



УДК 615.322

Определение кумаринов и фурукумаринов в различных вегетативных органах *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.* методом газовой хромато-масс-спектрометрии

Щипицына О.С., Ефремов А.А., Нарчуганов А.Н.

Сибирский федеральный университет, Красноярск

Поступила в редакцию 21.05.2013 г.

Аннотация

Методом газовой хромато-масс-спектрометрии идентифицированы и количественно определены в хлороформных экстрактах корневищ, соцветий и семян *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.* кумарины: остол и лиметтин и ряд фурукумаринов: ангелицин, псорален, ксантотоксин, бергаптен, изопимпинеллин, императорин, оксипеucedанин, изоимператорин, бякангелицин, оксипеucedанин гидрат и феллоптерин. Выявлено, что в листьях данного вида кумарины и фурукумарины не накапливаются.

Ключевые слова: кумарины, фурукумарины, *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.*, метод газовой хромато-масс-спектрометрии.

By means of the method GC-MS was identified and quantified in chloroform extracts of the rhizomes, flowers and seeds of *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.* coumarins: osthol and limettin and some furocoumarins: angelicin, psoralen, xanthotoxin, bergapten, isopimpinellin, imperatorin, oxypeucedanin, isoimperatorin, byakangelicin, oxypeucedaninhydrate and phellopterin. It was found that the leaves of this type of coumarins and furocoumarins don't accumulate.

Keywords: coumarins, furocoumarins, *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.*, GC-MS-method

Введение

Растения рода *Angelica* с древних времен известны и широко используются в народной и официальной медицине различных стран благодаря широкому спектру воздействия на человеческий организм: противовоспалительному, спазмолитическому, антибактериальному, онкопротекторному. На сегодняшний день многочисленные исследования позволяют предполагать, что такие свойства могут быть обусловлены наличием в них уникального комплекса биологически активных веществ, наиболее ценными из которых являются кумарины и их производные [1,2].

В Сибирском регионе, являющимся одним из самых обширных регионов заготовки растительного сырья в РФ, наиболее известен и перспективен как лекарственное растительное сырье представитель рода *Angelica* - *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.* [3,4].

При заготовительных работах *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. часто принимают за европейский вид *Angelica archangelica* L, что обусловлено не только ботаническим сходством, но и ближайшим филогенетическим родством этих видов [5-7]. Но, в отличие от *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. о биологически активных веществах которого известно очень мало, вид *Angelica archangelica* L. достаточно хорошо изучен, в том числе и его кумарины. Таким образом, близость этих видов, а также практически единственные данные о том, что кумарины семян и корней *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. представлены бергаптенем, изоимператорином, императорином, оксипеucedанином, остроулом и умбеллипренином [8,9], позволяют предположить, что комплексы кумаринов и фурукумаринов различных вегетативных органов этих растений будут схожими.

О кумаринах *Angelica archangelica* L. известно, что они в основном представлены простыми кумаринами (рисунок 1), заместители которых указаны в таблице 1 [10]:

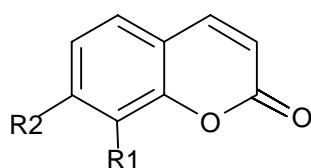


Рис. 1. Структура простых кумаринов *Angelica archangelica* L.

Таблица 1. Заместители простых кумаринов *Angelica archangelica* L.

Название	R ₁	R ₂
Умбеллиферон	H	-OH
Остенол	-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂	-OH
Остол	-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂	-OCH ₃
Умбеллипренин	H	

Фурукумарины *Angelica archangelica* L. чаще всего представлены соединениями с линейной структурой (рисунок 2), заместители которых представлены в таблице 2 [10].

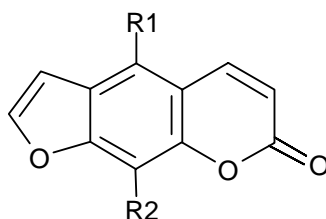
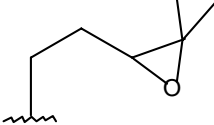
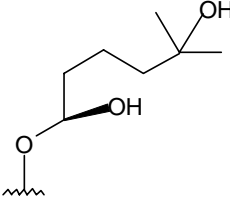
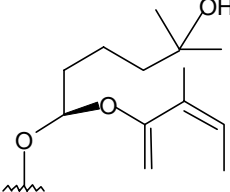
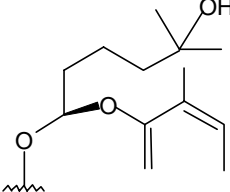


Рис. 2. Структура линейных фурукумаринов *Angelica archangelica* L.

Таблица 2. Заместители линейных фурукумаринов *Angelica archangelica* L.

Название	R ₁	R ₂
1	2	3
Псорален	H	H
Ксантотоксол	H	-OH
Ксантотоксин	H	-OCH ₃
Бергаптен	-OCH ₃	H
Изоимпинеллин	-OCH ₃	-OCH ₃

1	2	3
Императорин	H	-O-CH ₂ - CH=C(CH ₃) ₂
Изоимператорин	-O-CH ₂ - CH=C(CH ₃) ₂	H
Оксипеucedанин		H
Феллоптерин	-OCH ₃	-O-CH ₂ - CH=C(CH ₃) ₂
Оксипеucedанин гидрат		H
Острутол		H
Изобьякангелицин ангелат		-OCH ₃

Одним из фурукумаринов, который наиболее характерен для растений рода *Angelica*, является ангелицин, а также ряд других угловых фурукумаринов, встречающихся в *Angelica archangelica* L. из различных мест произрастания (рисунок 3) [10]:

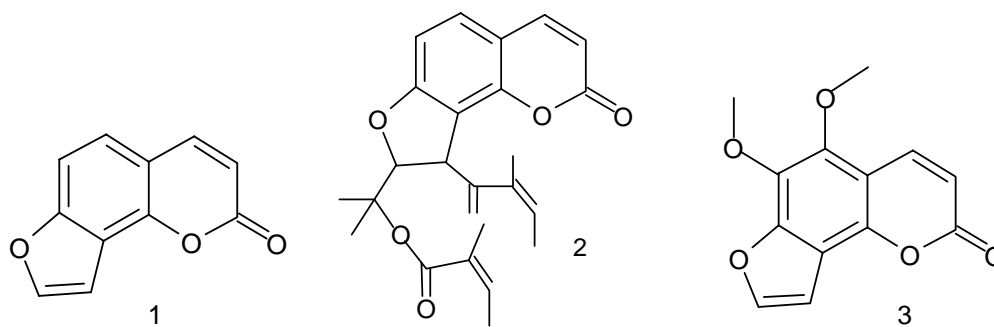


Рис. 3. Угловые фурукумарины *Angelica archangelica* L.:
1-ангелицин; 2- архангелицин; 3-пимпинеллин

Всего в различных органах *Angelica archangelica* L. найдено около 28 разновидностей кумаринов и фурукумаринов (таблица 3) [11]:

В связи с этим представляет интерес идентифицировать кумарины и фурукумарины *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch., определить их содержание в различных вегетативных органах и сравнить полученные данные с литературными данными по подобным соединениям в родственном виде *Angelica archangelica* L.

В нашей работе методом газовой хромато-масс-спектрометрии исследован компонентный состав исчерпывающих хлороформных экстрактов различных вегетативных органов *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. и определено содержание кумаринов и фурукумаринов в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Таблица 3. Кумарины и фурукумарины различных вегетативных органов *Angelica archangelica* L.

Вегетативный орган	Компонент
Корневища и корни	Аптерин, архангелицин, архангелин, архангин, бергаптен, бякангелицин ангелат, бякангелицин изовалериат, изобергаптен, изоимператорин, изопимпинеллин, императорин, ксантотоксин, ксантотоксол, 5-метокси-геракленол изовалериат, ороселон, остенол, остол, острутол, оксипеucedанин, оксипеucedанин гидрат, оксипеucedанин метанолат, псорален, феллоптерин, умбеллиферон, умбеллипренин
Листья	Ангелицин, бергаптен, изоимператорин, изопимпинеллин, императорин, ксантотоксин, оксипеucedанин, оксипеucedанин гидрат
Семена	Ангелицин, бергаптен, 8-гидроксибергаптен изоимператорин, изопимпинеллин, императорин, ксантотоксин, ксантотоксол, ороселон, остенол, остол, острутол, оксипеucedанин, оксипеucedанин гидрат, феллоптерин, умбеллиферон, умбеллипренин

Эксперимент

Исследуемые в данной работе корневища и корни *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. были собраны в мае 2012 г. в Сибирском регионе (Кемеровской области), высушены и подготовлены к исследованиям согласно ГОСТ 21569-76Е. Соцветия, листья и семена заготовлены в июле и начале сентября 2012 г. по правилам Государственной фармакопеи для отбора проб цветков, стеблей и плодов (семян) [12-14].

Все операции по сушке и отбору проб для анализа, а также определению влажности растительного сырья проводили в соответствии с фармакопейными и фармакогнозийными статьями и рядом нормативно-технической документации [15,16].

Для извлечения кумариновых соединений из различных вегетативных органов: корней, соцветий, листьев и семян *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. проводили исчерпывающую экстракцию исходной навески воздушно-сухого сырья в количестве 10-20 г хлороформом в течение 8 часов в аппарате Сокслета [17]. Полученные хлороформные экстракты подвергали хромато-масс-спектрометрическому исследованию для качественного и количественного определения кумаринов и фурукумаринов.

Идентификацию компонентов проводили с использованием газового хромато-масс-спектрометра «Agilent Technologies 7890А» с селективным масс-спектрометром (5975 inert MSD/DS Std Turbo EJ) в качестве детектора. Применяли 30 м кварцевую колонку HP-5MS (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана) с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1,0 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл полученного экстракта. Условия хроматографирования: изотермический режим при 50°C в течение трех минут, затем программированный подъем температуры со скоростью 4°C/мин до 270 °C с выдержкой при конечной температуре 30 мин.

Температура испарителя 280°C, температура ионизационной камеры – 170°C, энергия ионизации – 70 эВ. Идентификацию индивидуальных кумаринов и фурукумаринов производили на основании сравнения полученных масс-спектров с масс-спектрами библиотеки данных Willey.7n, содержание компонентов вычисляли по площадям пиков без применения корректирующих коэффициентов в пересчете на остол. Содержание компонентов вычисляли по площадям пиков без применения корректирующих коэффициентов.

Для приготовления стандартных образцов применяли образец остола производства фирмы «Sigma-Aldrich» чистотой 99,8%. Стандартные растворы готовили в концентрациях 5;1;0,1 и 0,01 мг/мл в метиловом спирте.

Обсуждение результатов

В ходе сравнительного анализа полученных нами масс-спектров соединений с масс-спектрами банка данных Willey.7n в различных органах *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. был идентифицирован с определением времен удерживания и расчетом индексов удерживания ряд соединений: лиметтин, остол, ангелицин, бергаптен, бякангелицин, изоимператорин, изопимпинеллин, императорин, ксантотоксин, оксипеucedанин, оксипеucedанин гидрат, псорален и феллоптерин. Необходимо отметить, что совпадение масс-спектров полученных нами соединений и из банка данных Willey.7n достигает 98%, что наглядно видно на примере масс-спектров лиметтина и ангелицина, представленных на рис. 4 и 5.

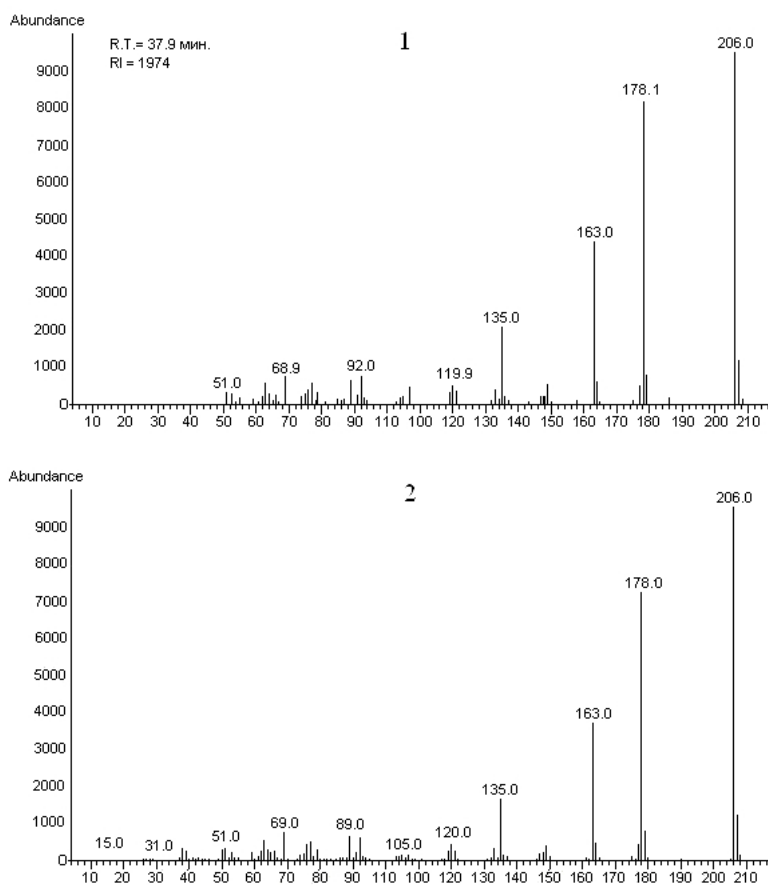


Рис. 4. Масс-спектры соединений:
1- *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. с R.T.=37,9 мин., RI= 1974
2- лиметтина из банка данных Willey.7n

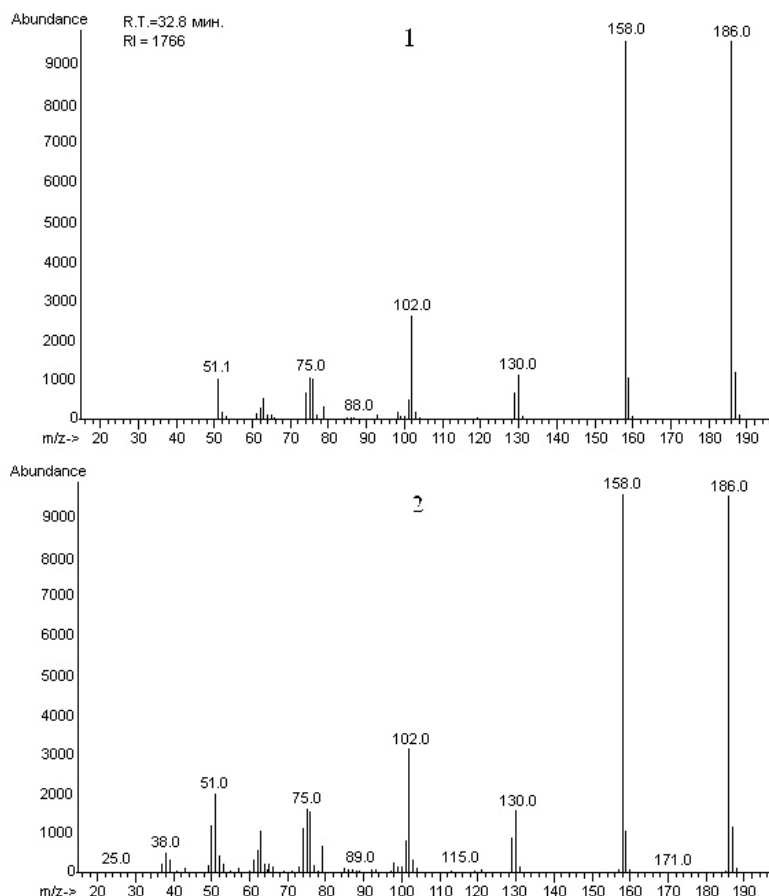


Рис. 5. Масс-спектры соединений:

- 1- *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. с R.T.=32,8 мин., RI= 1766
 2- ангелицина из банка данных Willey.7n

На полученных нами хроматограммах (рис.6) видно, что в различных вегетативных органах накапливается разный комплекс кумариновых соединений. В корневищах и корнях сибирского вида *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. определили максимальный набор компонентов: кумарины лиметтин, остол и фурукумарины: ангелицин, бергаптен, бякангелицин, изоимператорин, изопимпинеллин, императорин, ксантотоксин, оксипеucedанин, оксипеucedанин гидрат и псорален. В соцветиях же были обнаружены только фурукумарины: бергаптен, изопимпинеллин, императорин и феллоптерин, а в семенах все те же соединения, кроме бергаптена. В листьях же не было обнаружено кумаринов и их производных.

Таким образом, в вегетативных органах *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. нами был выявлен более богатый, чем указанный в более ранних исследованиях [8,9], набор кумаринов и фурукумаринов, но при этом были идентифицированы и аналогичные соединения: бергаптен, изоимператорин, императорин и оксипеucedанин. Кроме того, весь набор идентифицированных соединений *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. соответствует кумаринам и фурукумаринам, характерным для вида *Angelica archangelica* L.

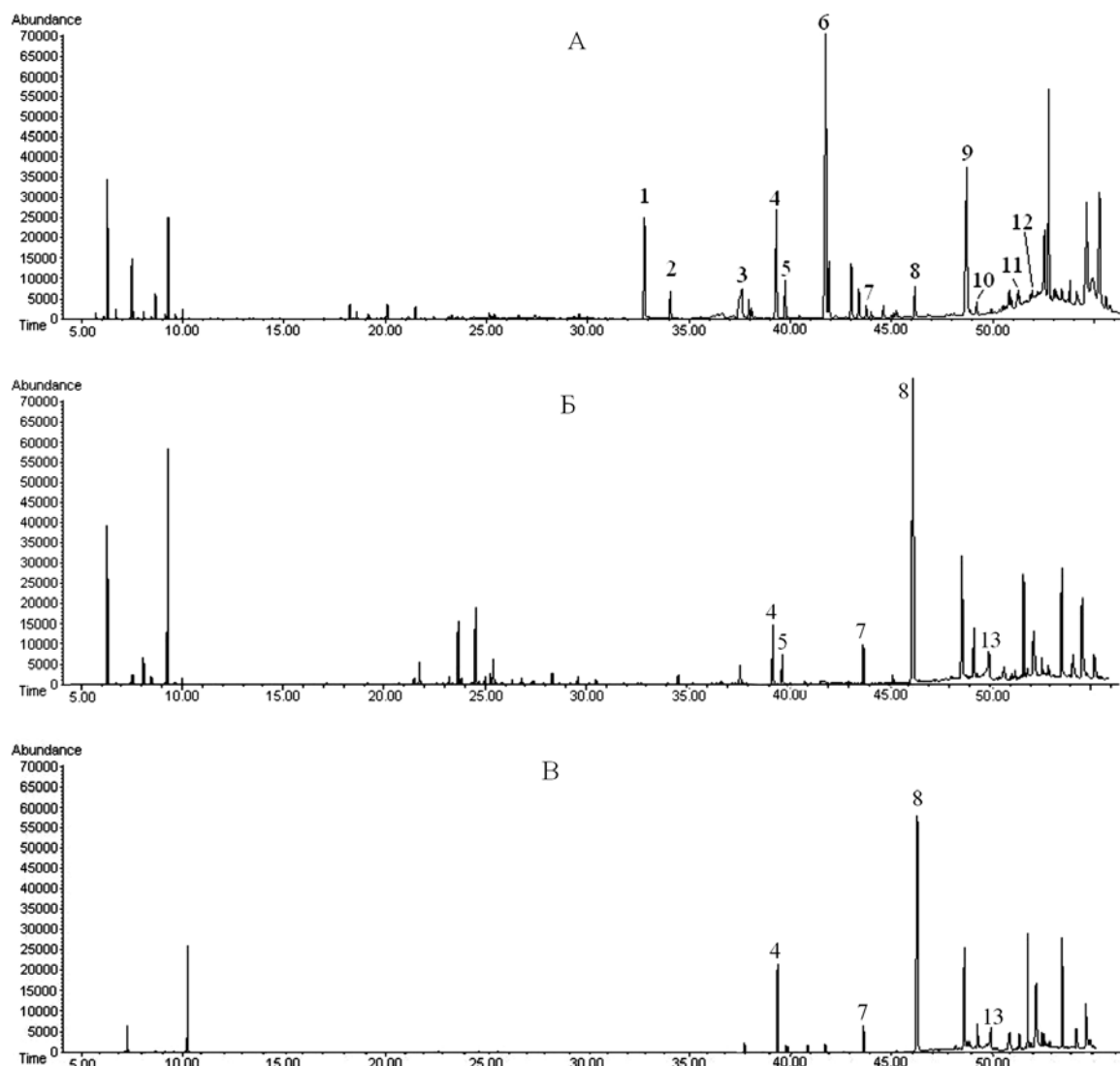


Рис. 6. Хроматограммы хлороформных экстрактов различных вегетативных органов *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch.: А- корневищ; Б – соцветий; В – семян с обозначенными пиками идентифицированных соединений: 1- ангелицин; 2- псорален; 3-лиметтин; 4-ксантотоксин; 5-бергаптен; 6-остол; 7-изоимпинеллин; 8-императорин; 9-оксипеucedанин; 10-изоимператорин; 11-бьякангелицин; 12-оксипеucedанин гидрат; 13-феллоптерин

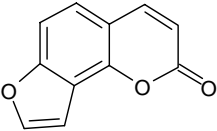
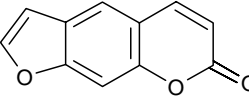
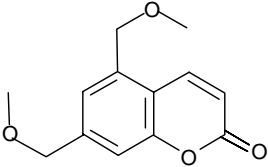
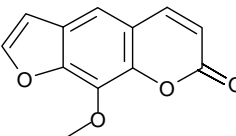
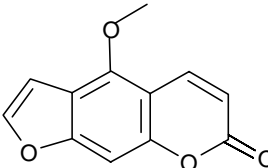
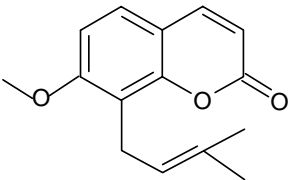
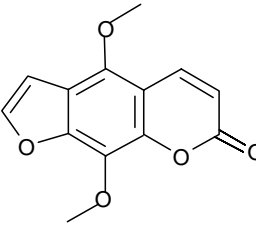
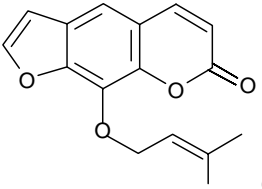
Основные характеристики идентифицированных кумариновых соединений различных вегетативных органов *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch.: времена удерживания - в интервале 32-52 минуты и индексы удерживание также были определены по полученным хроматограммам (рис.6, табл.4). Кроме того, для кумаринов и фурукумаринов *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. были рассчитаны значения индексов удерживания (табл.4).

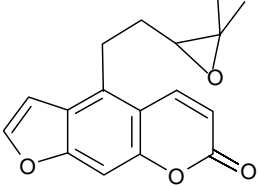
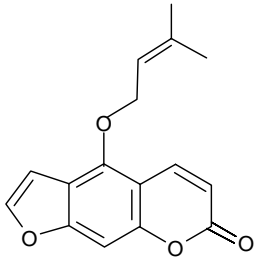
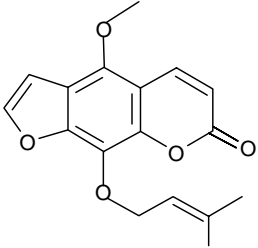
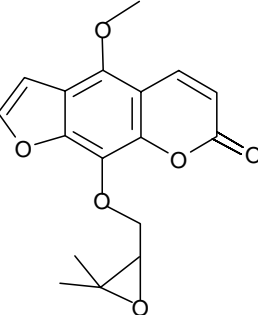
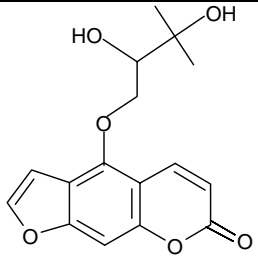
Количественное содержание кумаринов и фурукумаринов в различных вегетативных органах *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. (табл.4) определяли по внутреннему стандарту, в качестве которого использовали химически чистый остол.

По результатам таблицы 4 видно, что в корневищах *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. максимально содержание кумарина остола, а также фурукумаринов ангелицина, оксипеucedанина и оксипеucedанин гидрата; в соцветиях и семенах –

фурокумарина императорина, причем его содержание максимально по величине для всех органов.

Таблица 4. Содержание идентифицированных кумариновых соединений в различных вегетативных органах *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. с определенными временами и индексами удерживания

Компонент	R.T., мин.	RI	Структура	Содержание*, мг/100 г абс. сухого сырья		
				Вегетативный орган		
				Корневища	Соцветия	Семена
1	2	3	4	5	6	7
Ангелицин	32.8	1766		22.70	-	-
Псорален	34.1	1822		3.94	-	-
Лиметтин	37.9	1974		3.99	-	-
Ксантотоксин	39.3	2029		9.02	14.25	52.29
Бергаптен	39.7	2048		5.33	12.01	-
Остол	41.7	2131		98.14	-	-
Изоимпинеллин	43.7	2210		1.43	15.76	12.92
Императорин	46.2	2312		8.90	231.74	191.40

1	2	3	4	5	6	7
Оксипеucedанин	48.7	2416		31.89	-	-
Изоимператорин	49.3	2450		2.73	-	-
Феллоптерин	50.0	2470		-	2.53	25.17
Бьякангелицин	51.2	2524		6.63	-	-
Оксипеucedанин гидрат	51.9	2551		29.62	-	-

* - погрешность измерения не более 3%

Заключение

Таким образом, экспериментально в корневищах, соцветиях и семенах сибирского вида *Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch.* идентифицированы 2 кумарина и 11 фурукумаринов. Выявлено, что в листьях данного вида кумарины и фурукумарины не накапливаются, а также то, что вегетативные органы накапливают разных комплекс кумариновых соединений, причем наиболее богаты ими корневища.

В ходе работы определены времена и индексы удерживания кумаринов и фурукумаринов *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch., а также их количественное содержание в каждом вегетативном органе в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Кроме того, мы подтвердили высказанное нами предположение о сходстве комплексов кумариновых соединений сибирского вида - *Angelica decurrens* (Ledeb.) Fedtsch. и ближайшего ему родственного лекарственного вида *Angelica archangelica* L.

Список литературы

1. Chevalier A. The Encyclopedia of Medicinal Plants. London: Reader's Digest, 1996. - 336 p.
2. Башкирова Р.М., Касьянова А.Ю., Галяутдинов И.В. Растения рода дягиль: химический состав и фармакологические свойства // Фармация. 2004. №4. С.46-48.
3. Пленник Р.Я., Гонтарь Э.М., Тюрина Э.М. Полезные растения Хакасии. Ресурсы и интродукция. Новосибирск: Наука. сиб. отд., 1989.- 271 с.
4. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1991.- 431 с.
5. Stephen T.F., Downie R., Yu Y. Molecular systematics of *Angelica* and allied genera (Apiaceae) from the Hengduan Mountains of China based on nrDNA ITS sequences: phylogenetic affinities and biogeographic implications // J. of Plant Research. 2009. V.122. P. 403–414.
6. Lee S.-B., Rasmussen S.K. Molecular markers in some medicinal plants of the Apiaceae family // Euphytica. 2000. V.114. P. 87–91.
7. Weinert E. Die Taxonomische Stellung und das Areal von *Angelica archangelica* L. und *A. lucida* L. // Feddes Repert. 1973. Heft 84. S. 303-314.
8. Денисова Г.А., Драницына Ю.А. Локализация соединений кумаринового ряда в тканях плода и корня *Archangelica decurrens* Ledeb. // Ботан. журн. 1963. Т.48. № 12. С. 1830-1834.
9. Драницына Ю.А., Денисова Г.А. Динамика накопления кумариновых соединений и эфирных масел в плодах *Archangelica decurrens* Ledeb. на разных фазах их развития // Труды БИН АН СССР. 1965. Сер. 5. Вып. 12. С. 44.
10. Murray R.D.H., Mendes J., Brown S.A. The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry. New York: John Wiley et Sons Ltd., 1982. – 714 p.
11. Manu J. M. E. Plant secondary metabolites in *Peucedanum palustre* and *Angelica archangelica* and their plant cell cultures. Ac.dissert. // Helsinki: University of Helsinki, 2010. - 77 p.
12. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11-е издание. Том 1. М.: Медицина, 1989. - 400 с.
13. ГОСТ 21569-76Е. Корневища и корни дягиля лекарственного. М.: Изд-во стандартов, 1976.- 3 с.
14. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия / Под ред. Г.П.Яковлева, К.Ф.Блиновой. СПб.: СпецЛит, 2004. -765 с.
15. ГОСТ 24027.0- 80. Сырье лекарственное растительное. Правила приема и отбора проб М.: Изд-во стандартов, 1999. - 5 с.
16. ГОСТ 24027.2-80. Сырьё лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла. М.: Изд-во стандартов, 1980. - 12 с.

17. Руководство 4.1.1672-03 «Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище». М.: Изд-во стандартов, 2003.- 183 с.

Щипицына Ольга Сергеевна - аспирантка кафедры «Аналитическая химия» ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

Ефремов Александр Алексеевич - д.х.н., профессор, зав. лаборатории хроматографических методов ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

Нарчуганов Антон Николаевич - аспирант кафедры «Аналитическая химия» ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

Shchipitsyna Olga Sergeevna - aspirant «Analytical chemistry» faculty of SibFU

Efremov Aleksandr A. - Prof., Doctor of Chemistry, Head of the Laboratory of Chromatographic methods of analysis of SibFU CEJU

Narchuganov Anton N. - aspirant «Analytical chemistry» faculty of SibFU