (elution mode B).



— Sepharose CL-4B - - - Sepharose CL-6B

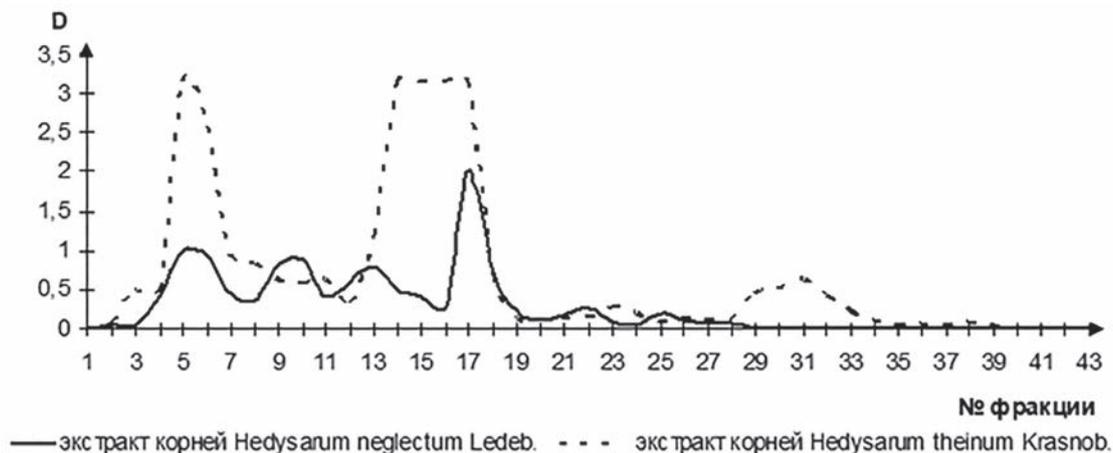


Рисунок 5.

Хроматографическое разделение экстрактов копеечников на Sepharose CL-4B (режим элюции В).

Figure 5.

Chromatographic separation of *Hedysarum* root extracts on Sepharose CL-4B (elution mode C).

нинов, при этом в режиме Б данную группу веществ удалось частично разделить (рисунок 4).

Сравнительное хроматографическое разделение БАВ экстракта корней *Hedysarum neglectum* Ledeb. на сорбентах Sepharose CL-4B и Sepharose CL-6B в условиях элюции режима Б, показано на рисунке 4. Применение сорбента Sepharose CL-6B дает наличие только одного ключевого пика БАВ и четыре пика минорных компонентов, в отличие от Sepharose CL-4B – три ключевых пика и два минорных. Аналогичные данные были получены при разделении экстракта корней *Hedysarum theinum* Krasnob.

Хроматографическое разделение БАВ экстрактов корней *Hedysarum theinum* Krasnob. и *Hedysarum neglectum* Ledeb. на Sepharose CL-4B в условиях элюции режима В показало наличие шести пиковых фракций (рисунок 5).

УФ-спектры полученных пиковых фракций экстрактов копеечников являются однотипными и имеют характерные для конденсированных танинов, но относительно слабые полосы поглощения в зоне λ 265-280нм (рисунок 6).

В продолжение хроматографического изу-

чения БАВ экстрактов копеечников чайного и забытого был предложен азоэпоксиадсорбент Sepharose CL-4-БЭП *n*-нитробензгидразид-фтивазид (рисунок 7).

В результате хроматографии при применении системы элюции режима (В) наблюдалось наличие нескольких пиков ключевых и минорных компонентов БАВ исследуемых экстрактов копеечников. Оптимизированный режим элюции с применением модифицированного сорбента на основе Sepharose CL-4B позволяет выделять индивидуальные вещества растительного происхождения. В исследуемых условиях сорбент сохранял эффективность после пятидесяти циклов регенерации. Важно отметить, что применение азоэпоксиадсорбентов делает возможным исключить использование в качестве компонентов подвижной фазы органических растворителей. Данное обстоятельство особенно актуально в свете тенденций «зелёной химии». Выделение индивидуальных биологически активных веществ из растительных экстрактов в режиме препаративной хроматографии, позволяет продолжить стандартизированные исследования по изучению

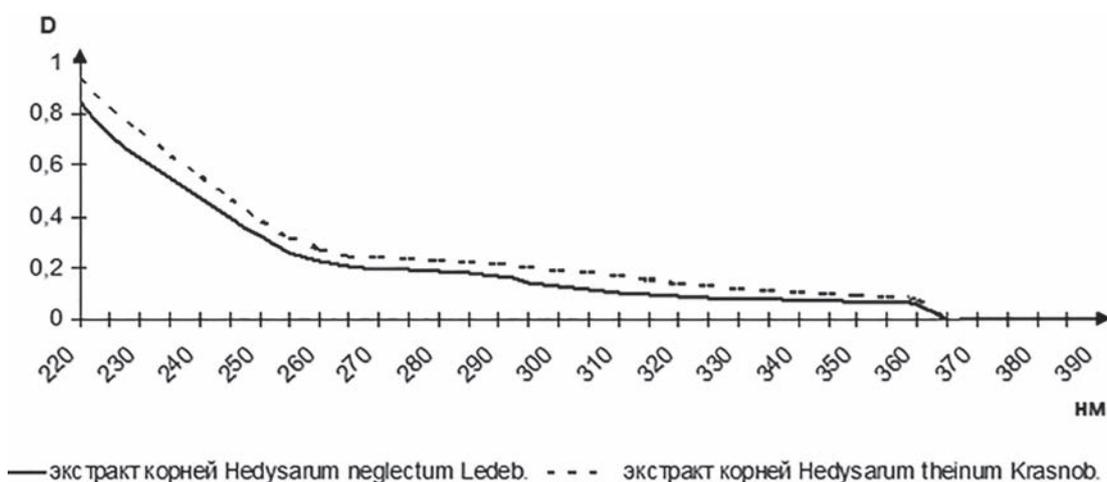


Рисунок 6.

УФ-спектр ключевых пиковых фракций, полученных на Sepharose CL-4B (режим элюции В).

Figure 6.

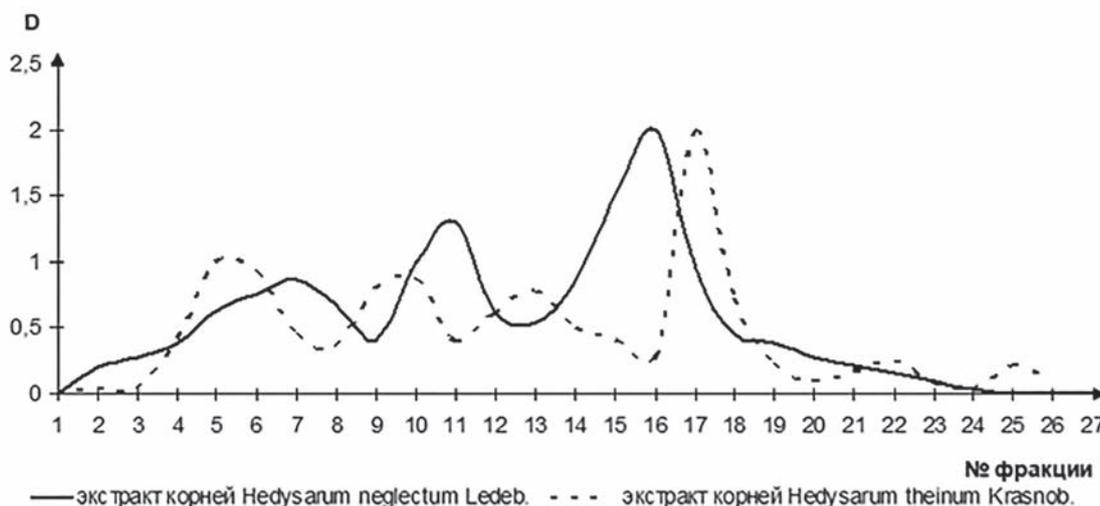
Ultraviolet spectrum of major peak fractions from *Hedysarum* root extracts obtained on Sepharose CL-4B (elution mode C).

Рисунок 7.

Хроматографическое разделение экстрактов копеечников на сорбенте Sepharose CL-4-БЭП-п-нитробензгидразид-фтивазид (режим элюции В).

Figure 7.

Chromatographic separation of *Hedysarum* root extracts on Sepharose CL-4B-DEP-p-nitrobenzohydrazide-ftivazide (elution mode C).



биологических и фармакологических эффектов. Исследуемые экстракты копеечников проявили выраженные антибактериальные свойства как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных условно-патогенных бактерий.

Заключение

Таким образом, данные проведенного хроматографического исследования доказывают

высокую эффективность применения сорбента Sepharose CL-4B и его химически модифицированного аналога в качестве носителей для жидкостной колоночной хроматографии водно-этанольных экстрактов, полученных из растений рода *Hedysarum*. Азэпоксидсорбенты, исключительно актуальны для разделения, выделения, накопления и очистки различных типов БАВ в химии природных соединений.

Литература / References:

1. Федорова Ю.С., Кузнецов П.В., Суслов Н.И. Современные перспективы фитохимических исследований биологически активных веществ растений рода копеечник (*Fabaceae, Hedysarum*). Кемерово: АИКузбассвузиздат; 2018. [Fedorova YuS, Kuznetsov PV, Suslov NI. Current prospects of phytochemical studies of biologically active substances of plants of the genus *Kopeechnik* (*Fabaceae, Hedysarum*). Kemerovo: AIKuzbassvuzizdat; 2018. (In Russ.).]
2. Nazarenko DV, Kharyuk PV, Oseledets IV, Rodina IA, Shpigun OA. Machine learning for LC-MS medicinal plants identification. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2016;156(15):174-180. DOI: 10.1016/j.chemolab.2016.06.003
3. Salah NB, Herve C, Ismahen E, Chenavas IE, Fildier A, Sanglar C, Jannet HB, Bouzouita N. Isolation and structure elucidation of two new antioxidant flavonoid glycosides and fatty acid composition in *Hedysarum carnosum* Desf. *Industrial Crops and Products*. 2016;81:95-101. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.057
4. Guo J, Lin H, Wang J, Lin Y, Zhang T, Jiang Z. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;165:182-197. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.12.009
5. Shi Y, Zhao L, Liu X, Hu F, Cui F, Bi Y, Ma YF, Feng SL. Structural characterization of a sulfated glucan isolated from the aqueous extract of *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87(1):160-169. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.032
6. Dang Z, Feng D, Liu X, Yang T, Guo L, Liang J, Liang J, Hu F, Cui F, Feng S. Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from radix *Hedysari*. *Fitoterapia*. 2013;89:20-32. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.05.011
7. Zhao L, Zhao H, Sheng X, Chen T, Dang Z, An L. Structural characterization and stimulating effect on osteoblast differentiation of a purified heteropolysaccharide isolated from *Hedysarum polybotrys*. *Carbohydrate Polymers*. 2014;111:714-721. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.05.001
8. Petrovaj J, Kudličková Z, Budovská M, Salayová A, Balážb M, Lindner W, Gondová T. Liquid chromatographic chiral recognition of phytoalexins on immobilized polysaccharides chiral stationary phases. Unusual temperature behavior. *Journal of Chromatography A*. 2019;1601:178-188 DOI: 10.1016/j.chroma.2019.04.070
9. Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Ключевые биологические активные вещества на основе растений рода Копеечник. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2011;11(5):708-713. [Fedorova YuS, Sukhikh AS, Kuznetsov PV. Key biological active substances based on plants of the genus *Kopeechnik*. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2011;11(5):708-713. (In Russ.).]
10. Wu SG, Lin AY, Hsieh HY, Tsui HW. Elucidation of adsorption mechanisms of solvent molecules with distinct functional groups on amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)-based sorbent. *Journal of Chromatography A*. 2016;1460:123-134. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.024

Сведения об авторах

Федорова Юлия Сергеевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и общей химии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: получение растительных экстрактов, проведение хроматографического анализа, дизайн исследования, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-5543-0513

Сухих Андрей Сергеевич, кандидат фармацевтических наук, доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: синтез сорбентов, выполнение физико-химических исследований хроматографических фракций.

ORCID: 0000-0001-9300-5334

Суслов Николай Иннокентьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией фитофармакологии и специального питания, «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия.

Вклад в статью: обобщение и обсуждение результатов проведения биологического и фармакологического исследования экстрактов.

ORCID: 0000-0002-7993-5639

Захарова Юлия Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: изучение антибактериальной активности экстрактов и хроматографических фракций, статистическая обработка данных.

ORCID: 0000-0002-3475-9125

Соболева Ольга Михайловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: изучение антибактериальной активности экстрактов и хроматографических фракций, статистическая обработка данных.

ORCID: 0000-0001-8806-3230

Корреспонденцию адресовать:

Федорова Юлия Сергеевна
650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а
E-mail: fedorova_yuliya_sergeevna@mail.ru

Статья поступила: 30.04.2019 г.

Принята в печать: 31.08.2019 г.

Authors

Dr. Yulia S. Fedorova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pharmaceutical and General Chemistry, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: conceived and designed the study; obtained plant extracts; performed the chromatographic analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-5543-0513

Dr. Andrey S. Sukhikh, MD, PhD, Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: synthesised the sorbents, analyzed chromatographic fractions.

ORCID: 0000-0001-9300-5334

Prof. Nikolay I. Suslov, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory for Phytopharmacology and Special Nutrition, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russian Federation.

Contribution: analyzed the results; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-7993-5639

Dr. Yulia V. Zakharova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: assessed the antibacterial activity of extracts and chromatographic fractions; performed the statistical analysis.

ORCID: 0000-0002-3475-9125

Dr. Olga M. Soboleva, PhD, Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: assessed the antibacterial activity of extracts and chromatographic fractions; performed the statistical analysis.

ORCID: 0000-0001-8806-3230

Corresponding author:

Dr. Yulia S. Fedorova
22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation
E-mail: fedorova_yuliya_sergeevna@mail.ru

Received: 30.04.2019

Accepted: 31.08.2019