



## Особенности хроматографического поведения берберина в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ

Дейнека В.И., Хлебников В.А., Перистый В.А.,  
Гостищев И.А., Проворная Т.В.

*Белгородский государственный университет, г. Воронеж*

### Аннотация

В работе исследованы особенности хроматографического поведения берберина в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ. Показана возможность удерживания берберина по гидрофобному и ион-парному механизмам и предложен метод определения их вкладов. Особенности сорбции берберина исследовались с привлечением сравнительного анализа удерживания веществ на C18, C8 и C4 фазах, что позволило предложить механизмы, объясняющие полученные данные

### Введение

Интерес к берберину и его аналогам в последнее время определен обнаружением некоторых новых лечебных и профилактических свойств [1]. Поисковая система PubMed на слово «berberine» обнаруживает более полутора тысяч ссылок на статьи в научных журналах. Этот интерес привел, например, к возобновлению выпуска берберина (гидросульфата) в Российской Федерации (ЗАО ВИФИТЕХ, Москва).

Известно значительное количество работ по определению берберина и родственных алкалоидов методом ВЭЖХ. Однако в этих работах ставились, как правило, только задачи количественного определения алкалоидов и выбора удобных для этих целей элюентов. И, насколько нам известно, обычно внимание не акцентировали на некоторых особенностях хроматографического поведения алкалоидов изохинолинового ряда.

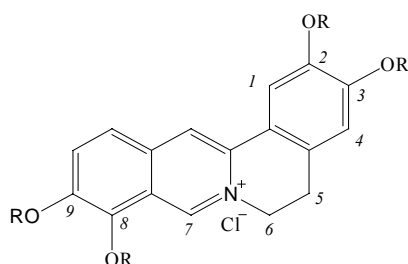
К числу таких особенностей можно отнести относительно большое удерживание берберина (органической частицы катионной формы) при отсутствии в элюенте типичных ион-парных добавок. Обращает на себя внимание и неожиданный порядок элюирования некоторых пар родственных берберину соединений.

В таблице кроме положения и типа заместителей указаны расчетные значения CLOGP (ChemDraw Ultra) - десятичных логарифмов распределения алкалоидов между октанолом-1 и водой. Строго говоря, различные программные пакеты для расчета CLOGP дают заметно не совпадающие значения этой характеристики, но порядок убывания (или возрастания) CLOGP в выбранном наборе сорбатов, как правило, мало изменяется. Это позволяет использовать CLOGP в обращено-фазовой ВЭЖХ как один из дескрипторов хроматографического удерживания, например, по простейшему подходу (обсуждение данной темы см. в работе [2]):

$$\lg k(i) = a + b \cdot CLOGP.$$

В таком случае «нормальным» должен быть порядок удерживания:

К ближайшим производным берберинового типа можно отнести такие, у которых остается неизменным остов, но изменяются заместители – их положение и вид:



Заместители R в положении:				Название	CLOGP
2	3	8	9		
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Пальматин	-1,223
CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Берберин	-1,316
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>		Эпиберберин	-1,316
CH <sub>2</sub>		CH <sub>2</sub>		Коптизин	-1,409
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Ятроризин	-1,695

$t_R(\text{ятроризин}) < t_R(\text{коптизин}) < t_R(\text{берберин, эпиберберин}) < t_R(\text{пальматин})$ .

В действительности, для пальматина, обычно получается инверсия времен удерживания относительно берберина [3-7]. Это удивительно, поскольку при добавлении вместо одной – CH<sub>2</sub>- группы двух конечных CH<sub>3</sub>-групп логично ожидать увеличения липофильности соединения. Но, например, в работе [3] в условиях обращено-фазовой хроматографии получен и подтвержден масс-спектрометрическим методом такой порядок:

$t_R(\text{ятроризин}) < t_R(\text{коптизин}) < t_R(\text{пальматин}) < t_R(\text{берберин})$ .

Можно усомниться в правомочности использования ряда значений CLOGP для сравнения с порядком элюирования рассматриваемых производных изохинолинового ряда в элюентах на основе ацетонитрила (см. [2]). Однако, порядок элюирования не совсем совпадает с указанным выше рядом даже при использовании в качестве органического модификатора метанола. Так в рекламном проспекте фирмы Shimadzu [8] при разделении алкалоидов корней коптиса в условиях ОФ ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием в градиентном режиме было найдено:

$t_R(\text{коптизин}) < t_R(\text{эпиберберин}) < t_R(\text{ятроризин}) < t_R(\text{берберин}) < t_R(\text{пальматин})$ .

Примечательно, что в этом ряду необычно положение и гидроксипроизводного (ятроризина) и эпиберберина, но, тем не менее, для пар веществ «коптизин + эпиберберин» и «берберин + пальматин» одинаковому изменению структуры соответствует одинаковый порядок изменения хроматографического удерживания.

В данной работе предполагалось исследовать закономерности удерживания алкалоидов изохинолинового ряда с акцентом на особенности их хроматографического поведения, знание которых необходимо для разработки методов определения алкалоидов в готовых формах и в сложных многокомпонентных биологических жидкостях.

## Эксперимент

В работе использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Altex 100A, УФ - детектора LDC (США) Spectromonitor D, крана-дозатора Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл. Для записи и обработки хроматограмм использовали ПС «Мультихром 1.5». Применяли хроматографические колонки размером 150×4 мм, заполненные сорбентами Диасфер-110-С18NT с величиной зерна 5 мкм («БиоХимМак», Москва), Диасорб-130-С8Т и Диасорб-130-С4Т с величиной зерна 5 мкм («Элсико», Москва).

Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил, ч.д.а. (ООО «ХромРесурс»), уксусная кислота, ч.д.а. (Химреактив), триэтиламин (Lancaster), алкансульфонаты были синтезированы по [9]. Берберин для исследований экстрагировали из таблеток «Берберина бисульфат», ЗАО ВИФИТЕХ, Москва. Комплексы алкалоидов получали экстракцией корней, плодов и листьев растений семейства *Berberidaceae*.

## Обсуждение результатов

В настоящей работе были исследованы различные составы подвижных фаз, содержащие и не содержащие ион-парные добавки. Из двух обычных регуляторов элюирующей силы элюента – метанола и ацетонитрила [10 - 12] в работе использовали ацетонитрил.

Склонность берберина к образованию ионных пар кажется очевидной и была изящно подтверждена в работе [13], в которой для количественного определения использована флуоресценция ионных ассоциатов берберина с додецилфенилсульфонатом натрия, концентрирующихся на границе раздела фаз системы вода – тетрачлоруглерод. Следовательно, существует возможность регулирования параметров удерживания берберина добавками ион-парных реагентов.

Существенное удерживание катионных органических веществ при отсутствии в составе подвижной фазы традиционных ион-парных добавок встречается не часто. Следует также обратить внимание на то, что во всех исследованных случаях пик берберина оказывается не таким симметричным, как пики веществ другой природы [3, 4], рис. 1.

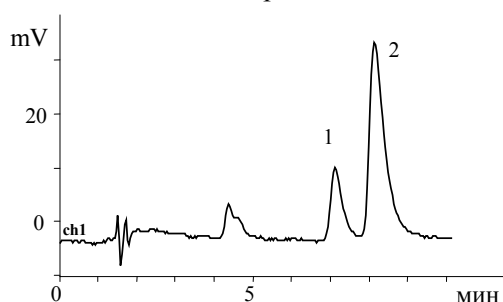
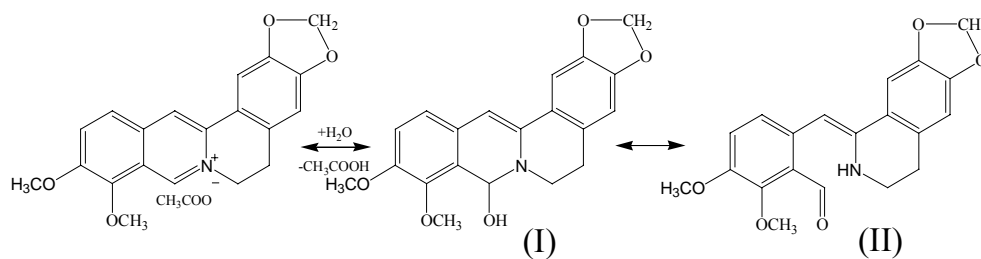


Рис.1. Разделение алкалоидов плодов барбариса корейского Элюент: 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 1.0 % уксусная кислота, 0.1 % триэтиламин, 1 мл/мин. Колонка: 150×4.0 мм, Диасорб-130-С4Т, 5 мкм; УФ-детектор: 420 нм. 1 – пальматин, 2 – берберин

Широкие и асимметричные пики при низких концентрациях сорбатов могут свидетельствовать о сложных и медленных равновесиях в системе. В принципе, некоторая асимметрия пиков характерна для ион-парного удерживания. В случае подвижных фаз системы «ацетонитрил - уксусная кислота – вода» в качестве противоиона может выступать ацетат-ион, но увеличение концентрации уксусной кислоты в 4 раза (от 0.5 до 2 об. %) при постоянном содержании ацетонитрила и триэтиламина (35 и 0.1 об. %, соответственно) привело не к увеличению, а к снижению времени удерживания берберина. Впрочем, однозначных выводов из найденной закономерности сделать нельзя, поскольку уксусная кислота может быть и источником противоионов, и органическим модификатором. Т.е. увеличение концентрации уксусной кислоты должно приводить в первом случае к росту, а во втором - к снижению удерживания.

Не исключено, что следует учесть возможность повышения липофильности за счет известных превращений берберина, наблюдаемых при обработке экстрактов раствором аммиака - это позволяет очищать алкалоиды через экстракцию хлороформом [14]. Тогда уширение пиков на хроматограммах может быть объяснено кинетическими эффектами структурных превращений по схеме 1, аналогичной известным [15] превращениям гидроксида берберина в карбинольную (I) и далее в альдегидную формы (II), но включающей ацетат берберина, поскольку вероятность таких превращений может повышаться в липофильном сорбционном слое (схема 1).

Но при всей привлекательности использования предлагаемой схемы для объяснения уширения необходимо отметить то, что по литературным данным [16] берберин растворяется в нормальных первичных спиртах. При этом его растворимость падает при замене этанола на бутанол-1 (более липофильный растворитель), но возрастает при последующем переходе к октанолу-1 (еще более липофильный растворитель), и ни о каких превращениях берберина в фазе раствора в цитируемой работе не сообщается.

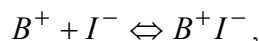


Вероятно, что механизм удерживания берберина может быть определен прямыми исследованиями состояния этого вещества в адсорбционном слое, но в данной работе далее будем условно считать его удерживание в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ без ведения классических ион-парных добавок как гидрофобное. Тогда для оценки удерживания катионных соединений используем модель, включающую образование ионных пар. В общем случае суммарное удерживание ионного вещества определяется гидрофобной ( $z\phi$ ) и ион-парной ( $un$ ) составляющими:

$$k(i) = k_{z\phi} \cdot \alpha_{z\phi} + k_{un} \cdot \alpha_{un},$$

где  $k$  и  $\alpha$  – факторы удерживания и степени нахождения вещества в соответствующих состояниях.

Для берберина образование ионных пар определяется равновесием:



и константой образования ионной пары:

$$K_{un} = \frac{[B^+ I^-]}{[B^+][I^-]}.$$

Для полной концентрации берберина в фазе раствора:

$$\{B\} = [B^+] + [B^+ I^-] = [B^+] + K_{un} \cdot [B^+][I^-]$$

при этом (с точностью до коэффициентов активности и мольных отношений) можно записать:

$$k(i) = \frac{[B, sp]}{[B, mp]} = \frac{k_{z\phi} \cdot [B^+] + k_{un} \cdot K_{un} \cdot [B^+][I^-]}{[B^+] + K_{un} \cdot [B^+][I^-]} = \frac{k_{z\phi} + k_{un} \cdot K_{un} \cdot [I^-]}{1 + K_{un} \cdot [I^-]}$$

Последнее уравнение обычно (при небольших коэффициентах  $K_{un}$ ) упрощается:

$$k(i) \cong k_{z\phi} + k_{un} \cdot K_{un} \cdot [I^-]. \quad (1)$$

Действительно, при использовании в качестве ион-парной добавки гексансульфоната натрия с различными концентрациями (0.0025, 0.0050 и 0.0075 М) и при постоянном содержании остальных компонентов (35 об. % ацетонитрила, 0.5 об. % уксусной кислоты и 0.1 об. % триэтиламина) была получена прямолинейная зависимость в соответствии с уравнением (1), рис.2.

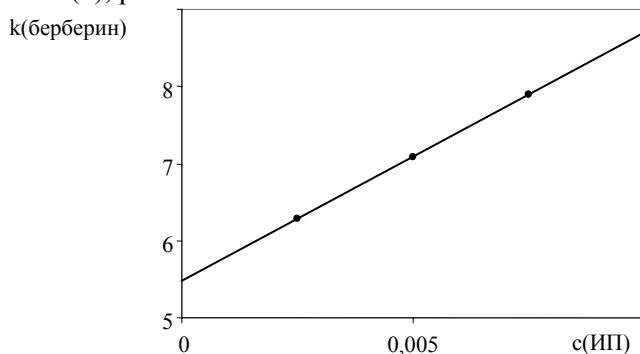


Рис.2. Зависимость удерживания берберина от концентрации гексансульфоната натрия

Судя по данным, приведенным на рис.2, удерживание берберина достаточно высоко и без использования ион-парной добавки. Фактор удерживания, аппроксимированный на нулевое содержание гексансульфоната, равен примерно 5.48, т.е. менее чем вдвое меньше чем при 0.01 М содержании этой добавки (обычное содержание ион-парников обычно несколько меньше 0.01 М). Следовательно, эффективность гексансульфоната натрия как ион-парной добавки в данном случае относительна.

Однако возможно изменение типа ион-парной добавки, т.е. выбор среди возможных алкансульфонатов наиболее удобных для конкретного анализа. Исследование поведения берберина в элюентах с одинаковой концентрацией всех компонентов, но при варьировании длины углеводородного радикала привело к получению непрямолинейной зависимости по уравнению (1), рис. 3.

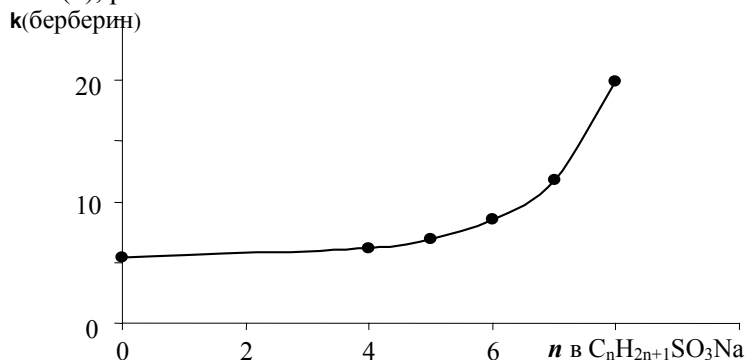


Рис.3. Влияние состава алкильного радикала ион-парного реагента на удерживание берберина

При постоянной концентрации ион-парного реагента можно сопоставить произведение констант образования ионной пары и ее константы удерживания:

$$k_{un} \cdot K_{un} \cdot [I^-] = k(i) - k_{z\phi} \quad [2]$$

после несложных преобразований:

$$RT \ln[k_{un}(i) \cdot K_{un}(i)] + \ln[I^-] = RT \ln[k(i) - k_{z\phi}],$$

$$RT \ln[k_{un}(i+1) \cdot K_{un}(i+1)] - RT \ln[k_{un}(i) \cdot K_{un}(i)] = RT \ln[k(i+1) - k_{z\phi}] - RT \ln[k(i) - k_{z\phi}],$$

$$\Delta\Delta G[(i+1) \leftarrow (i)] = RT \ln[k(i+1) - k_{z\phi}] - RT \ln[k(i) - k_{z\phi}]$$

получаем формулу для термодинамической оценки влияния длины радикала алкансульфоната на ион-парное удерживание. Очевидно, что при независимости вкладов метиленовых групп последовательные инкременты должны быть равными или в логарифмических единицах должна соблюдаться линейность:

$$\ln k_{un}(i) \cdot K_{un}(i) = \ln(k(i) - k_{z\phi}) = a + b \cdot n,$$

что прекрасно выполняется в настоящей работе, рис.4.

Таким образом, в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ для берберина и его аналогов весьма характерно гидрофобное удерживание, а для создания условий для преобладания ион-парного механизма удерживания можно использовать алкансульфонаты с относительно большой (т.е. начиная с гептансульфонатов) длиной алкильного радикала.

Возвращаясь к странности хроматографического поведения пары «пальматин – берберин» и используя литературные данные, можно предположить, что пик, предшествующий берберину (рис.1), соответствует пальматину. Это подтверждается и близостью электронных спектров выделенных в индивидуальном состоянии соответствующих фракций. Таким образом, во всех наших экспериментах порядок выхода был постоянным:

$$t_R(\text{пальматин}) < t_R(\text{берберин}).$$

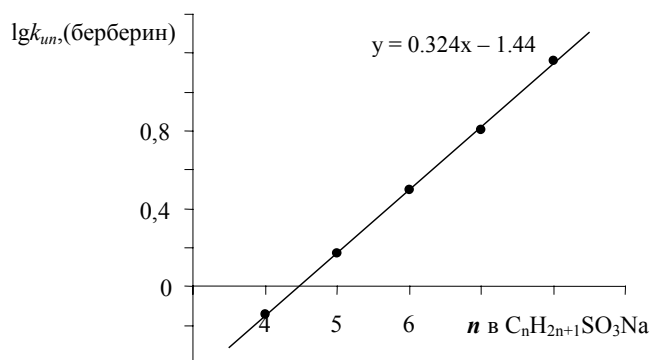


Рис.4. Влияние состава алкильного радикала алкансульфоната на удерживание берберина

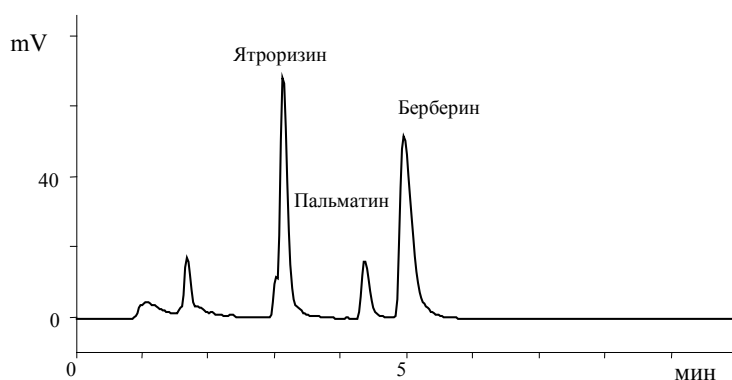
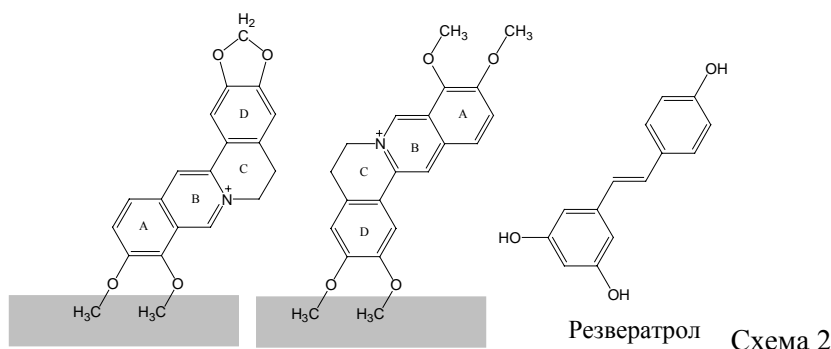


Рис.5. Хроматограмма экстракта корней магонии падуболистной. Колонка: 150×4 мм Диасфер-110-C18, 5 мкм, подвижная фаза: 40%  $CH_3CN$ ; 1%  $CH_3COOH$ , 0.005 М гексансульфонат натрия. Детектор: 420 нм

Берберин действительно, достаточно необычно ведет себя в условиях ОФ ВЭЖХ. Наши исследования хроматографического поведения резвератрола (*транс*-3,4',5-тригидроксистильбена, схема 2) показали, что замена стационарных фаз в ряду C18 → C8 → C4 при постоянной подвижной фазе мало сказывалась на абсолютном удерживании этого вещества. Такое положение возможно, если резвератрол удерживается за счет сорбции на поверхности обращено-фазового сорбента. Напротив, для триглицеридов масла семян мака проникновение молекул вглубь привитой фазы при сорбции немедленно сказалось в существенном уменьшении удерживания при смене типа обращенной фазы в том же ряду. Для берберина при замене C18 фазы на C8 фазу при постоянном составе элюента наблюдали даже некоторое увеличение удерживания, а при переходе к C4-фазе – существенное снижение времен удерживания.

Последние результаты могут свидетельствовать о том, что молекула берберина частично погружается в стационарную фазу (тогда не важна длина углеводородных радикалов стационарной фазы до некоторого критического предела). Молекулу берберина можно условно разделить на две неэквивалентные части (кольца А и В в одной части, а кольца С и D – в другой), которыми она может погружаться в стационарную фазу (схема 2). Присутствие двух *орто*-метоксигрупп у кольца А делает эту часть более гидрофобной по сравнению с кольцом D с  $-O-CH_2-O-$  группировкой в случае берберина. При переходе к пальмитину гидрофобности пар (метокси-) заместителей у колец А и D равны, но две метиленовые группы кольца С делают предпочтительнее ориентацию молекулы берберина к обращенной фазе кольцом D. В таком случае берберин и пальматин формально (по типу сорбции) не относятся к одному ряду гомологов и соотношение CLOGP непосредственно сравнивать с удерживанием этой пары веществ в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ некорректно [2].



Кстати, переориентация берберина (и пальматина), может быть тем процессом, из-за которого наблюдается асимметрия пиков, о которой шла речь выше.

По подходу Мураками [17] исследование удерживания как функции молярной концентрации органического модификатора водных подвижных фаз (в логарифмических координатах) позволяет определить число молекул ацетонитрила, высвобождающихся при сорбции вещества, – по абсолютному значению  $b$  в зависимости:

$$\lg k(X) = a - b \cdot \lg c(CH_3CN).$$

Для берберина в нашем случае получено уравнение:

$$\lg k(\text{берберин}) = 3.38 - 3.34 \cdot \lg c(CH_3CN),$$

а для резвератрола в элюентах того же диапазона концентраций ацетонитрила:

$$\lg k(\text{резвератрол}) = 3.04 - 3.51 \cdot \lg c(CH_3CN).$$

Хотя на самом деле параметр  $b$  зависит также и от изменения коэффициентов активности компонентов подвижных фаз, близкие значения  $b$ , полученные для обоих веществ в настоящей работе свидетельствуют о примерно одинаковом числе молекул ацетонитрила, высвобождаемых при сорбции и берберина и резвератрола. Поскольку для резвератрола плоская сорбция на поверхности сорбента кажется наиболее вероятной, а при плоской сорбции берберина, имеющего бóльшие размеры, следовало бы ожидать заметного увеличения  $b$ , то предположение о частичном погружении берберина в стационарную фазу не противоречит экспериментальным данным.

## Заключение

Таким образом, в работе исследованы особенности зависимости удерживания берберина от концентрации различных компонентов подвижной фазы в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ.

Полученные результаты позволили оценить гидрофобный и ион-парный вклады в суммарное удерживание берберина и определить пути изменения характера его удерживания. Высказан ряд предположений о причинах особенностей хроматографического поведения берберина.

Сопоставление удерживания берберина с резвератролом и триглицеридами позволило обнаружить еще одну особенность сорбции берберина, объясняющую несовпадение порядка элюирования некоторых алкалоидов изохинолинового ряда с рядом, определяемым по расчетным значениям логарифма распределения вещества между октанолом-1 и водой.

## Список литературы

1. Čerňáková M., Košťálová D., Kettmann V., Pldová M., Tóth J., Dřimal J. Potential antimutagenic activity of berberine, a constituent of Mahonia aquifolium. // BMC Complement. Altern. Med. 2002. v.2(2). P.2-8.
2. Дейнека В.И. Метод анализа относительного удерживания в ВЭЖХ. Определение, применения и роль параметра IgP системы н-октанол – вода. // Ж. физ. химии. 2006. т.80. №6. С.1083-1088
3. Weber H.A., Zart M.K., Hodges A.E., Molloy H.M., O'Brien B.M., Moody L.A., Clark A.P., Harris R.K., Overstreet J.D., Smith C.S. Chemical Comparison of Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) Root Powder from Three Commercial Suppliers // J. Agric. Food Chem. 2003. v.51. P. 7352-7358
4. Weber H.A., Zart M.K., Ferguson S.L., Greaves J.R., Clark A.P., Harris R.K., Overstreet J.D., Smith C.S. Separation and quantitation of isoquinoline alkaloids occurring in Goldenseal // J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 2001. v.24. P. 87-95
5. Villinski J.R., Dumas E.R., Chai H.-B., Pezzuto J.M., Angerhofer C.K., Gafner S. Antibacterial Activity and Alkaloid Content of *Berberis thunbergii*, *Berberis vulgaris* and *Hydrastis Canadensis* // Pharmaceut. Biol. 2003, v.41(8). P. 551–557
6. Lin S.-J., Tseng H.-H., Wen K.-C., Suen T.T. Determination of gentiopicoside, magniferine, palmatine, berberine, baicalin, wogonin and glycyrrhizin in the traditional Chinese medicinal preparation Sann-Joong-Kuey-Jian-tang by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1996. v.720. P.17-23.
7. Tsai P.-L., Tsai N.-H. HPLC Determination of berberine in medicinal herbs and a related traditional Chinese medicine // Anal. Lett. 2002. v.35(15). P. 2459–2470
8. Quantitative analysis of alkaloids in *Coptis Rhizome*. LS-MS Application Data Sheet No. 008. Shimadzu.
9. Перистый В.А. Разработка основ химической технологии получения высокочистых алкилсульфонатов – анионных ионпарных реагентов для сорбционной хроматографии. / Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием (г. Белгород, 11-14 октября 2004 г.). – г. Белгород. Изд-во БелГУ. 2004. С.140-145.
10. Okamura N, Miki H, Ishida S, Ono H, Yano A, Tanaka T, Ono Y, Yagi A. Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, berberine, coptisine, palmatine, jateorrhizine and glycyrrhizin in Kampo medicines by ion-pair high-performance liquid chromatography // Biol. Pharm. Bull. 1999. v.22(10). P.1015-21. PubMed.
11. Tsai P.-L., Tsai T.-H. Simultaneous determination of berberine in rat blood, liver and bile using microdialysis coupled to high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A 2002. V.961(1). P. 125-130
12. Anetai M. Chemical evaluation of *Coptis rhizome*. Determination of berberine alkaloids by HPLC and spectrophotometry // Hokkaidoritsu Eisei Kenkyushoho. 1994. v.44. P.1-6.
13. Feng P., Huang C.Z., Li Y.F. Determination of berberine by measuring the enhanced total internal reflected fluorescence at water/tetrachloromethane interface in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate // Anal. Bioanal. Chem. 2003. v.376. P.868-872
14. Hsieh T.-J., Chia Y.-C., Wu Y.-C., Chen C.-Y. Chemical Constituents from the Stems of *Mahonia japonica* // J. Chinese Chem. Soc. 2004. v.51. P. 443-446
15. Henry T.A. / The Plant Alkaloids. Fourth edition. The Blakiston Company. Philadelphia. Toronto. 1949. 804 p.
16. Lu Y.-C., Lin Q., Luo G.-S., Dai Y.-Y. Solubility of Berberine Chloride in Various Solvents // J. Chem. Eng. Data. 2006. v.51(2). P. 642-644
17. Murakami F. Retention behaviour of benzene derivatives in bond reversed-phase column // J. Chromatogr. 1979. v.178(2). P.393-399.