

ВАЛЕНТИНА ВАЧНАДЗЕ¹, НИНА ВАЧНАДЗЕ¹, АЛЕША БАКУРИДЗЕ²,
РАУЛЬ ГОЦИРИДЗЕ³, МАЛХАЗ ДЖОХАДЗЕ², ВАХТАНГ МШВИЛДАДЗЕ¹,
ЛАМЗИРА ЭБРАЛИДЗЕ², ДАЛИ БЕРАШВИЛИ²

МЕМБРАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ В ЭКСТРАКЦИИ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ

¹ТГМУ, Институт Фармакохимии им. И. Кутателадзе, ²Тбилисский Государственный
Медицинский Университет; ³БГУ им. Шота Руставели

VALENTINA VACHNADZE¹, NINA VACHNADZE¹, ALIOSHA BAKURIDZE²,
RAUL GOCIRIDZE³, MALKHAZ JOKHADZE², VAXTANG MSHVILDADZE¹,
LAMZIRA EBRALIDZE², DALI BERASHVILI²

MEMBRANE TECHNOLOGY IN THE EXTRACTION OF INDOLE ALKALOIDS

¹TSMU, I. Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, ²Tbilisi State Medical University,
³Batumi Shota Rustaveli State University

SUMMARY

By using ultrafiltration membrane with a certain porosity, it is possible to achieve selective fractionation of dimeric and monomeric alkaloids at the molecular weight level. With porosity of the membrane 100-150Å and filtration of alcohol extracts of *Vinca rosea* L. obtained from the aerial part of the plant, selective fractionation was achieved within the molecular masses from M⁺ 168 to M⁺ 426. In the fraction of minor alkaloids, a norharman (M⁺ 168), dihydrositsirikin (M⁺ 356) and vindorosine (M⁺ 426) were identified by the method of LC-MS/MS and GC/MS. The fraction of the minor alkaloids showed strong cytotoxic activity against the DLD-1 and WS-1 cell lines (Resazurin test), and according to the Hoechst test, to the cells of all A-549, DLD-1 and WS-1 lines.

Key words: *Vinca rosea* L., ultrafiltration membrane, minor alkaloids

Среди многочисленных известных на сегодняшний день способов экстракции природных соединений мембранная технология – одно из приоритетных направлений в современных технологических и фитотехнологических процессах. Относительная простота микроконструкций микрофильтрационных и ультрафильтрационных мембран, возможность проводить селективное фракционирование на уровне молекулярных масс в исследовании природных органических соединений, в том числе алкалоидов, существенно расширяет область внедрения этих технологий. В фармации эти фильтрационные установки используют для фильтрации жидких лекарственных форм и физиологических растворов. В химической промышленности – в технологии суспензии, эмульсий и т.д. [1-5]. Проведение микро- и ультрафильтрации многокомпонентных растительных экстрактов, содержащих биологически активные алкалоиды, на уровне молекулярных масс – вопрос актуальный. В БГУ им. Ш. Руставели проф. Р.С. Гоциридзе разработал термо- и химически стойкие микро- и ультрафильтрационные мембраны многократного использования.

Целью наших исследований было способом мембранной технологии получить фракцию минорных алкалоидов, сопутствующих „Винбластину” в надземных органах *Vinca rosea*, интродуцированной в Аджарии на побережье Черного моря и выявить их специфическую фармакологическую активность.

Материалы и методы. Объектом исследования были листья и стебли *Vinca rosea* L, собранные в фазе активного цветения в Аджарии [6]. Ультрафильтрационная мембрана была изготовлена на основе раствора полимера– полиоксидиазола. Производительность мембраны составляла 6 л/м² при атмосферном давлении 0,6 атм., селективность – 3% по отношению CaCl₂, что соответствовало пористости 100 – 150 Å.

Качественный анализ. Качественный анализ алкалоидов проводили на пластинках Silicagel (Fluca, Silicagel-TLC) в системе: н. бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1). Детекторы–1% раствор церий амония сернокислого в 85% ортофосфорной кислоте (ЦАС) и реактив Драгендорфа [7].

200 г измельченных воздушно–сухих листьев и стеблей *Vinca rosea* L. экстрагировали трехкратно этиловым спиртом методом настаивания при комнатной температуре. Соотношение

сырья к экстрагенту 1:5. Объединенные этанольные извлечения центрифугировали, надсадочную фазу сгущали под вакуумом до получения густого экстракта. Последний обрабатывали 5% HCl. Алкалоиды из кислого раствора при подщелачивании 25% NH₄OH до pH 9–10 извлекали хлороформом, объединенные хлороформенные извлечения промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод, обезвоживали безводным сульфатом натрия, органический растворитель отгоняли под вакуумом. Полученную сумму растворяли в этиловом спирте (1.5л) и пропускали через мембрану. Фильтрат сгущали под вакуумом досуха. получили сумму алкалоидов (80 мг), которую анализировали методом ТСХ и методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией LC-MS/MS: аппарат–Agilent technologies 1290 infinity 6460 Triple quad LC/MS; колонка: C18 (4.6 X 250 мм), размер частиц 4.5 мкм; температура колонки: 30°C; подвижная фаза: 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты + 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле в соотношении (20:80); скорость подвижной фазы: 1.0 мл/мин; режим сканирования – TIC (полный мониторинг ионов); условия MS: температура газа-300°C; скорость течения газа-10 мл/сек; небулайзер-45мл; капилляр-4000в; напряжение электричества - 1500в; напряжение фрагментатора-150в; коллизионная энергия-35в. А также, газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием GC/MS: аппарат-PerkinElmer; температура инжектора-250°C; температура печи-60°C; температурный градиент-60°C 1 мин; 60°C→250°C 15°C/мин; 250°C→300°C 10°C/мин; температура Колонка–Elite 5-MS; 30mX250 μmX0.25μm трансферлайна-300°C; объем инъецирования–1 мкл; ионизация проходила при 70 эв.; пароноситель–гелий; скорость течения газа–1 мл/мин.

Цитотоксическая активность была оценена на клетках линии A-549 (клетки линии рака легкого), DLD-1 (клетки линии аденокарциномы прямой кишки) и WS-1 (клетки линии нормальных человеческих фибробластов), которые были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC). В качестве позитивного контроля использовали этопозид. Скрининг на выявление специфической фармакологической активности проведен в Канаде, г. Шикутиме в университете Квебека, в отделении фундаментальных наук в лаборатории LASEVE. Выявленная цитотоксичность была выражена как концентрация алкалоидов в мг/мл, препятствующая росту клеток на 50% (IC₅₀).

Результаты и обсуждение. Хроматографированием фракций минорных алкалоидов в тонком слое установили присутствие компонентов, среди которых два соединения по качественной реакции с реактивами ЦАС (устойчивое малиновое окрашивание) и Драгендорфа с одновременной подвижностью на ТСХ, относятся к производным виндолина, два соединения дают окрашивание, характерное для производных с α- и β-карболиновой системой. Анализ и идентификация методами ВЭЖХ с тандемной масс спектроскопией LC- MS/MS и газовой хроматографией GC/MS показал:

Соединение I:

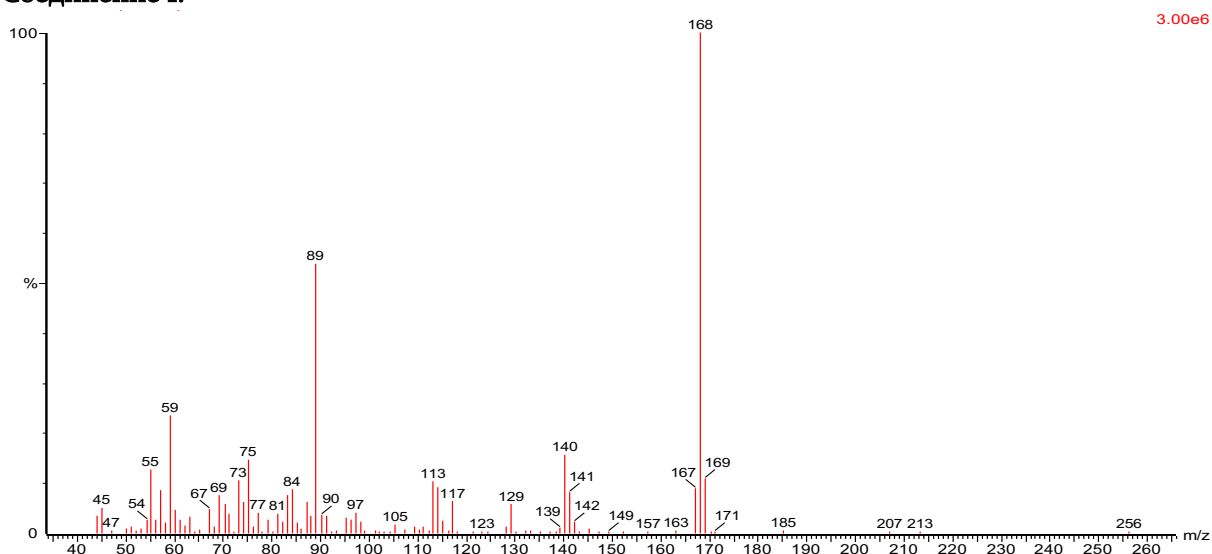


Рис.1: Масспектрограмма фракции α – carboline

Соединение II:

Рис. 2: Масс-спектр norharman (NIST)

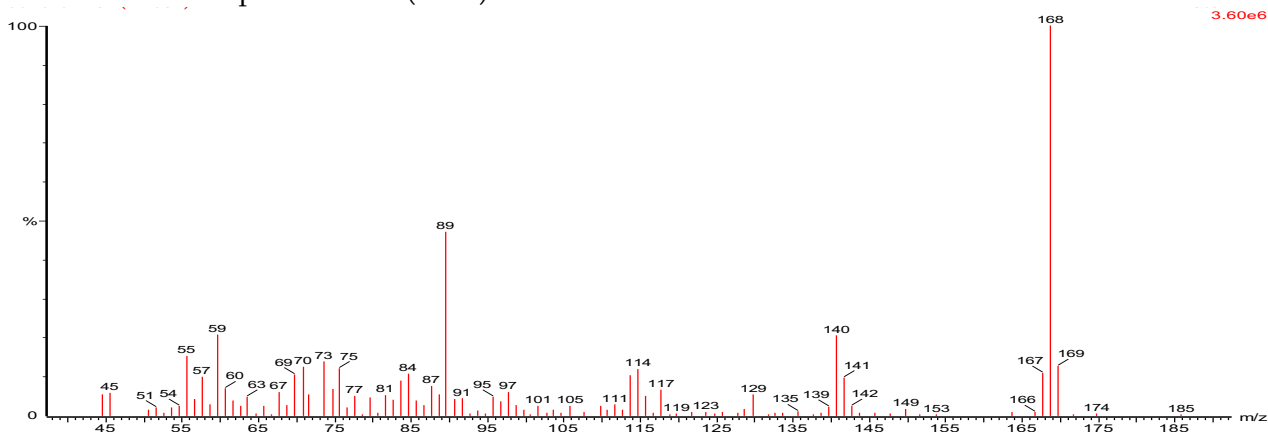


Рис. 3: Масс-спектр norharman

$C_{11}H_8N_2$, 9H - pyrido[3,4 - b] indol; (Рис. 1,2)

M^+ 168(100%) m/e 153, 140, 128, 114, 101, 84.

Соединения III

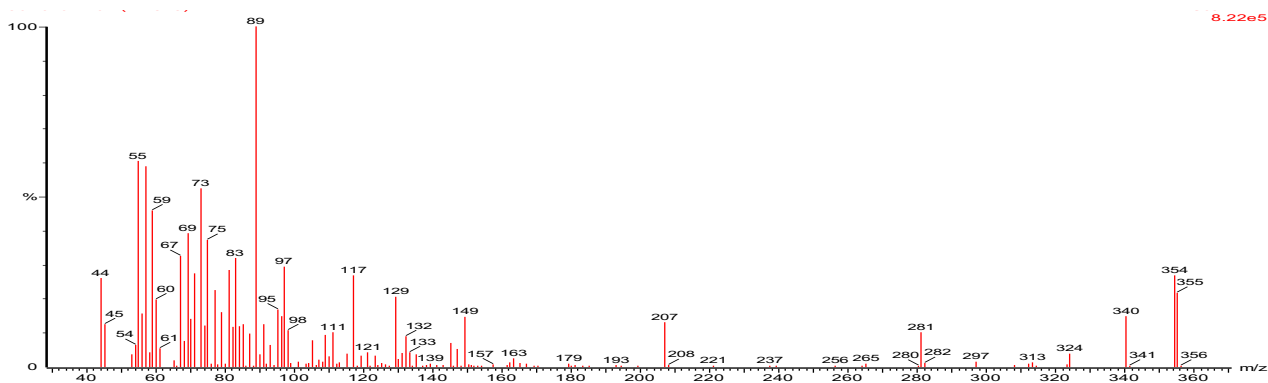
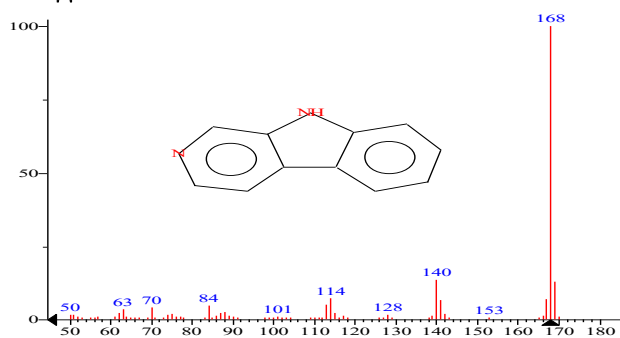
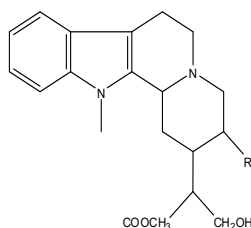


Рис. 4. Масс-спектрограмма Dihydroisitsiricine



$C_{21}H_{28}N_2O_3$, dihydroisitsiricine; R= α - C_2H_5 (этил);

M^+ 356, m/e 355 (M-1) 324, 297, 280, 281, 169, 168, 167, 157, 132, 119, 75, 73, 59, 44(28%)

На основании анализа спектрограмм и сопоставления со сведениями литературы для соединения предложено строение Dihydroisitsiricine, впервые этот алкалоид был выделен из *Pausicyustalia yochime* Pierre [8].

Соединения IV:

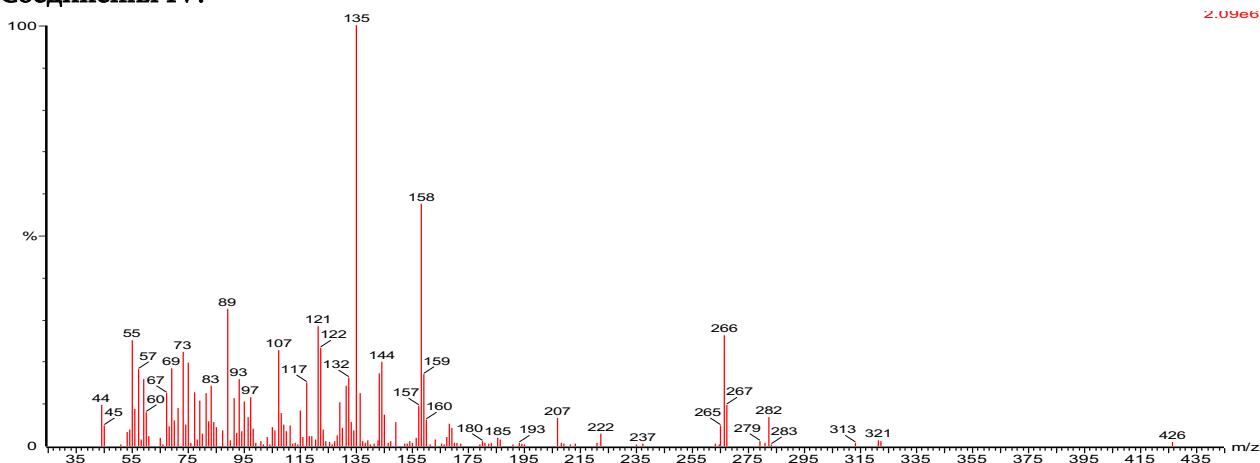


Рис.5. Масс-спектрограмма Vindorosine

$C_{24}H_{30}N_2O_5$, Vindorosine (demetoxyvindoline); M^+ 426, 282(10%), 279(3%), 267(12%), 266(30%), 265(5%), 160(10%), 159(20%), 158(20%), 157(10%), 144(22%), 144(22%), 132(18%), 122(25%), 121(30%).

На основании анализа спектрограммы (Рис.5) и сопоставления со сведениями литературы для соединения IV предложено строение demetoxyvindoline синоним Vindorosine [8].

Таблица 1. *In vitro* цитотоксическая активность фракции минорных алкалоидов *Vinca rosea*.

Объект	Линии клеток					
	Resazurin			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Фракция минорных алкалоидов	>200mg/ml	<1.563mg/ml	5±1 mg/ml	<1.563mg/ml	1.563 mg/ml	11±3 mg/ml
Этопозид	2.3±0.2 μM	2.8±0,4 μM	19±3 μM	0.45±0.09 μM	0.6±0.2 μM	19±7 μM

Выводы: таким образом, использованием ультрафильтрационных мембран с определенной пористостью возможно достичь селективное фракционирование димерных и мономерных алкалоидов на уровне молекулярных масс. При пористости мембраны 100-150 Å и фильтрации спиртовых экстрактов *Vinca rosea L.* полученных из надземной части растения, селективное фракционирование было достигнуто в пределах молекулярных масс от M^+ 168 до M^+ 426 включительно. Во фракции минорных алкалоидов методами LC-MS/MS и GC/MS идентифицировали норгарман (M^+ 168), дигидроситсирикин (M^+ 356) и виндорозин (M^+ 426). Фракция минорных алкалоидов показала выраженную цитотоксическую активность против линии клеток DLD-1 и WS-1 (тест Resazurin), а по тесту Hoechst - к клеткам всех линий A-549, DLD-1 и WS-1.

Литература:

1. Коничев А.С., Баурин П.В. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья. Вестн., МГОУ, серия естественные науки, 2011, 3, 49-54
2. Кадыров Д.Б., Мукаррамов Н.И., Арипова С.Ф., Шахидояттов Х.М. Оптимизация метода выделения алкалоидов и других экстрактивных веществ из *Convolvulus Sumhirsutus (convalaria)*. Растительные ресурсы., 2016, 52(1), 166-174
3. Адеконов С.М. Экологически чистые технологии в производстве лекарственных препаратов. Вестн., КазНУ им. Аль-Фараби серия химическая, 2010, 4(60), 216-220

4. Калиев А.А., Бутобаева К.Ж., Турбумчаева А.А., Ескалиева Б.К., Бурашева Т.Ш., Хаджиаквер А., Сверхкритическая флюидная CO₂ экстракция растений рода климакоптера и петрасимония. *Вестн. КазНУ им. Аль-Фараби, серия химическая*, 2011, 1(61), 152-154
5. Elias R., Oliver E., Bagholikian B. Medicinal Plants: innovatine process of extraction. 3th International sciences, may 29-31, Tbilisi, Georgia, 2015, 10-11
6. Вачнадзе Н.С., Кинцурашвили Л.Г., Суладзе Т.Ш., Бакуридзе А.Дж., Вачнадзе В.Ю. Алкалоиды, интродуцированной в Западную Грузию *Vinca rosea L.* *Georgia Medical News*, 2013, 11(224), 85-87
7. Государственная фармакопея. М.: изд. Медицина, XI (2), 1990: 115, 116, 124, 125, 577, 579, 585
8. Manske R.H.F. The alkaloids, Chemistry and Physiology, New York. London. Academic Press, VIII, 1965, 861; XI, 1968, 549; XX, 1981, 341.

*ვალენტინა ვაჩნაძე¹, ნინა ვაჩნაძე¹, ალიოშა ბაკურიძე², რაულ გოცირიძე³, მალხაზ ჯოხაძე²,
ვახტანგ მშვილდაძე¹, ლამზირა ებრაღიძე², დალი ბერაშვილი²*

მემბრანული ტექნოლოგია ინდოლური ალკალოიდების ექსტრაქციაში

¹თსსუ, ი. ქუთათელაძის სახელობის ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტი, საქართველო;

²თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ³შოთა რუსთაველის სახელობის ბათუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რეზიუმე

განსაზღვრული ფორების მქონე ულტრაფილტრაციული მემბრანების გამოყენებით მიღწეულია სხვადასხვა მოლეკულური მასის დიმერული და მონომერული ალკალოიდების სელექციური ფრაქციონირება. 100-150A° ფორებიან მემბრანებში *Vinca rosea L.* მინისგედა ნაწილებიდან მიღებული სპირტიანი ექსტრაქტების ფილტრაციისას, სელექციური ფრაქციონირება მიიღწევა მოლეკულური მასის M⁺168-დან M⁺426 ჩათვლით, ფარგლებში. მინორული ალკალოიდების ფრაქციაში LC-MS/MS და GC/MS მეთოდებით აღმოჩენილია ნორგარმანი (M⁺168), დიჰიდროსიტსირიკინი (M⁺356) და ვინდოროზინი (M⁺ 426). მინორული ალკალოიდების ფრაქციას აღმოაჩნდა გამოხატული ციტოტოქსიკური აქტიურობა DLD-1 და WS-1 (Resazurin-ის ტესტი) Hoechst-ის ტესტით კი A-549, DLD-1 და WS-1, უჯრედული კულტურების მიმართ.

*ВАЛЕНТИНА ВАЧНАДЗЕ¹, НИНА ВАЧНАДЗЕ¹, АЛЕША БАКУРИДЗЕ²,
РАУЛЬ ГОЦИРИДЗЕ³, МАЛХАЗ ДЖОХАДЗЕ², ВАХТАНГ МШВИЛДАДЗЕ¹,
ЛАМЗИРА ЭБРАЛИДЗЕ², ДАЛИ БЕРАШВИЛИ²*

МЕМБРАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ В ЭКСТРАКЦИИ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ

¹ТГМУ, Институт Фармакохимии им. И. Кутателадзе, ²Тбилисский Государственный Медицинский Университет; ³БГУ им. Шота Руставели

РЕЗЮМЕ

Использованием ультрафильтрационных мембран с определенной пористостью возможно достичь селективное фракционирование димерных и мономерных алкалоидов на уровне молекулярных масс. При пористости мембраны 100-150A° и фильтрации спиртовых экстрактов *Vinca rosea L.* полученных из надземной части растения, селективное фракционирование было достигнуто в пределах молекулярных масс от M⁺168 до M⁺426 включительно. Во фракции минорных алкалоидов методами LC-MS/MS и GC/MS идентифицировали норгарман (M⁺168), дигидроситсирин (M⁺356) и виндорозин (M⁺426). Фракция минорных алкалоидов показала выраженную цитотоксическую активность против линии клеток DLD-1 и WS-1 (тест Resazurin), а по тесту Hoechst - к клеткам всех линий A-549, DLD-1 и WS-1.

