

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИРИНГИНА В КОРЕ СИРЕНИ РАЗЛИЧНОЙ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

В.С. Подберезкин, Е.М. Червяковский, А.В. Янцевич*, С.Е. Булыко**,
И.М. Гаранович**, Е.В. Спиридович**, В.П. Курченко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

** ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Введение

Род сирень (*Syringa* L.) относится к семейству Маслинные (*Oleaceae* Lindl). Описан К. Линнеем в 1753 г. Род включает листопадные деревья и кустарники. Распространен в Южной Европе и восточной Азии, в основном в Китае [11]. Согласно различным источникам род насчитывает от 20 [12] до 36 видов [13], кроме того, вид сирень обыкновенная (*S. vulgaris*) включает около 1300–1600 сортов [14]. Также существует большое количество сортов, межвидовых гибридов и форм среди других видов данного рода. В настоящее время род сирень подразделяют на 2 подрода: сирени и лигустрина. Подрод сирени состоит из черырёх серий: пушистые, волосистые, перистолистные и настоящие сирени.

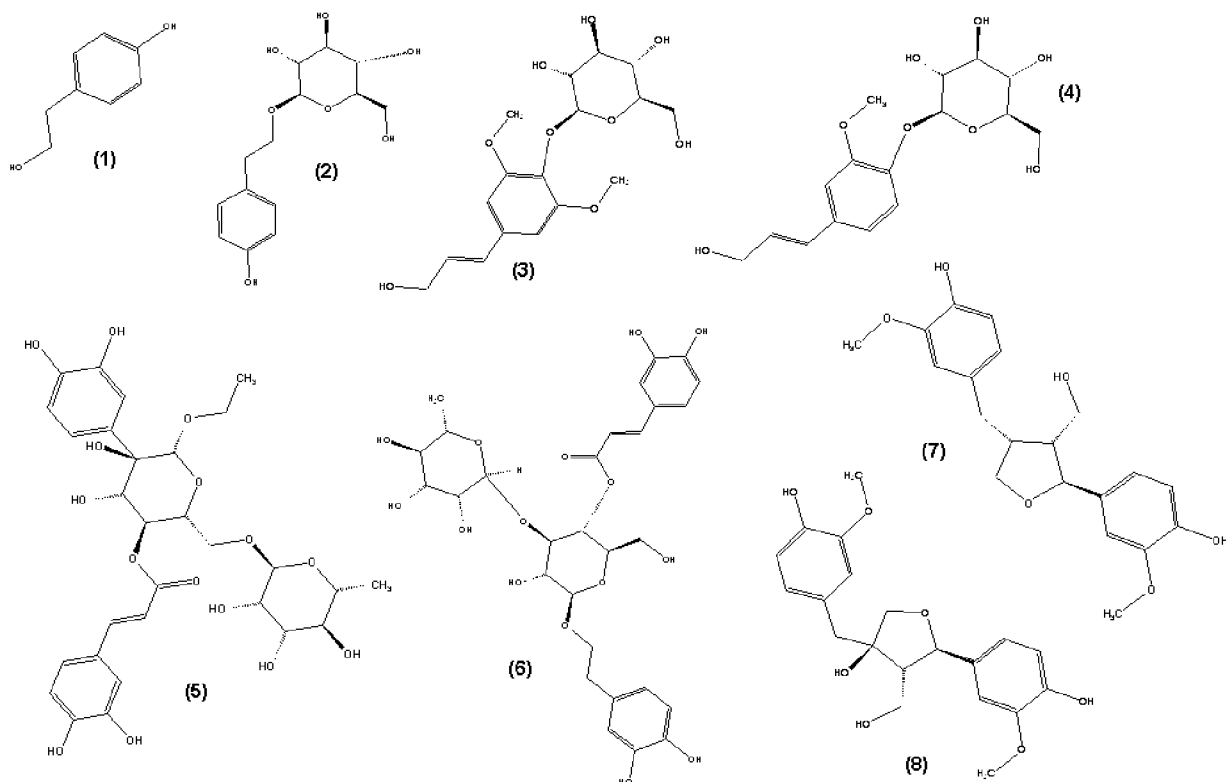
Препараты сирени используются в основном в народной медицине. Издавна плоды и кора сирени использовались в европейской народной медицине в качестве тонизирующего препарата, а свежие листья применялись для лечения малярии. У нанайцев настойка коры (на водке) используется как тонизирующее средство, соцветия – как тонизирующее и при лечении туберкулеза; в Японии соцветия применяются в качестве диуретического средства [15]. При использовании и создании препаратов из тканей сирени требуется осторожность, т.к. растение ядовито.

Растущие потребности фармацевтического рынка, связанные с необходимостью разработки новых лекарственных препаратов, создали предпосылки для изучения химического состава лекарственных растений, в том числе и в коре сирени [2]. Детальные исследования показали, что в данном природном источнике обнаруживается ряд фенольных соединений, многие из которых находится в гликозилированной форме (рисунок 1) [3, 4]. Наиболее известным из них является 4-О-β-D-глюкопиранозид синапового спирта или сирингин. Относительно недавно было показано, что сирингин обладает иммуномодулирующими, противоаллергическими и противовоспалительными свойствами [5]. Он также подавляет процессы резорбции костей, проявляет гипотензивный эффект и цитостатическое действие на раковые клеточные линии [6–8].

Не менее интересны и другие соединения сирени. Так, для актеозида выявлены антиоксидантные и цитостатические активности [9]. Кроме того, обнаружены иридоиды: метилсирамуральдегид в коре сирени амурской (*Syringa amurensis* Rupr.) [15], дезоксилогановая, 8-эпидезоксилогановая, 7-эпилогановая и логановая кислоты – сирени венгерской (*Syringa josikae* Jacq. Fil.). Кора и листья молодых ветвей сирени амурской (*Syringa amurensis* Rupr.) и сирени Вольфа (*Syringa wolfii* Schned.) обладают антиоксидантными свойствами [15].

Из литературных данных следует, что кора сирени является важным источником биологически активных соединений. Однако информация по количественному содержанию данных веществ, в частности сирингина, у различных представителей рода *Syringa* отсутствует. Прежде всего, это связано с недостаточным развитием методической базы для проведения подобных исследований. В связи с этим целью данной работы явилась оптимизация методов выделения и количественного анализа сирингина из коры сирени различных видов.

Растущие потребности фармацевтического рынка, связанные с необходимостью разработки новых лекарственных препаратов, создали предпосылки для изучения химического состава лекарственных растений, в том числе и в коре сирени [2]. Детальные исследования показали, что в данном природном источнике обнаруживается ряд фенольных соединений, многие из которых находится в гликозилированной форме (рисунок 1) [3, 4]. Наиболее известным из них является 4-О-β-D-глюкопиранозид синапового спирта или сирингин. Относительно недавно было показано, что сирингин обладает иммуномодулирующими, противоаллергическими и противовоспалительными свойствами [5]. Он также подавляет процессы резорбции костей, проявляет гипотензивный эффект и цитостатическое действие на раковые клеточные линии [6–8].



1 – тирозол; 2 – родиолозид; 3 – сирингин; 4 – кониферин; 5 – форзитиазид; 6 – актеозид; 7 – ларицеризенол; 8 – олилвил

Рисунок 1 – Фенольные соединения, обнаруживаемые в коре сирени

Методы исследования

Сырье. В качестве объектов исследования были выбраны следующие виды растений, произрастающие в Ботаническом саду Национальной академии наук Беларуси: сирень пониклая (*Syringa reflexa*), сирень юньнаньская (*Syringa yunnanensis*), сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris*), сирень Звегинцова (*Syringa sweginzowii*), сирень венгерская (*Syringa josikaea*), сирень Вольфа (*Syringa wolfii*), сирень пушистая (*Syringa pubescens*), сирень сетчатая (*Syringa reticulata*), сирень мелколистная (*Syringa microphylla*), сирень амурская (*Syringa amurensis*), сирень пекинская (*Syringa pekinensis*), сирень волосистая (*Syringa villosa*), сирень гималайская (*Syringa emodi*). Побеги сирени заготовили 7 июля 2010 года. Кору отделяли при помощи скальпеля, взвешивали, после чего сушили на воздухе. Высушенную кору измельчали и просеивали через сито с размером ячейки 2 мм. Полученный материал хранили в закрытых емкостях до его дальнейшего использования.

Экстракция фенольных соединений. Экстракцию фенольных соединений проводили по следующей схеме. В пробирку с притертой крышкой вносили 1 г измельченной коры сирени и приливали 10 мл 70% этанола. Пробирку помещали в ультразвуковую баню Transsonic T310/H (Германия) на 1 час при 35 кГц, периодически перемешивая.

Полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр, обрабатывали двумя объемами гексана и хранили в холодильнике при 4°C без доступа света.

Тонкослойная хроматография экстрактов коры сирени. Аналитическую и препаративную ТСХ проводили с использованием пластинок покрытых силикагелем 60F фирмы «Merck». В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформа, этанола и воды в соотношении 26:14:3. соответственно. Экстракты наносили в количестве 3–9 мкл. После разделения визуализацию проводили путем окрашивания пластины 12% серной кислотой или в УФ-свете.

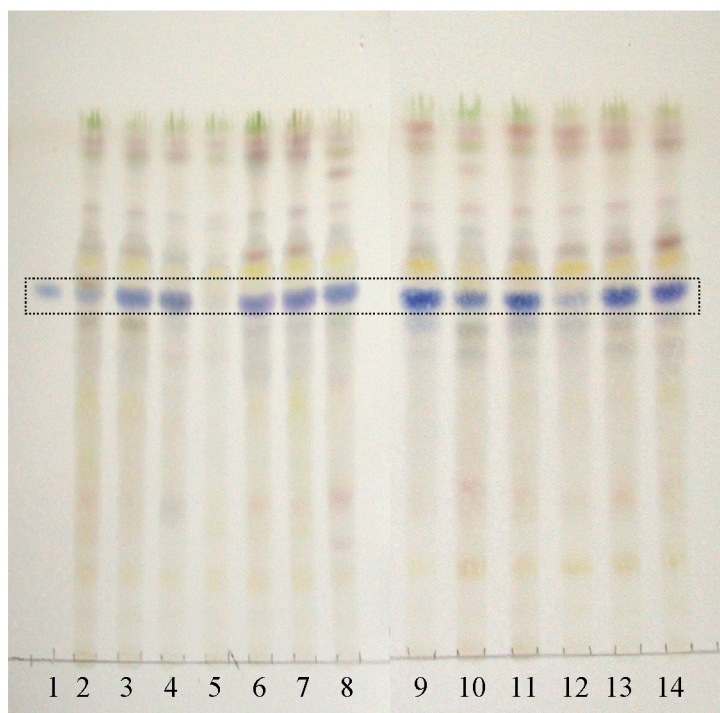
Для получения очищенного сирингина на пластинку наносили 150 мкл спиртового экстракта коры. После хроматографии пластину тщательно высушивали горячим воздухом и детектировали сирингин в УФ свете по величине его *R_f*. Элюцию соединения с сорбента проводили с использованием метанола. Полученный элюат помещали в пробирку с крышкой и хранили в холодильнике при 4°C без доступа света.

Высокоэффективная хроматография экстрактов коры сирени. ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1100 («Agilent Technologies», США), с использованием колонки Диасфер C18 (250×4 мм, 5 мкм). В качестве мобильной фазы применяли смесь дистиллированной воды и ацетонитрила, содержащую 0,2% уксусную кислоту (v/v). В процессе хроматографии состав смеси изменялся от 0 до 100% по содержанию ацетонитрила в течение 26 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Детекция проводилась при двух длинах волн 224 и 270 нм.

Масс-спектрометрия. Масс-спектры соединений из коры сирени получали с использованием оборудования фирмы «Thermo Scientific» (США). Анализ вели в режиме электроспрей ионизации, при напряжении и температуре ион-транспортного капилляра – 4,5 кВ и 273°C, соответственно, напряжении на конусе – 43 В. Скорость потока газа-носителя равнялась 30.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работ была подобрана методика экстракции сирингина из коры сирени, которая основывалась на использовании 70% этилового спирта и ультразвуковой обработке растительного сырья с целью увеличения выхода веществ. Для удаления хлорофилла и других липофильных соединений экстракты дополнительно обрабатывали гексаном. С использованием данного метода проведено извлечение соединений из коры 13 различных видов сирени, а их состав проанализирован при помощи метода ТСХ (рисунок 2). После обработки хроматографической пластинки серной кислотой сирингин выявляется как пятно характерного синего цвета, что позволяет легко отличить его от других фенольных гликозидов. Результаты ТСХ указывают на то, что различные виды сирени различаются по содержанию сирингина. Визуальная оценка позволяет сделать вывод, что в экстрактах, полученных из коры *S. reticulata*, *S. yunnanensis*, *S. josikaea*, *S. wolfii*, *S. pubescens*, *S. amurensis*, *S. vulgaris*, *S. villosa* и *S. Emodi*, обнаруживается значительное количество фенольного гликозида, тогда как в коре *S. sweginzowii*, *S. reflexa*, *S. pekinensis* его содержание относительно невелико.



- 1 – синрингин-стандарт;
- 2 – *S. reflexa*;
- 3 – *S. yunnanensis*;
- 4 – *S. vulgaris*;
- 5 – *S. sweginzowii*;
- 6 – *S. josikaea*;
- 7 – *S. wolfii*;
- 8 – *S. pubescens*;
- 9 – *S. reticulata*;
- 10 – *S. microphylla*;
- 11 – *S. amurensis*;
- 12 – *S. pekinensis*;
- 13 – *S. villosa*;
- 14 – *S. emodi*

Рисунок 2 – Результаты ТСХ анализа фенольных соединений из коры сирени различных видов

Для подтверждения данного вывода применяли метод ВЭЖХ, позволяющий точно оценить количество того или иного компонента в анализируемом образце. Хроматографию проводили с использованием обращеннофазного сорбента C18 в условиях градиентной элюции соединений смесью ацетонитрила с 0,2% уксусной кислотой. Наиболее типичная хроматограмма представлена на рисунке 3. На ней обнаруживается несколько пиков, преобладающими по интенсивности из которых в большинстве экстрактов являются пики на 8,9, 16,6 и 18,5 мин. Эксперименты с использованием стандартного соединения синрингина, полученного в результате ТСХ, показали, что вещество со временем удерживания 8,9 мин является синрингином.

Дополнительное подтверждение этого факта было получено с применением метода масс-спектрометрии. В масс-спектре выявляются интенсивные пики с 372 и 371 m/z , соответствующие молекулярным ионам синрингина. Кроме того, присутствует группа фрагментарных ионов с m/z около 341, вероятно, образовавшихся в результате процесса отщепления метоксильной группировки от остатка синапового спирта.

С использованием стандартного соединения была проведена количественная характеристика экстрактов коры сирени по содержанию синрингина. Полученные данные представлены в таблице 1. Они хорошо согласуются с результатами ТСХ и указывают на то, что наибольшее количество синрингина обнаруживается в коре *S. reticulata*, которое более чем в полтора раза выше, чем у других видов сирени, также характеризующихся высоким содержанием синрингина. К числу последних можно отнести *S. villosa*, *S. vulgaris*, *S. emodi*, *S. yunnanensis*, *S. amurensis* и *S. wolfii*. Напротив, синрингин практически отсутствует в коре *S. sweginzowii*, а у *S. reflexa* и *S. pekinensis* его количество практически в 10 раз меньше, чем у *S. reticulata*.

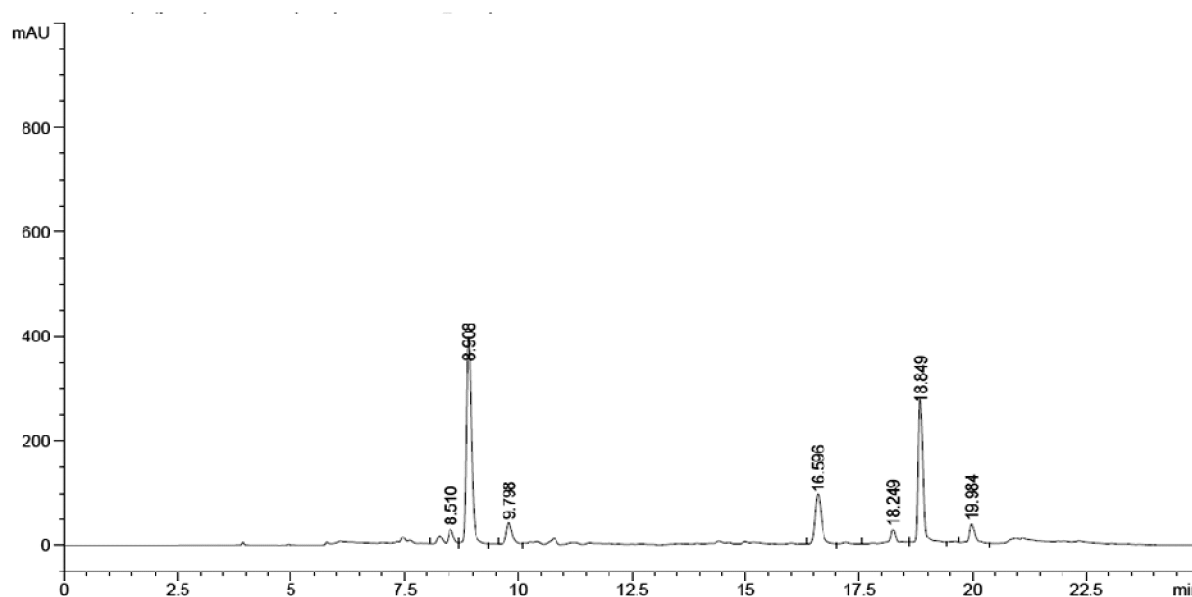


Рисунок 3 – Типичная ВЭЖХ хроматограмма соединений, содержащихся в спиртовых экстрактах коры сирени (270 нм)

Таблица 1 – Содержание сирингина в спиртовых экстрактах различных видов сирени по данным ВЭЖХ анализа

Вид	Площадь пика, mAU*s	Содержание сирингина, в мг на г сухой массы
<i>S. reticulata</i>	6556,6	4,90
<i>S. villosa</i>	4240,4	3,17
<i>S. vulgaris</i>	4092,5	3,06
<i>S. emodi</i>	3976	2,97
<i>S. wolfii</i>	3845,4	2,87
<i>S. amurensis</i>	3779,2	2,82
<i>S. yunnanensis</i>	3721,9	2,78
<i>S. pubescens</i>	3192	2,38
<i>S. josikaea</i>	3010,2	2,25
<i>S. microphylla</i>	2108,4	1,57
<i>S. pekinensis</i>	769,9	0,58
<i>S. reflexa</i>	688,8	0,51
<i>S. sweginzowii</i>	0	0,00

Выводы

Проведенные исследования позволили выявить наиболее перспективный источник биологически активного фенольного гликозида сирингина среди различных представителей рода *Syringa*, произрастающих на территории Ботанического сада НАН Беларуси. Очевидно, что проведение селекционных работ, направленных на повышение содержания сирингина, целесообразно выполнять, используя *S. reticulata* в качестве исходного материала.

Список литературы

1. Куркин, В.А. Фармакогнозия / В.А. Куркин. – Самара: ООО "Офорт", 2004. – 1180 с.
2. Актуальные проблемы и перспективы развития фитофармакологии и фитотерапии / В.А. Куркин [и др.] // Мед. Альманах. – 2008. – №4. – С. 41–44.

3. Фенольные соединения коры из *Syringa amurensis* / В.А. Куркин [и др.] // Хим. природ. соед. – 1992. – № 5. – С. 583–585.
4. Куркин, В.А. Лигнаны коры из *Syringa vulgaris* / В.А. Куркин, Н.А. Гриненко, Г.Г. Запесочная // Хим. природ. соед. – 1991. – № 6. – С. 768–771.
5. In vitro and in vivo immunomodulatory effects of syringin / J. Y. Cho [et al.] // J. Pharm. Pharmacol. – 2001. – Vol. 53. – P. 1287–1294.
6. The effect of Kampo formulae on bone resorption in vitro and in vivo. I. Active constituents of Tsu-kan-gan. / H. Li [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 1998. – Vol. 21, № 12. – P. 1322–1326.
7. Ahmad, M. Hypotensive action of syringin from *Syringa vulgaris* / M. Ahmad, K. Aftab // Phytotherapy Res. – 1995. – Vol. 9, № 6. – P. 452–454.
8. Metabolism of liriodendrin and syringin by human intestinal bacteria and their relation to in vitro cytotoxicity. / D. H. Kim [et al.] // Arch. Pharm. Res. – 1999. – Vol. 22, № 1. – P. 30–34.
9. Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa* / S. S. Kim [et al.] // Redox Rep. – 2005. – Vol. 10, № 6. – P. 311–318.
10. Induction of apoptotic cell death in HL-60 cells by acteoside, a phenylpropanoid glycoside / M. Inoue [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 1998. – Vol. 21, № 1. – P. 81–83.
11. Деревья и кустарники СССР дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т.5. Семейства Миртовые. Маслинные. – М.–Л.: Издательство Академии Наук СССР, 1960. – С. 435–462.
12. Vrugtman F. Lilacs: A Gardener's Encyclopedia by John L. Fiala; Oregon. Timber Press. – 416 p.
13. Горб, В.К. Сирени на Украине / В.К. Горб. – К.: Наукова думка, 1989. – 160 с.
14. Иванова, З.Я. Сирени / З.Я. Иванова. – М.: Издательский дом МСП, 2005. – 192 с.
15. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Rutaceae – Elaeagnaceae. – Л.: Наука, 1988. – 357 с.

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SYRINGIN FROM THE BARK OF DIFFERENT *LILAC* SPECIES

V.S. Podberezkin, E.M. Cherviakovsky, A.V. Yantsevich*, S.E. Buliko,
I.M. Garanovich**, E.V. Spiridovich**, V.P. Kurchenko**

Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

***Central Botanical Garden of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

Syringin is a biologically active compound revealing immunomodulatory, anti-allergic, and anti-inflammatory properties. Its determination in plant material is an important task considering the demands of modern pharmacognosy. In the present work the syringin assessment in the alcohol extracts from the bark of different lilac species has been made by means TLC and HPLC methods. The highest quantity of syringin has been discovered in the bark of *Syringa reticulata*. The content of this substance is also high in *S. villosa*, *S. vulgaris*, *S. emodi*. Syringin is almost absent or very low in the bark of *S. sweginzowii*, *S. reflexa*, *S. pekinensis*.