

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ВЫДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ ИНДОЛЬНОГО РЯДА
ИЗ ЛИСТЬЕВ *CATHARANTHUS ROSEUS*****С.Н. Ромашко, О.В. Молчан, В.М. Юрин***Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь***Введение**

Несмотря на успехи промышленного синтеза фармакологических соединений, к настоящему времени, все более актуальным и целесообразным представляется получение химически чистых биологически активных соединений из растительного сырья. Одним из уникальных источников ценных вторичных метаболитов является тропическое растение катарантус розовый (*Catharanthus roseus* G.Don). Уже на протяжении более чем 30 лет растение катарантус розовый привлекает к себе внимание ученых всего мира. К настоящему времени, метаболический состав данного растения является хорошо изученным. Катарантус розовый представляет собой уникальный источник фармакологически активных соединений, таких как дитерпеноидные алкалоиды винбластин и винкрестин, обладающие противоопухолевой активностью, а так же монотерпеноидные алкалоиды – аймалицин и серпентин, - антигипертензивного действия. Кроме того, в состав *Catharanthus roseus* входят стриктозидин, катарантин, таберсонин, виндолин и прочие алкалоиды индольного ряда, являющиеся только частью всего спектра алкалоидов, который насчитывает более 130 индивидуальных соединений [1].

Многочисленные научные достижения в области исследования катарантуса розового, вместе с тем, так и не привели к коммерчески успешному получению данных фармакологически активных веществ по причине биологических и технологических ограничений [1]. Поэтому, разработка оптимальных условий очистки и выделения алкалоидов индольного ряда из растения катарантуса розового является актуальным и необходимым направлением в сфере получения лекарственных субстанций.

Начальным этапом выделения алкалоидов из сухого сырья, в том числе и из растения *Catharanthus roseus*, является экстракция, заключающаяся в переводе выделяемых веществ из растительного материала в раствор соответствующим растворителем (твердофазно - жидкостная экстракция). Известно, что самым приемлемым и безопасным экстрагентом для выделения алкалоидов является 70% этанол [2]. Для полного извлечения исследуемых метаболитов из растений применяют различные физико-химические методы. В настоящее время используют следующие подходы к максимально полному выделению алкалоидов: применение обратного холодильника, аппарата Сокслета, обработка экстрактов ультразвуком, экстракция при комнатной температуре и др. [2].

Так как содержание суммы алкалоидов индольного ряда в растительном сырье катарантуса розового крайне мало и составляет 0,15-0,74%, а индивидуальных алкалоидов, например, таких как винбластин – 0,01% [3], то чистота получаемого продукта является очень актуальным вопросом. Таким образом, последующие этапы при обнаружении алкалоидов связаны с очисткой их от сопутствующих веществ.

Выделение алкалоидов катарантуса из растительного сырья в чистом виде дает возможность использовать этот продукт в качестве лекарственного препарата, а так же наиболее эффективно идентифицировать индивидуальные алкалоиды, применяя качественный метод анализа – тонкослойную хроматографию.

Таким образом, в данном исследовании были рассмотрены некоторые аспекты оптимизации экстракции, очистки и разделения алкалоидов индольного ряда.

Методы исследования

Получение экстракта, содержащего алкалоиды. В качестве материала для выделения алкалоидов индольного ряда использовали листья растений *Catharanthus*

roseus, выращенных в условиях оранжереи биологического факультета Белорусского Государственного Университета. Сухие листья измельчали, просеивали через сито с диаметром пор 1 мм и использовали для экстракции алкалоидов.

А). Твердофазно – жидкостная экстракция.

В данном исследовании изучались три варианта: экстракция в течение 2 часов с помощью обратного холодильника, экстракция в течение 15 часов при перемешивании при температуре 25°C, а также экстракция с помощью ультразвуковой бани Transsonic 310/Н в течение 15 мин трехкратно с перерывом в 1 мин.

К навеске сырья массой 3 г добавляли 150 мл 70% этилового спирта и экстрагировали одним из трех вышеперечисленных методов. Полученную суспензию центрифугировали при 10 000 g 30 мин, супернатант упаривали на водяной бане при температуре не превышающей 50°C, растворяли в 1 мл метанола и использовали для анализа, как «грубый» экстракт, либо растворяли в 40 мл 50% этилового спирта и использовали для дальнейшей очистки.

Б). Жидкостно-жидкостная экстракция.

Второй этап при выделении алкалоидов индольного ряда из катарантуса розового, заключался в последовательной, жидкостно-жидкостной экстракции, предполагающей очистку алкалоидов от различных сопутствующих веществ. В данном исследовании рассматривалось два варианта экстракции.

Способ 1 жидкостно-жидкостной экстракции представляет собой схему выделения алкалоидов, принятую многими авторами [4,5], с некоторыми изменениями и дополнениями. В данной работе полученные экстракты (40 мл 50% этанола см п. А) подкислялись с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ), до pH 1, что обеспечивало перевод алкалоидов в полярное состояние. Чаще всего перевод алкалоидов в состояние соли осуществляется с помощью HCl [2]. Кроме того, предполагалось, исходя из литературных данных [2], что ТФУ обеспечивает связывание молекул хлорофилла и их осаждение. Подкисленные экстракты инкубировали при 25°C в течение 15 часов, затем центрифугировали. Осадок отбрасывали, а полученный супернатант промывали гексаном (3×20мл), экстрагирующим из кислого спиртового раствора сопутствующие неполярные соединения. Экстракт, содержащий алкалоиды и прочие полярные соединения, после очистки гексаном, был охлажден до 10°C и обработан 3%-ным раствором аммиака до pH 8. Затем алкалоиды в форме свободных оснований экстрагировали хлороформом (3×30мл). Хлороформные вытяжки были промыты водой и выпарены на водяной бане при температуре 40°C. Полученный сухой остаток был растворен в 1 мл метанола и использован для анализа выхода алкалоидов с помощью тонкослойной хроматографии.

Способ 2 жидкостно – жидкостной экстракции. Данный способ схож с первым, однако имеет некоторые отличия [6]. Сухой остаток выделяемых веществ после твердофазно – жидкостной экстракции был растворен в 40 мл водного раствора аммиака (pH 9). Щелочной экстракт инкубировали в течение 1 ч при 25°C, а затем экстрагировали алкалоиды в форме оснований хлороформом (3×30мл). Хлороформную вытяжку алкалоидов обрабатывали 3 раза 3%-ным раствором соляной кислоты. Затем солянокислый раствор переводили опять в щелочное состояние и экстрагировали алкалоиды хлороформом (3×30мл). Хлороформную вытяжку упаривали. Полученный сухой остаток был растворен в 1 мл метанола и использован для анализа выхода алкалоидов с помощью тонкослойной хроматографии.

Анализ состава алкалоидов. Качественный анализ состава полученных экстрактов осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). В качестве подвижной фазы использовали систему этилацетат : метанол (90:10). В качестве стандартов вносили алкалоиды объемом 2 мкл 2 мМ раствора – аймалицин, винкамин, винбластин, а также предшественники данных алкалоидов – триптамин и триптофан. Объем вносимой пробы экстракта составлял 5 мкл.

При УФ облучении пластин фиксировали специфическую бриллиантово-синюю флуоресценцию пятен, соответствующих алкалоидам. Кроме того, хроматографические пластинки обрабатывались специфическим реагентом Драгендорфа, в присутствии которого на пластинках обнаруживались характерные оранжевые пятна, свидетельствующие о наличии алкалоидов.

Результаты и обсуждение

Известно, что многие алкалоиды, включая индольные, могут быть выделены из растительного материала с помощью кислотнo-щелочной экстракции [7]. Данный процесс заключается в последовательной жидкостно-жидкостной экстракции, основанной на их химических свойствах, с целью очищения и выделения кислотных и основных форм алкалоидов из смеси [7].

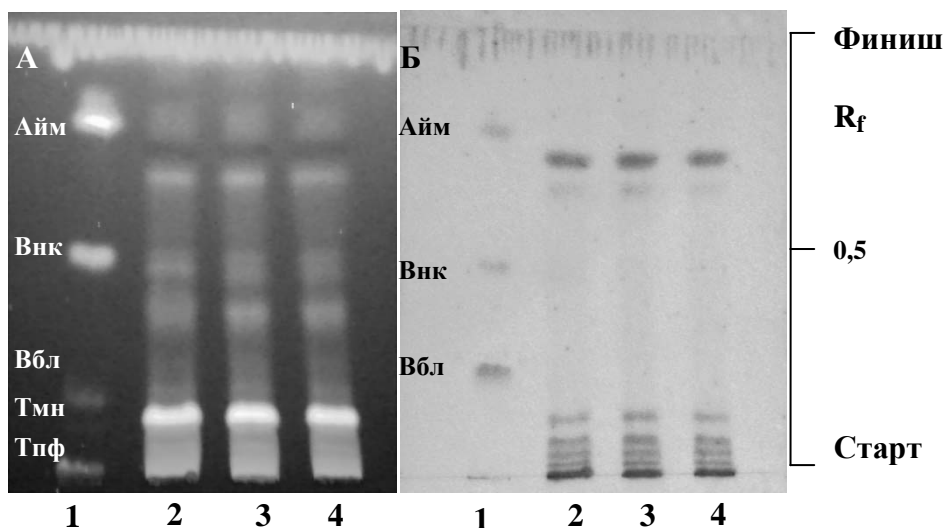
Алкалоиды представляют собой химические соединения, имеющие в составе молекулы гетероцикла основной атом азота, придающий всей молекуле основные свойства, благодаря чему они образуют соли в водных кислых средах, проявляя лучшую растворимость и повышенную устойчивость [8,9]. Этот процесс аналогичен образованию солей аминов и состоит в присоединении к каждому аминному азоту одного эквивалента кислоты. Щелочи, раствор аммиака, щелочные карбонаты и бикарбонаты разлагают соли алкалоидов с выделением свободных оснований. В виде свободных оснований алкалоиды хорошо растворяются во многих органических растворителях – хлороформе, эфире и др. Соли же алкалоидов, наоборот, хорошо растворяются в воде и практически не растворяются в органических растворителях. [6] Благодаря данным качествам, применяют те или иные приемы извлечения алкалоидов из растительного сырья. Для разделения смеси алкалоидов в полученном экстракте и их идентификации, наиболее приемлемым методом является тонкослойная хроматография.

При проведении исследований на первом этапе были проанализированы с помощью ТСХ три «грубых» экстракта, полученных с использованием различных способов твердофазно - жидкостной экстракции (рис.1). На рисунке видно, что при УФ облучении пластины регистрируется специфическая бриллиантово-синяя флуоресценция пятен, по величине R_f приблизительно совпадающая со стандартами аймалицина, винкамина и триптамина. После обработки пластины реактивом Драгендорфа экстракт генерирует четыре четких специфически окрашенных пятна оранжевого цвета, при невысоких значениях R_f , варьирующих от 0,01 до 0,12, также пятно с $R_f \sim 0,7$. Исходя из литературных данных [10], хорошо различимые пятна при значении $R_f \sim 0,7$ при данной системе разделения, соответствуют основному алкалоиду катарантуса розового – катарантину.

Существенных различий в составе алкалоидов между вариантами 1, 2 и 3 в данном случае не наблюдалось.

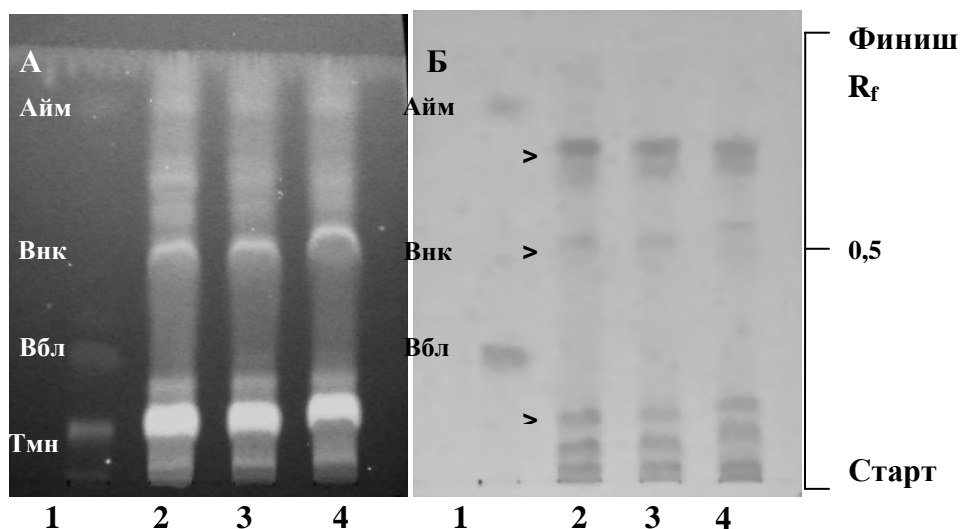
При дальнейшей жидкостно-жидкостной экстракции алкалоидов способом 1, следующей после твердофазно – жидкостной, обнаруживаются незначительные различия в составе алкалоидов в полученных экстрактах при трех методах выделения. Так, более четкие пятна при $R_f \sim 0,75$, 0,53 и 0,13 наблюдаются при разделении экстракта, полученного с помощью обратного холодильника (рис.2). Кроме того, во всех трех экстрактах проявляются примерно с одинаковой интенсивностью пятна, R_f которых составляет 0,67, а также в диапазоне от 0,02 до 0,1.

Хроматографическое разделение компонентов экстрактов, полученных с помощью способа 2 жидкостно – жидкостной экстракции показано на рис.3. Видно, что данный способ экстракции позволяет выявить наиболее существенные различия в составе алкалоидов в исследуемых экстрактах. Так, при обработке пластин реактивом Драгендорфа наиболее интенсивное окрашивание проявляется в экстракте, полученном с использованием обратного холодильника. Наименьшее содержание исследуемых метаболитов наблюдается при экстракции в течение 15 часов при перемешивании при 25°C.



А-УФ-365нм, Б – реактив Драгендорфа, 1 – стандарты (Тпф – триптофан, Тмн – триптамин, Вбл – винбластин, Внк – винкамин, Айм – аймалицин), 2 – экстракция 2 часа с помощью обратного холодильника, 3 – экстракция в течение 15 часов при помешивании при температуре, равной 25°C, 4 – экстракция при обработке ультразвуком в течение 15 мин троекратно с перерывом в 1 мин.

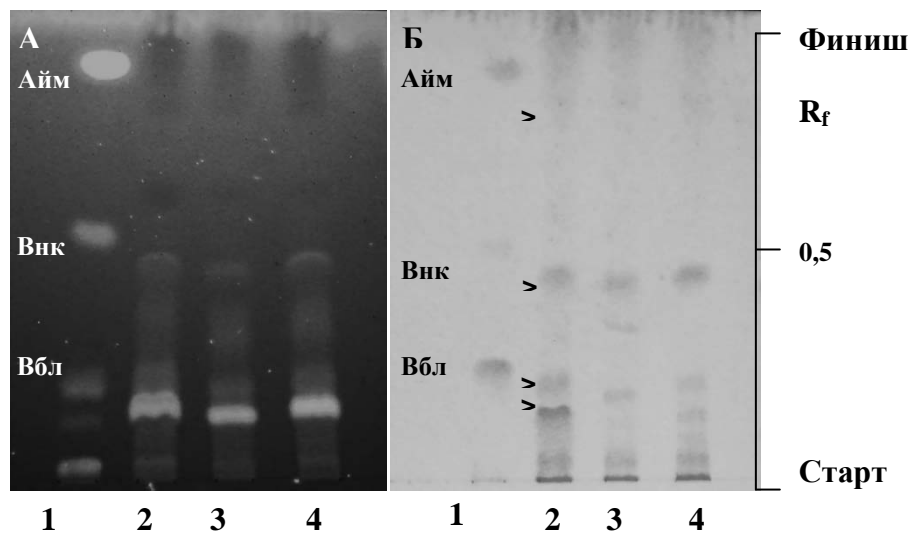
Рисунок 1 – Хроматограмма «грубых» экстрактов из листьев *Catharanthus roseus*



А-УФ-365нм, Б - реактив Драгендорфа, 1 – стандарты (Тмн – триптамин, Вбл – винбластин, Внк – винкамин, Айм – аймалицин), 2 – экстракция 2 часа с помощью обратного холодильника, 3 – экстракция в течение 15 часов при помешивании при температуре, равной 25°C, 4 – экстракция при обработке ультразвуком в течение 15 мин троекратно с перерывом в 1 мин. Рисунок 2 – Хроматограмма хлороформных экстрактов из листьев *Catharanthus roseus*, полученных способом 1

В случае экстракции с обратным холодильником, алкалоиды хорошо определяются и на хроматограмме отличаются от двух других вариантов по трем характерным оранжевым пятнам с $R_f \sim 0,15$, $R_f \sim 0,2$ и $R_f \sim 0,46$. Однако, при данном типе жидкостно-жидкостной экстракции, содержание алкалоидов, R_f которых соответствует

0,75 и 0,67, ниже предела определения. Этот факт, вероятно, связан с неполным процессом экстракции, что подтверждается результатами, представленными на рис.4. В данном случае на дорожках №4 и №5 нанесены образцы водной и хлороформной вытяжек, соответственно, которые являются фазами очистки «грубого» экстракта (дорожка №2) от сопутствующих веществ (см. раздел методы исследования). На рисунке также видно, что в хлороформной вытяжке (дорожка №5) остается некоторая часть алкалоидов, не вышедшая в водный кислый экстракт, например, вещество, R_f которого соответствует алкалоиду катарантину.

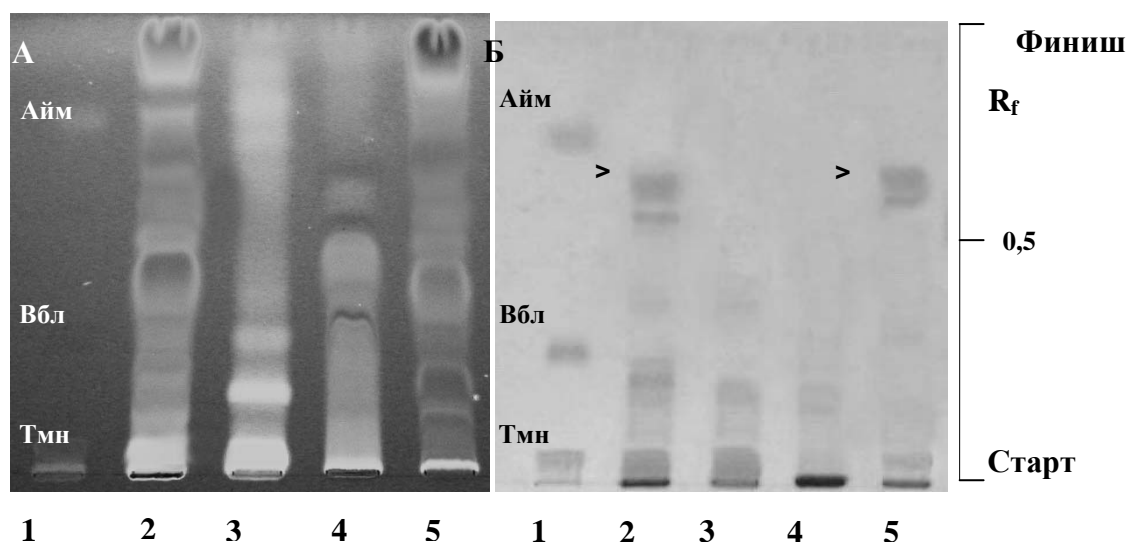


А-УФ-365нм, Б - реактив Драгендорфа, 1 – стандарты (Вбл – винбластин, Внк – винкамин, Айм – аймалицин), 2 – экстракция 2 часа с помощью обратного холодильника, 3 – экстракция в течение 15 часов при помешивании при температуре, равной 25°C, 4 – экстракция при обработке ультразвуком в течение 15 мин троекратно с перерывом в 1 мин.

Рисунок 3 – Хроматограмма хлороформных экстрактов из листьев *Catharanthus roseus*, полученных способом 2

Для идентификации индивидуальных алкалоидов в полученных образцах, в экстракты вносились по 2 мкл 2мМ раствора соответствующего стандарта (рис.5,6), где 2 – экстракт, в котором присутствует экзогенный винбластин, 3 – экстракт с винкамином, 4 – экстракт с аймалицином и 5 – экстракт без добавления стандартов. В данном случае использовались два образца, полученные при экстракции с обратным холодильником при жидкостно – жидкостной экстракции способом №1 (рис.5) и способом №2 (рис.6).

Как видно из рисунков, ни винбластин, ни аймалицин не имеют аналогичную величину R_f , соответствующую пятнам алкалоидов в экстракте, окрашенным реактивом Драгендорфа. Исключение составляет область со значением $R_f \sim 0,45$. R_f данного вещества, входящего в состав экстракта, соответствует значению R_f винкамина.

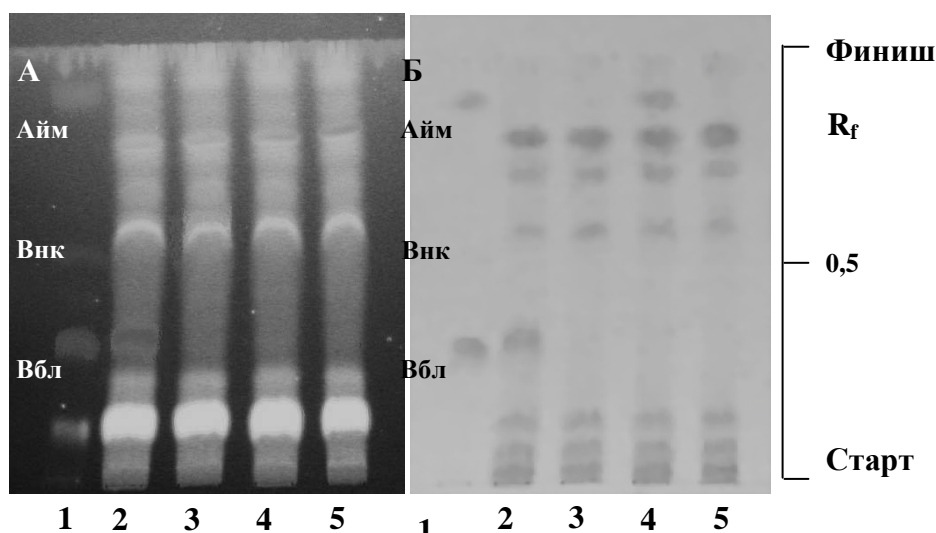


А-УФ-365нм, Б - реактив Драгендорфа, 1 – стандарты (Тмн – триптамин, Вбл – винбластин, Айм – аймалицин), 2 – «грубый» экстракт, 3 – очищенный экстракт, полученный при жидкостно – жидкостной экстракции «грубого» экстракта методом №2, 4 – водная вытяжка, оставшаяся после очистки экстракта, 5 – хлороформная вытяжка, оставшаяся после очистки экстракта.

Рисунок 4 – Хроматограмма экстрактов из листьев *Catharanthus roseus*

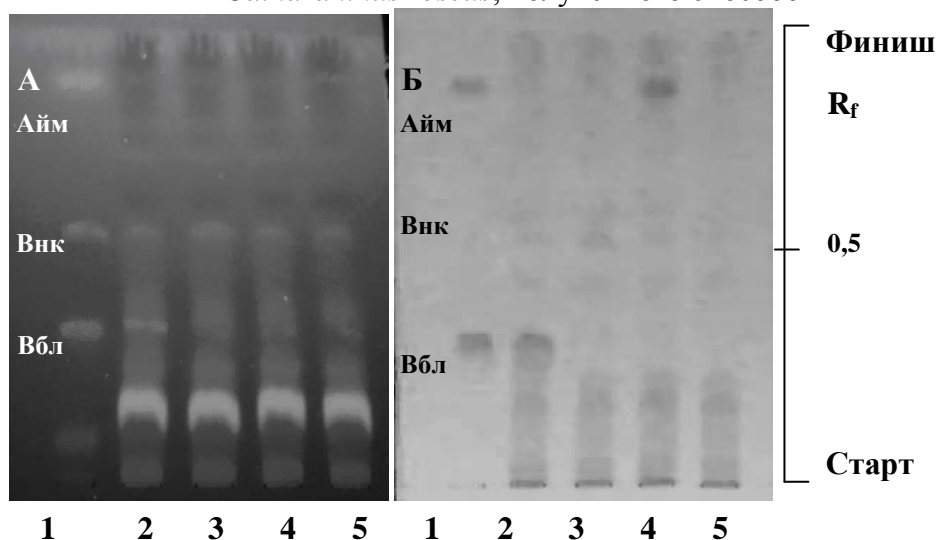
При применении первого способа жидкостно–жидкостной экстракции также наблюдаются различия трех образцов (рис.2), хотя, не столь существенные. Кроме того, в данном случае, хорошо заметна полнота извлечения веществ в исследуемых экстрактах. Однако, вместе с тем, в очищенный экстракт переходит и значительная доля сопутствующих веществ, «загрязняя» таким образом, получаемый продукт.

Потери при втором способе жидкостно–жидкостной экстракции, очевидно, обусловлены большим количеством стадий процесса очистки алкалоидов от сопутствующих веществ, что по сравнению со способом №1, позволяет избавиться от большей их части, однако приводит практически к полной потере алкалоидов со значениями $R_f \sim 0,75$ и $R_f \sim 0,67$. Решить данную проблему можно с использованием таких приемов, как увеличение времени экстракции алкалоидов и повышение концентрации кислотности и основности растворов, применяемых для перевода веществ из одной фазы в другую. Таким образом, второй метод жидкостно–жидкостной экстракции является более приемлемым. Кроме того, в процессе проведения экстракции №1, вероятно, существенным и определяющим фактором получения максимального выхода алкалоидов явился этап выдерживания подкисленных экстрактов в течение 15 часов при 25°C. Следовательно, временной фактор при экстрагировании алкалоидов играет существенную роль.



А-УФ-365нм, Б - реактив Драгендорфа, 1 – стандарты (Вбл – винбластин, Внк – винкамин, Айм – аймалицин) 2 – экстракт, в котором присутствует экзогенный винбластин, 3 – экстракт с винкамином, 4 – экстракт с аймалицином и 5 – экстракт без добавления стандартов.

Рисунок 5 – Хроматограмма хлороформного экстракта из листьев *Catharanthus roseus*, полученного способом 1

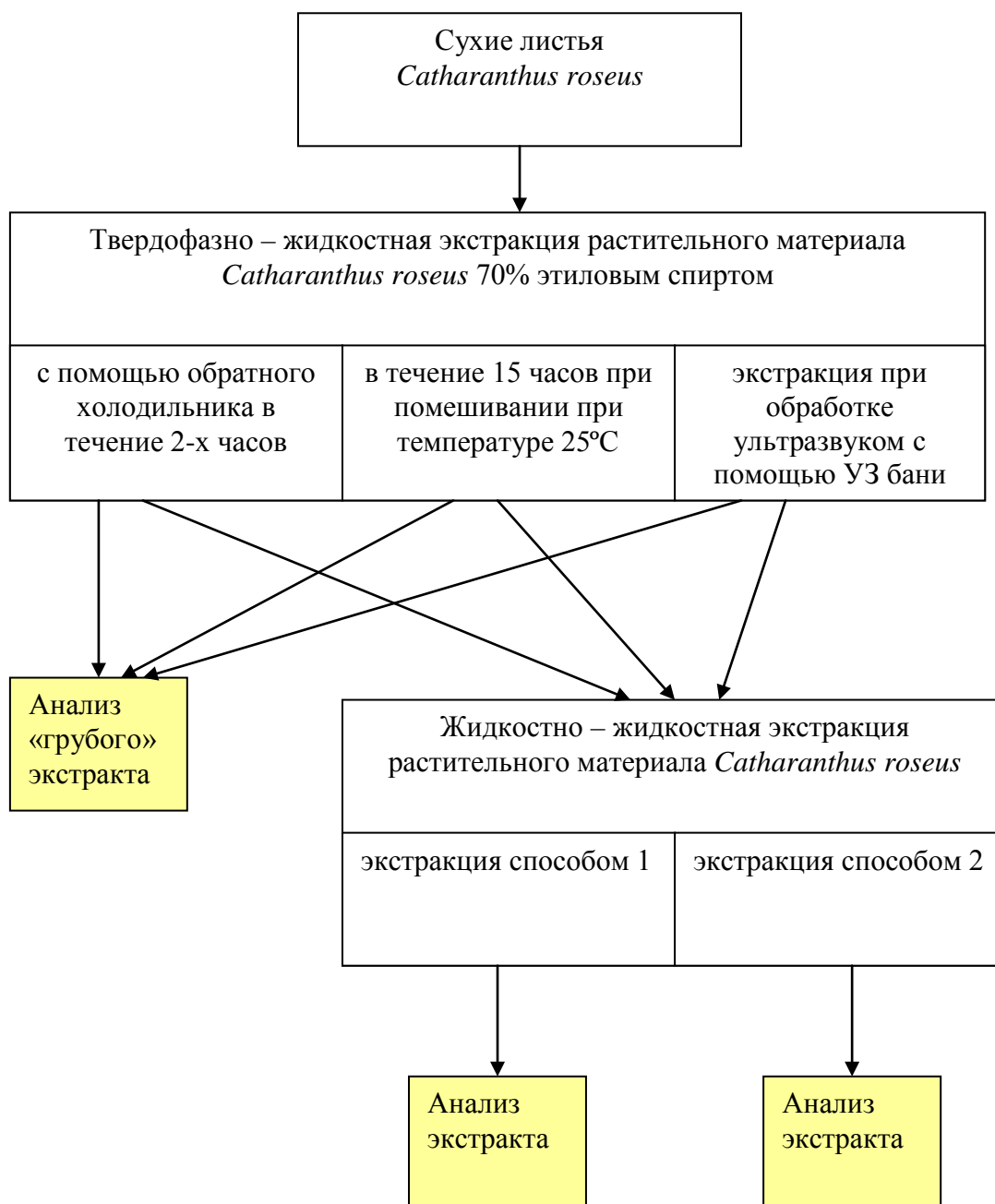


А-УФ-365нм, Б - реактив Драгендорфа, 1 – стандарты (Вбл – винбластин, Внк – винкамин, Айм – аймалицин) 2 – экстракт, в котором присутствует экзогенный винбластин, 3 – экстракт с винкамином, 4 – экстракт с аймалицином и 5 – экстракт без добавления стандартов.

Рисунок 6 – Хроматограмма хлороформного экстракта из листьев *Catharanthus roseus*, полученного способом 2

Кроме того, применение ТФУ, вместо традиционно используемой HCl, явилось удачным выбором в силу того, что данная кислота одновременно еще выступает как реагент, осаждающий молекулы хлорофилла. Следовательно, данная кислота обладает большим преимуществом перед прочими кислотами.

В заключение приводится общая схема эксперимента:



Коллектив авторов выражает глубокую признательность зав. НИЛ прикладных проблем биохимии – Курченко В.П. за помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов.

Список литературы

1. Jian Zhao. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering / Jian Zhao, Robert Verpoorte // *Phytochemistry Reviews*. – 2007. Vol. 6. – P. 435–457.
2. Hisiger, S. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC / Steve Hisiger, Mario Jolicœur // *Phytochemistry Reviews*. – 2007. Vol. 6. – P. 207–234.
3. Hildebert Wagner, Sabine Bladt. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*/2nd ed. 1996
4. Unial, G.C. Symmetry C₁₈ column: a better choice for the analysis of indole alkaloids of *Catharanthus roseus* / G.C. Unial [et al.] // *Phytochem. Anal.* – 2001. – Vol. 12 – P.206– 210.

5. Singh, D. Simultaneous determination of *Catharanthus* alkaloids using reversed phase high performance liquid chromatography / D. Singh [et al.] // J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol. – 2000. – V. 23. – P. 601– 607.
6. Мироненко, А.В. Методы определения алкалоидов / А.В. Мироненко. Минск, 1966.
7. Laurence, M. Experimental organic chemistry: Principles and Practice / M. Laurence [et al.] P. 118-122.
8. Goodbody, A. Extraction of 3',4'-Anhydrovinblastine from *Catharanthus roseus* / A. Goodbody [et al.] // Phytochemistry. – 1988. – V. 27. – P. 1713–1717.
9. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine / A. Verma. [et al.] // Molecules. – 2007. V. – 12.– P. 1307–1315.
10. Scragg, A.H. Alkaloid secondary products from *Catharanthus roseus* cell suspension / In Methods in molecular biology. Plant cell and tissue culture. Edited by Jeffrey W.Pollard and John M. Walker. – 1990. – Vol. 6.– P. 537– 544.