

УДК 543.429.23:582.682.4:547.94

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ ЧИСТОТЕЛА (*CHELIDONIUM MAJUS* L.) МЕТОДОМ ЯМР $^1\text{H}$ \*

© **М.О. Коротких**, Е.П. Романенко, В.Д. Тихова, А.В. Ткачев\*\*

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,  
пр. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090 (Россия),  
e-mail: atkachev@nioch.nsc.ru

Анализ экстрактов чистотела (*Chelidonium majus* L.) методом ЯМР  $^1\text{H}$  позволяет идентифицировать основные алкалоиды – производные фенантридина, протоберберина и протопина, а использование метода количественного ЯМР (qNMR) дает с удовлетворительной точностью информацию о содержании этих алкалоидов. Содержание алкалоидов, определяемое в составе экстрактов чистотела методом qNMR (0.35%), в 2 раза ниже, чем при использовании процедуры спектрофотометрического определения, описанной в ГФ РФ XIV (0.72%). Результаты экстракции по методикам, приведенным в Государственной фармакопее РФ XIV издания и в Государственной фармакопее СССР XI издания, дают сходные результаты: в составе экстрактов обнаруживаются одни и те же алкалоиды – хелидонин, стилопин и протопин, а суммарное содержание алкалоидов в 1.6–1.8 раз меньше, чем при экстракции тех же самых образцов сырья методом настаивания. При экстракции методом настаивания основными алкалоидами в экстрактах являются дигидросангвинарин, хелидонин, стилопин, берберин и коптизин.

*Ключевые слова:* чистотел, *Chelidonium majus* алкалоиды, Государственная фармакопея РФ, ЯМР-профилирование.

*Работа выполнена в рамках проекта № 1021051503141-0-1.4.1 «Высокотехнологическая аналитическая платформа для исследований в области фармакогнозии, фитохимии, клинической и экспериментальной медицины, химической экологии и для обеспечения экологической, фармацевтической и продовольственной безопасности».*

### Введение

Чистотел большой (бородавник, желтомолочник) – многолетнее травянистое растение семейства Маковых (*Papaveraceae* Juss. 1789). Естественный ареал чистотела охватывает Европу (до северных берегов Средиземного моря), азиатскую часть России, Восточную Монголию, Китай (кроме Тибета) [1]. Чистотел, первоначально описанный еще Карлом Линнеем (*Chelidonium majus* L., 1753), имея обширный ареал, характеризуется достаточно высокой морфологической изменчивостью, проявляющейся в степени надрезанности листовых сегментов и лепестков, опушенностью листьев и размерами цветков. Как результат – появление в мировой литературе публикаций с описаниями таких видов, как *Chelidonium haematodes* Moench, *Chelidonium laciniatum* Mill., *Chelidonium luteum* Gilib. nom. inval., *Chelidonium murale* P.Renault, *Chelidonium olidum* Tarscher. ex Ott, *Chelidonium quercifolium* Willemet, *Chelidonium ruderales* Salisb., *Chelidonium umbelliferum* Stokes. Однако в настоящее время они считаются синонимами, а признанными являются 2 подвида: *Chelidonium majus* subsp. *majus* и *Chelidonium majus* subsp. *grandiflorum* (DC.) Printz (Синонимы: *Chelidonium cavaleriei* H. Lév., *Chelidonium dahuricum* DC., *Chelidonium grandiflorum* (DC.) DC.) [2].

**Коротких Михаил Олегович** – аспирант,  
e-mail: atkachev@nioch.nsc.ru

**Романенко Елена Петровна** – ведущий инженер,  
e-mail: roman@nioch.nsc.ru

**Тихова Вера Дмитриевна** – кандидат химических наук,  
заведующая лабораторией, e-mail: tikhova@nioch.nsc.ru

**Ткачев Алексей Васильевич** – доктор химических наук,  
заведующий лабораторией, e-mail: atkachev@nioch.nsc.ru

\* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20230111663s

\*\* Автор, с которым следует вести переписку.

Чистотел издавна используется в народной и традиционной медицине и включен в фармакопеи многих стран, и в Фармакопею РФ в том числе [3]. Чистотел характеризуется широким спектром биологической активности, которую связывают, прежде всего, с содержащимися в растении алкалоидами. Именно поэтому качество растительного сырья чистотела определяется на основании содержания в нем алкалоидов.

На сегодняшний день известны около 50 алкалоидов, обнаруженных в чистотеле, перечень которых дан в электронном приложении к статье (раздел 2.1), а структуры показаны на рисунке 1 электронного приложения. Основными алкалоидами чистотела, по данным разных работ [4–9], являются хелеритрин, сангвинарин, хелидонин, берберин, коптизин, стилопин, аллокриптопин, протопин.

Подходы к стандартизации и определению качества сырья различны в фармакопеях разных стран. Так, если в Европейской фармакопее нормируется общее содержание алкалоидов, определяемое спектрофотометрически ( $\geq 0.6\%$  в пересчете на хелидонин), то в фармакопее Китайской Народной Республики контролируется содержание хелеретрина ( $\geq 0.020\%$ ) методом ВЭЖХ [10]. В фармакопее РФ прописана процедура, повторяющая норматив Европейской фармакопеи: сумма алкалоидов в пересчете на хелидонин должна составлять не менее 0.6%, а содержание алкалоидов определяют спектрофотометрически по интенсивности поглощения комплексов с хромотроповой кислотой при  $\lambda$  570 нм [3]. При этом описанная в фармакопее РФ методика обработки сырья для определения алкалоидов (нагревание 30 мин на кипящей водяной бане в водном растворе уксусной кислоты) не является щадящей в отношении нативных компонентов и может вызвать различные нежелательные процессы (изомеризацию, дегидратацию, гидролиз, окисление) и изменить структуру и содержание алкалоидов.

Поскольку разные алкалоиды чистотела обладают разной активностью, суммарное содержание алкалоидов не отражает биологическую активность экстрактов, так как не позволяет судить о соотношении входящих в их состав индивидуальных алкалоидов.

Качественный и полуколичественный анализ алкалоидов можно выполнять с использованием различных вариантов тонкослойной хроматографии [11, 12], в том числе в обращенно-фазовом [13] и двумерном вариантах [14]. Разработаны методы количественного анализа алкалоидов чистотела методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4, 15], однако такие методы требуют изощренной и трудоемкой пробоподготовки. Некоторые преимущества дает метод ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (ultra-performance liquid chromatography – UPLC) [6], который, однако, также требует утомительной подготовки образца. Определенные преимущества в скорости и относительной простоте экстракции дает капиллярный электрофорез в сочетании с микроволновой экстракцией растительного сырья [5]. Алкалоиды чистотела для выполнения анализов обычно экстрагируют из воздушно-сухого сырья либо простым настаиванием (мацерацией), либо в аппарате Сокслета, применяя различные растворители – хлороформ, этилацетат, ацетон, метанол [7], а также водные растворы уксусной кислоты [16]. Увеличение выхода экстракции некоторых алкалоидов происходит при использовании терпеновых экстрагентов в виде двухкомпонентных эвтектических смесей ментол-тимол, ментол-камфора, и тимол-камфора [17]. Определенные преимущества в плане селективности извлечения определенных алкалоидов дает двухэтапная процедура, включающая использования сначала только сверхкритической  $\text{CO}_2$ , а затем – сверхкритической  $\text{CO}_2$  с добавками спиртов и аминов [18]. Содержание алкалоидов в сырье чистотела невелико (до 4%), а их физико-химические свойства таковы, что любой способ экстракции приводит к образованию сложных смесей растительных метаболитов, содержащих, помимо целевых алкалоидов, также большое количество других веществ. Этим и обусловлена необходимость изощренной пробоподготовки перед выполнением хроматографического анализа.

Общим недостатком всех перечисленных хроматографических методов количественного определения алкалоидов является необходимость использования чистых аутентичных образцов всех анализируемых соединений, которые требуются для калибровки детекторов. Такого недостатка лишена количественная спектроскопия ЯМР (qNMR), которая позволяет выполнять измерения без использования стандарта анализируемого вещества [19].

Среди двух ведущих аналитических подходов к метаболомике (масс-спектрометрия и спектроскопия ядерного магнитного резонанса – ЯМР) ЯМР-спектроскопия имеет преимущества из-за высокой воспроизводимости полученных данных и превосходных количественных характеристик в широком динамическом диапазоне [20]. Таким образом, ЯМР-спектроскопия имеет большое значение в метаболомике [21] для получения информации о метаболических профилях лекарственных растений и фитопрепаратов [22], а также в пищевой науке [23]. Количественный ЯМР (qNMR) используется для процессов обнаружения и разработки

лекарств, поскольку это неразрушающий, универсальный и надежный метод. Несмотря на ряд ограничений, таких как низкий предел количественного определения и массивное перекрытие пиков в сложных биологических образцах [24], методы qNMR были успешно использованы для анализа различных классов низкомолекулярных метаболитов растений, включая алкалоиды [25–27].

Здесь мы сообщаем о результатах ЯМР-профилирования нативных алкалоидов *Chelidonium majus* L. и количественной оценке нативных алкалоидов с помощью qNMR.

### **Экспериментальная часть**

*Растворители.* Для экстракции растительного сырья использовали свежеперегранные органические растворители. Спектры ЯМР записаны для растворов в дейтерохлороформе ( $\text{CDCl}_3$ , 99.8 атом.% D, вода < 0.01%) и дейтеродиметилсульфоксиде ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 99.8 атом.% D, вода < 0.05%).

*Внутренние стандарты для количественного ЯМР.* 1,3,5-Тринитробензол перекристаллизовывали из бензола (СОВ по данным ГЖХ – 99.89%); берберин хлорид дигидрат (Sigma-Aldrich B3251); реактив Бертрана (1%-ный водный раствор кремневольфрамовой кислоты); уксусная кислота, хч, ГОСТ 61-75 (12% водный раствор); аммиак 25%, осч, ГОСТ 24147-80; серная кислота, хч, ГОСТ 4204-77 (9.8% водный раствор); хлористый метилен, ГОСТ 9968-86; спирт этиловый 96%, ГОСТ 18300-87; хромотроповой кислоты натриевая соль, чда, ТУ 6-09-05-1371-88, (10 г/л, раствор в конц. серной кислоте).

*Растительное сырье.* Все манипуляции с растительным сырьем проводили в нитриловых перчатках.

*Сбор и подготовка дикорастущих растений.* Траву Чистотела большого (*Chelidonium majus* L., 1753) собирали в местах естественного произрастания в период цветения–начала плодоношения (июль) в Новосибирской области: (1) 2016–2018 гг. в пойме реки Ноздриха (54.953167 N, 83.244139 E) и (2) в 2018 г. на территории Центрального сибирского ботанического сада РАН – ЦСБС (54.818667 N, 83.104923 E).

Растения извлекали из земли с корнем, чтобы избежать выделения млечного сока и снизить образование артефактов в процессе сушки. Сырье сушили в темном, хорошо проветриваемом помещении в течение трех недель при температуре +15+28 °С, упаковывали в бумажные мешки для транспортировки. Высушенную надземную часть измельчали с помощью бытовой мясорубки с диаметром выходных отверстий 4 мм, измельченное сырье ссыпали в стеклянные банки, закрывали крышкой и помещали в темный шкаф на хранение до момента проведения анализов.

#### *Исследованные образцы*

Трава собственного сбора:

Образец 1: р. Ноздриха, дата сбора – 19.06.2016.

Образец 2: р. Ноздриха, дата сбора – 23.07.2017.

Образец 3: ЦСБС, дата сбора – 11.07.2018.

Образец 4: р. Ноздриха, дата сбора – 25.07.2018.

Аптечное сырье:

Образец 5: «Чистотела трава *Cheledonii Herba*» производства ФармаЦвет® (EAN Code 4601498007128) P N001015/01 от 23.05.2008, партия 151217 12/2017 годен до 01/2021.

Образец 6: «Чистотела трава *Cheledonii Herba*» производства ФармаЦвет® (EAN Code 4601498007128) P N001015/01 от 23.05.2008, партия 10118 01/2018 годен до 02/2021.

Перед выполнением анализов сырье измельчали и просеивали сквозь сито с размером ячеек 0.5 мм.

*Определение оптимального времени экстракции.* Навеску сырья (3.00 г), помещали в колбу Эрленмейера объемом 100 мл, добавляли растворитель, закрывали пробкой и оставляли при комнатной температуре (+22...+23 °С) на 3, 6, 8 или 18 ч. По истечении указанного периода времени экстракт фильтровали через бумажный фильтр, сырье на фильтре промывали тем же растворителем, что использовался для экстракции (20 мл), объединенный фильтрат упаривали в вакууме водоструйного насоса и выдерживали в вакууме масляного насоса (2–3 мм рт. ст.) до постоянного веса. Экстракцию выполняли этилацетатом, 95% водным этанолом и 95% водным этанолом с предварительным смачиванием сырья 1% водным раствором аммиака (7 мл). Для каждого растворителя экстракцию выполняли в трех повторностях. Результаты экстракции показаны на рисунке 1.

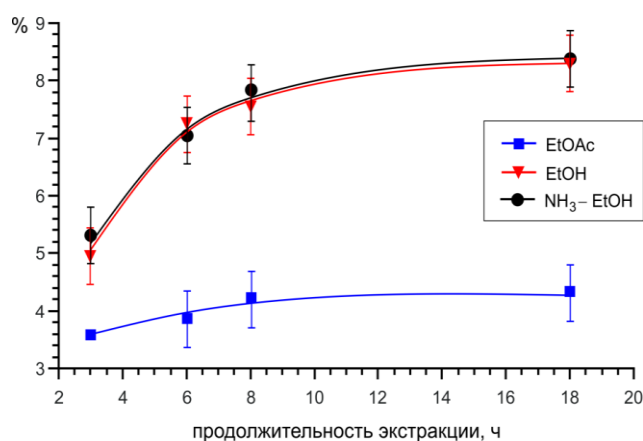


Рис. 1. Зависимость выхода экстрактивных веществ (в % по отношению к весу исходного сырья) от продолжительности экстракции разными растворителями при комнатной температуре

*Экстракция алкалоидов чистотела согласно Государственной фармакопее РФ XIV издания [3].* Высушенное и измельченное сырье (Образец 5, 3.00 г, размер частиц  $\leq 0.5$  мм) поместили в круглодонную колбу емкостью 500 мл и добавили 12% уксусную кислоту (200 мл), смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически перемешивая. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы перенесли в мерную колбу и с использованием 12% уксусной кислоты довели объем до 250 мл. Полученную смесь фильтровали через бумажный фильтр, отбросив первые 10 мл фильтрата. К 50 мл фильтрата добавили 6 мл 26% водного аммиака ( $\rho=0.906$  г/мл), доведя pH до  $\sim 8$ , и  $\text{CHCl}_3$  (100 мл), полученную смесь встряхивали 30 мин. Органический слой отделили, упарили в вакууме водоструйного насоса и высушили остаток в вакууме масляного насоса (3–5 мм рт. ст.), получив 10.4 мг экстракта, содержащего сумму алкалоидов (выход 1.73% в расчете на сухое сырье).

Анализ методом  $qYMP$  (в растворе  $\text{CDCl}_3$  с добавлением в качестве стандарта 0.22 мг ТНБ) дал следующее соотношение интенсивностей сигналов: ТНБ (3H) – 1.00, стилопин (1H) – 1.82, хелидонин (2H) – 0.518, протопин (1H) – 0.035. Расчетное содержание алкалоидов в образце экстракта: стилопин – 1.82 мг (0.30% от веса сухого сырья), хелидонин – 0.283 мг (0.047%), протопин – 0.038 мг (0.0063%).

*Экстракция алкалоидов чистотела согласно фармакопее СССР XI издания [28].* Высушенное и измельченное сырье (Образец 1, 4.00 г, размер частиц  $\leq 0.5$  мм) поместили в плоскодонную колбу емкостью 100 мл, смочили сырье 1% водным раствором аммиака (7 мл) и оставили на 15 мин, после добавили в колбу  $\text{CHCl}_3$  (80 мл). Колбу выдержали 18 ч в темноте при комнатной температуре, периодически встряхивая. Хлороформное извлечение фильтровали через тампон из стеклянной ваты и экстрагировали 5% водной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  порциями по 10 мл до отрицательной реакции на алкалоиды с реактивом Бертрана. Объединенный серно-кислотный раствор нейтрализовали 26% водного аммиака до pH=10 и экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  (3 $\times$ 50 мл). Хлороформный экстракт высушили безводным сульфатом магния (2 г), упарили в вакууме водоструйного насоса и получили остаток, содержащий смесь алкалоидов (34.2 мг, 0.855% в расчете на сухое сырье).

Анализ методом  $qYMP$  (17.1 мг экстракта в растворе  $\text{CDCl}_3$  с добавлением в качестве стандарта 0.60 мг ТНБ) дал следующее соотношение интенсивностей сигналов: ТНБ (3H) – 1.00, стилопин (1H) – 1.02, хелидонин (2H) – 1.46, протопин (1H) – 0.37. Расчетное содержание алкалоидов: стилопин – 5.57 мг (0.14% от веса сухого сырья), хелидонин – 4.36 мг (0.11%), протопин – 2.21 мг (0.055%).

Экстракция Образца 5 (4.00 г, размер частиц  $\leq 0.5$  мм) таким же точно образом дала 32.8 мг продукта, содержащего смесь алкалоидов (0.820% в расчете на сухое сырье). Анализ методом  $qYMP$  (16.0 мг экстракта в растворе  $\text{CDCl}_3$  с добавлением в качестве стандарта 0.32 мг ТНБ) дал следующее соотношение интенсивностей сигналов: ТНБ (3H) – 1.00, стилопин (1H) – 2.83, хелидонин (2H) – 0.91, протопин (1H) – 0.85. Расчетное содержание алкалоидов: стилопин – 8.24 мг (0.21% от веса сухого сырья), хелидонин – 1.44 мг (0.036%), протопин – 2.71 мг (0.068%).

*Дробная экстракция методом настаивания (мацерации).* Навеску измельченной воздушно-сухой надземной части чистотела (3–5 г) с размером частиц  $\leq 0.5$  мм заливали *n*-гексаном (80 мл) и оставляли в темноте на 18 ч при комнатной температуре (+23+28 °C). Гексановый раствор сливали, сырье продували воздухом для удаления остатков гексана и заливали этилацетатом (80 мл). Через 18 ч этилацетатный экстракт сливали, сырье продували воздухом и заливали этанолом (80 мл), который сливали через 18 ч. Органические экстракты (гексановый, этилацетатный и этанольный) упаривали на роторном исправителе в вакууме водоструйного насоса при температуре не выше 40 °C и выдерживали в вакууме масляного насоса (2–3 мм рт. ст.) до постоянной массы.

Анализ содержания алкалоидов чистотела в соответствии с фармакопеей (Образец б) [3]. Анализ содержания алкалоидов экстракционно-спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Cary-60 (Австралия) проводили в соответствии не с Государственной фармакопеей РФ XIV издания [3], а с Европейской фармакопеей [29]\*. При этом измерения оптической плотности исследуемого раствора и раствора сравнения проводили относительно дистиллированной воды. Такой способ дает более стабильные результаты, чем измерение оптической плотности относительно раствора сравнения. Расчет суммарного содержания алкалоидов определяли в пересчете на хелидонин в абсолютно сухом сырье (X%). Влажность исходного сырья составила 4.8%. Влажность определена в соответствии с Фармакопеей РФ XIV как потеря массы навески измельченной травы (1 г) при высушивании в сушильном шкафу при 105 °С в течение 2 ч.

Определение содержания алкалоидов выполняли в трех повторностях с навесками 0.7183, 0.7102 и 0.7524 г. Содержание алкалоидов составило 0.72±0.03%.

Подготовка образцов для количественного определения методом ЯМР <sup>1</sup>H. Навеску экстракта (5–20 мг) растворяли в 500 мкл CDCl<sub>3</sub> (для экстракции с помощью гексана, CHCl<sub>3</sub> или EtOAc) или (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (для спиртового экстракта) и добавляли соответственно 100 мкл раствора 1,3,5-тринитробензола в CDCl<sub>3</sub> (8.6 мг/мл) или 100 мкл раствора 1,3,5-тринитробензола в (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (5.3 мг/мл).

Количественный анализ методом ЯМР <sup>1</sup>H. Спектры ЯМР записывали при температуре 30±0.1 °С для растворов в CDCl<sub>3</sub> или (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO на спектрометре Bruker DRX-500 spectrometer (500.13 МГц для ядер <sup>1</sup>H) с использованием сигналов растворителей в качестве внутренних стандартов для расчета химических сдвигов (δ<sub>H</sub> 7.24 м.д. для CDCl<sub>3</sub>, и δ<sub>H</sub> 2.50 м.д. для (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO). Образцы для анализа (0.60 мл растворов концентрации 5–30 мг/мл) помещали в ампулы 5 мм (Bruker BioSpin Corporation). Сбор и анализ данных выполняли с использованием программного комплекса Bruker TopSpin. Подготовку каждого образца и регистрацию спектров для количественных измерений выполняли в трех повторностях.

Параметры сбора данных для количественных экспериментов ЯМР <sup>1</sup>H: 8 фиктивных сканирований (dummy scans), 128 сканов, ширина спектрального окна – 15 м.д., размер спада свободной индукции (ССИ) – 32 К точек, время выборки ССИ – 2.18 с, релаксационная задержка – 5 с. Перед Фурье-преобразованием ССИ заполнялся нулями до размера 128 К точек и выполнялось экспоненциальное уширение линий на 0.5 Гц. Измерения времени релаксации T<sub>1</sub> ядер <sup>1</sup>H выполняли методом «инверсии–восстановления».

Сигнал внутреннего стандарта для количественных экспериментов (1,3,5-тринитробензола) в CDCl<sub>3</sub> проявляется в виде узкого синглета при δ<sub>H</sub> 9.32 м.д. (<sup>1</sup>J<sub>C-H</sub>=178.1 Гц), а в (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO имеет вид уширенного синглета при δ<sub>H</sub> 9.16 м.д.

Проверка содержания берберина методом «введено : найдено». Образец этанольного экстракта травы чистотела (5.0 мг), полученному методом дробной экстракции и не содержащему берберина, растворили в (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (500 мкл) и к полученному раствору прибавили 2.0 мг берберина (78 мкл раствора берберина в (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO концентрации 25.8 мг/мл) и 100 мкл раствора 1,3,5-тринитробензола в (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (5.3 мг/мл). Анализ интенсивностей сигналов берберина и 1,3,5-тринитробензола дает содержание берберина 2.1±0.1 мг/ампулу. Результаты измерения содержания алкалоидов в исследованных экстрактах (табл. 1) приведены в таблице 2.

Таблица 1. Результаты экстракции образцов травы чистотела

Образец сырья	Навеска сырья, г	Метод экстракции	Выход экстракта, мг (% в расчете на сухое сырье)			
				последовательная экстракция растворителями:		
				n-гексан	этилацетат	этанол
1	2	3	4	5	6	7
1	4.00	Фармакопея XI	34.2 (0.855)			
1	3.00	мацерация		64.0 (2.13)	43.9 (1.46)	14.4 (0.480)
2	5.40	мацерация		94.8 (1.76)	87.1 (1.61)	212 (3.93)
3	5.00	мацерация		94.2 (1.33)	88.0 (1.76)	168 (3.36)
4	5.10	мацерация		109 (2.14)	93.5 (1.83)	164 (3.22)

\* В Государственной фармакопее РФ XIV издания фармакопейная статья ФС.2.5.0105.18 «Чистотела большого трава – *Cheledonii majoris herba*» в части анализа на содержание алкалоидов является переложением на русский язык статьи «07/2012:1861 GREATER CELANDINE *Cheledonii herba*» из Европейской фармакопеи 8.0. Однако в русском варианте есть разночтения, связанные с трактовкой термина «концентрация раствора». В англоязычной версии методика определения изложена строго. Мы использовали концентрацию хромотроповой кислоты 10 г/л.

Окончание таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
5	4.00	Фармакопея XI	32.8 (0.820)			
5	4.97	мацерация		69.4 (1.40)	81.2 (1.63)	116 (2.33)
6	3.00	Фармакопея XIV	52.0 (1.73)			
6	5.17	мацерация		74.5 (1.44)	64.2 (1.24)	151 (2.92)

Таблица 2. Результаты количественного определения алкалоидов чистотела методом qNMR

Образец сырья	Содержание индивидуальных алкалоидов и их суммы в % от веса сухого сырья						
	дигидро-сангвинарин	хелидонин	берберин	коптисин	стилопин	протопин	сумма
1 <sup>a</sup>		0.11±0.02			0.14±0.02	0.055±0.012	0.305±0.023
1 <sup>b</sup>	0.013±0.001			0.042±0.006	0.48±0.03		0.535±0.037
2 <sup>b</sup>	0.084±0.006	0.077±0.006	0.031±0.003	0.28±0.01	0.14±0.01		0.612±0.031
3 <sup>b</sup>	0.0064±0.0006		0.072±0.006	0.42±0.02	0.018±0.002		0.516±0.026
4 <sup>b</sup>	0.0033±0.0003		0.099±0.011	0.53±0.02	0.004±0.0003		0.636±0.036
5 <sup>a</sup>		0.036±0.009			0.21±0.02	0.068±0.011	0.314±0.026
5 <sup>b</sup>	0.0094±0.0008			0.30±0.01	0.27±0.01		0.579±0.021
6 <sup>c</sup>		0.047±0.010			0.30±0.02	0.0063±0.0012	0.353±0.030
6 <sup>b</sup>	0.017±0.003			0.23±0.01	0.32±0.01		0.567±0.026
6 <sup>c,d</sup>							0.72±0.03

Примечания: <sup>a</sup> экстракция по Фармакопее СССР XI; <sup>b</sup> мацерация; <sup>c</sup> экстракция по фармакопее РФ XIV; <sup>d</sup> определение алкалоидов в пересчете на хелидонин спектрофотометрическим методом по Европейской фармакопее.

### Обсуждение результатов

В настоящее время актуальными являются исследования, направленные на создание стандартов качества (ФСП, ФС, НД) на лекарственное растительное сырье и препараты, гармонизированных с требованиями ведущих мировых фармакопей и соответствующих новейшим достижениям науки в этой области. Активно развиваются методы химического профилирования, с помощью которых идентификация растительного сырья осуществляется по характерному набору, а также соотношению основных метаболитов – маркерных соединений, присущих данному биологическому виду [19]. В Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания отмечено: «Для установления подлинности смеси веществ (экстрактов) допускают использование одномерных спектров ЯМР целиком, как «отпечатка пальца» объекта, без детализации значений химического сдвига и мультиплетности отдельных сигналов». Методы такого профилирования активно разрабатываются и соответствующие результаты приводятся в статьях, обзорах и диссертационных работах [30, 31], но практически еще активно не используются.

Чистотел (*Chelidonium majus* L.) в этом смысле является благодатным объектом. Во-первых, экстракты чистотела представляют большой практический интерес из-за проявляемого ими широкого спектра биологической активности. Во-вторых, состав алкалоидов чистотела хорошо изучен, и для всех основных компонентов доступны спектральные характеристики, что делает возможным идентификацию самых распространенных алкалоидов даже в очень сложных смесях растительных метаболитов. Основные алкалоиды чистотела достаточно исследованы в химическом отношении, поэтому ясны границы их устойчивости при контакте с различными реагентами и растворителями, что облегчает выбор условий получения экстрактов для спектрального профилирования с целью получения максимально достоверного и информативного профиля нативных алкалоидов.

Мы исследовали образцы как растительного сырья чистотела, полученного из дикорастущих растений в результате собственных сборов, так и стандартного аптечного сырья.

#### Идентификация алкалоидов

Экстракцию травы чистотела выполняли тремя способами: (1) 12%-ной водной уксусной кислотой по прописи, приведенной в Государственной фармакопее РФ XIV издания [3]; (2) хлороформом с добавлением водного аммиака по методике из Государственной фармакопеи РФ XI издания [28]; (3) методом последовательного настаивания (мацерацией) растворителями в порядке увеличения их полярности: *n*-гексаном, этилацетатом и этанолом. Первой задачей, которую пришлось решать, была связана с идентификацией алкало-

идов в составе получаемых экстрактов. Для идентификации алкалоидов в изучаемых экстрактах мы сравнивали спектры ЯМР  $^1\text{H}$  получаемых нами образцов с опубликованными данными для всех алкалоидов, когда-либо выделенных из экстрактов чистотела (раздел 2 электронного приложения к статье).

В ЯМР  $^1\text{H}$ -профилях идентифицированы характерные для чистотела (маркерные) соединения:

– в экстрактах, полученных по прописям из Государственной фармакопеи РФ XIV издания [3] и XI издания [28] – хелидонин, стилопин и протопин;

– в гексановом экстракте – хелидонин, стилопин и дигидросангвинарин;

– в этилацетатном экстракте – хелидонин, стилопин и дигидросангвинарин;

– в этанольном экстракте – берберин и коптисин.

Характеристические фрагменты спектральных профилей экстрактов с указанием диагностических сигналов алкалоидов приведены на рисунках 2–4\*. Помимо этого, в исследуемых экстрактах обнаруживаются также сигналы других веществ, спектры которых могли бы принадлежать алкалоидам. Поэтому мы сравнивали полученные нами спектры экстрактов со спектрами других алкалоидов, структуры которых очень близки к алкалоидам чистотела, и известных алкалоидов-артефактов, которые образуются из нативных алкалоидов при в ходе экстракции и пробоподготовки (раздел 2.2 электронного приложения к статье). Однако никаких иных алкалоидов идентифицировать не удалось.

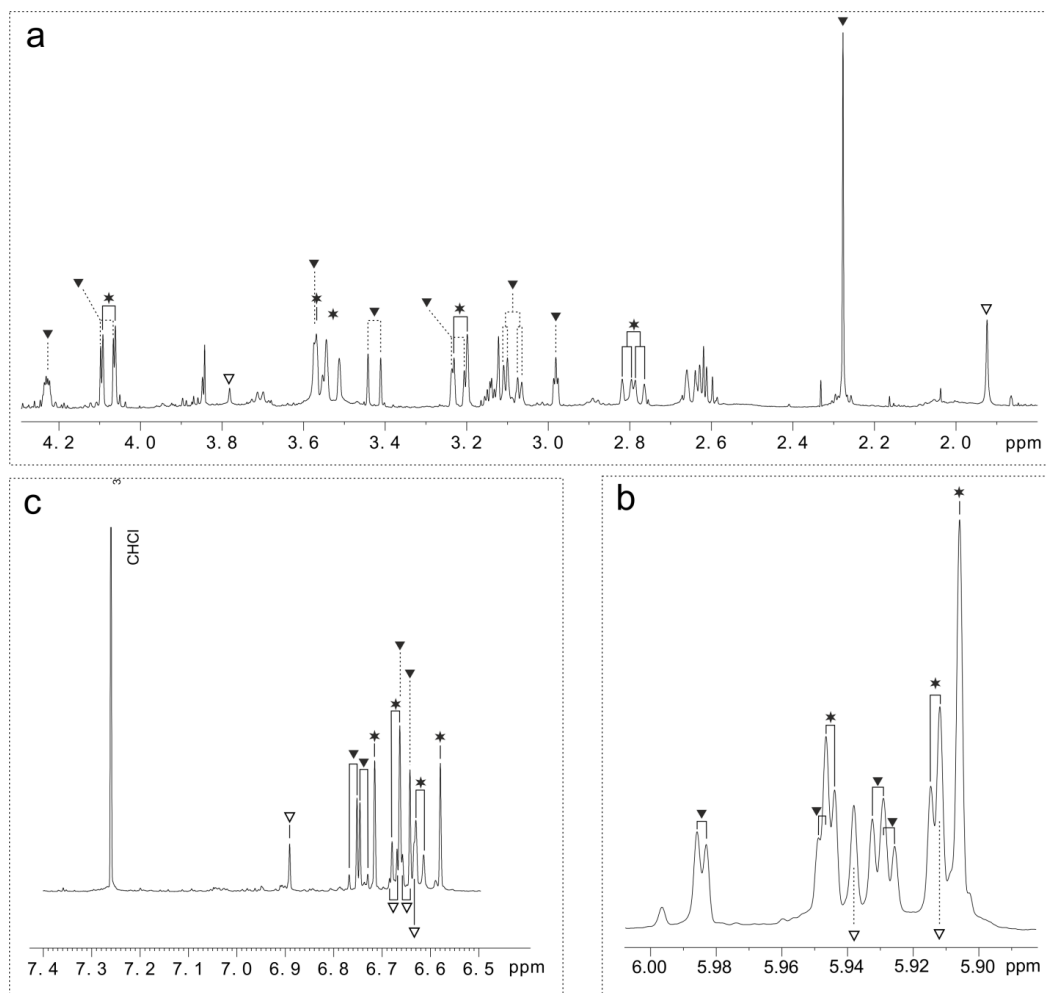


Рис. 2. Фрагменты спектра ЯМР  $^1\text{H}$  (30 °С, 500 МГц, в  $\text{CDCl}_3$ ) экстракта чистотела (*C. majus* L.) в диапазонах  $\delta_{\text{H}}$  1.8–4.3 м.д. (а),  $\delta_{\text{H}}$  5.88–6.01 м.д. (б) и  $\delta_{\text{H}}$  6.5–7.4 м.д. (с). Экстракт приготовлен по методике из Государственной фармакопеи СССР IX издания [28]. Помечены диагностические сигналы хелидонина (▼), стилопина (\*) и протопина (▽)

\* Полные спектры ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактов чистотела, приготовленных разными способами, даны в электронном приложении к статье в разделе 3.

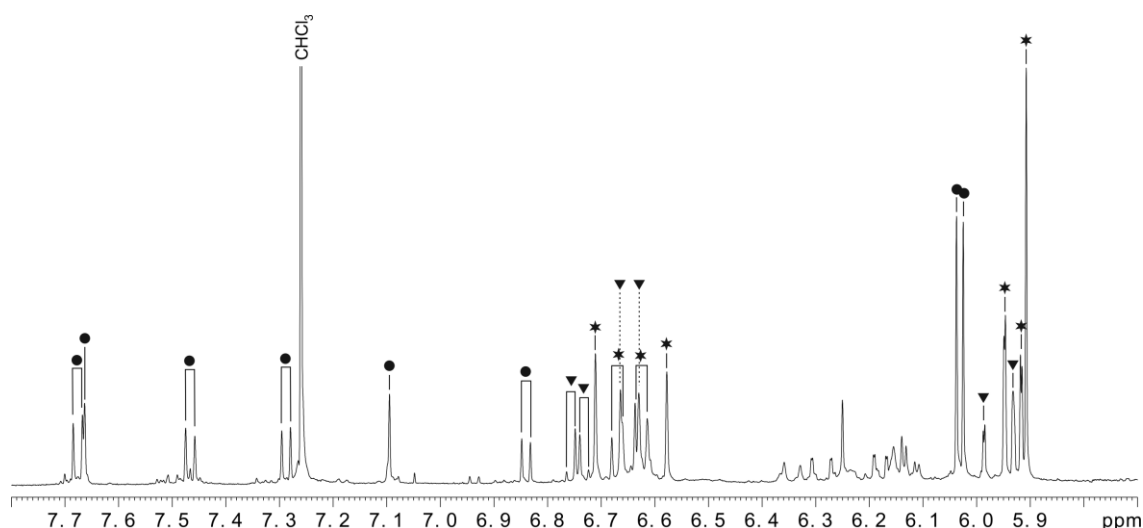


Рис. 3. Фрагмент спектра ЯМР  $^1\text{H}$  (30 °С, 500 МГц, в  $\text{CDCl}_3$ ) в диапазоне  $\delta_{\text{H}}$  5.7–7.8 м.д. экстракта чистотела (*C. majus* L.). Экстракт приготовлен методом настаивания (мацерацией) *n*-гексаном. Помечены диагностические сигналы дигидросангвинарина (●), хелидонина (▼) и стилопина (\*).

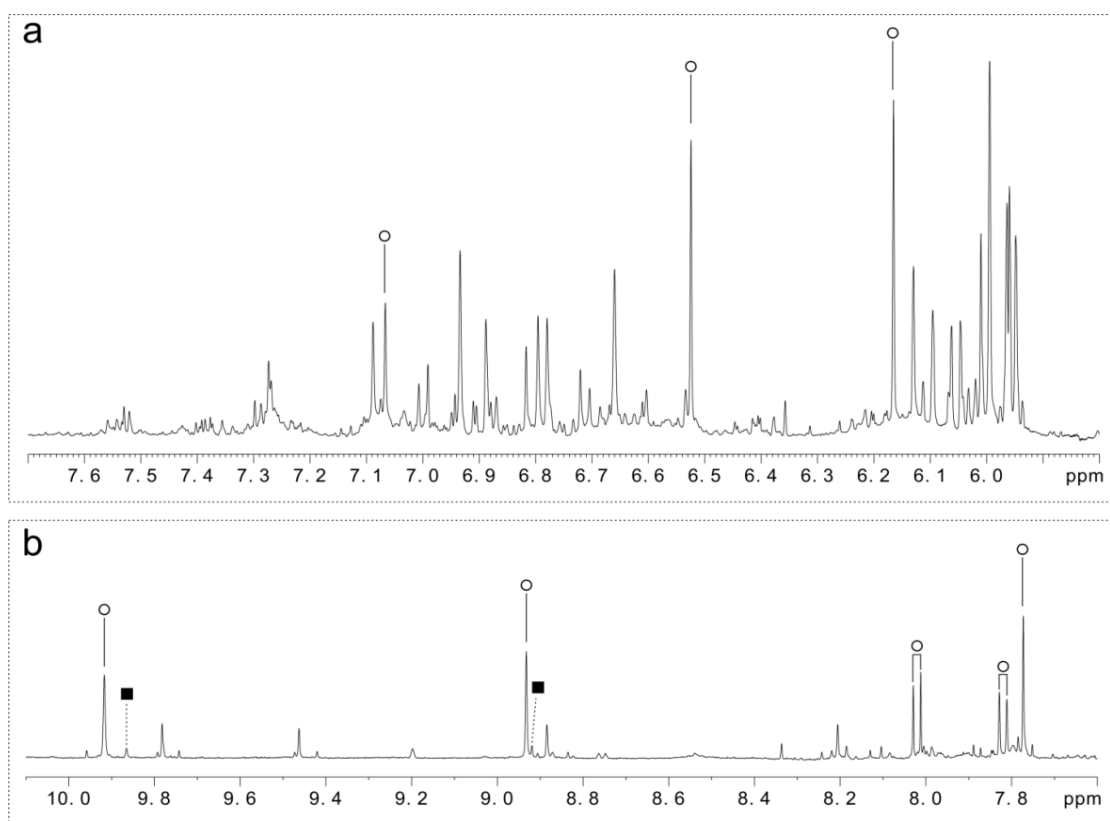


Рис. 4. Фрагменты спектра ЯМР  $^1\text{H}$  (30 °С, 500 МГц, в  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) экстракта чистотела (*C. majus* L.) в диапазонах  $\delta_{\text{H}}$  5.8–7.7 м.д. (а) и  $\delta_{\text{H}}$  7.6–10.1 м.д. (б). Экстракт приготовлен методом настаивания (мацерацией) этанолом после последовательной экстракции *n*-гексаном и этилацетатом. Помечены диагностические сигналы берберина (■) и коптисина (○)

Обращают на себя внимание различия в составе алкалоидов при экстракции сырья по прописям из фармакопеи РФ и методом настаивания. Так, хелидонин и протопин обнаруживаются в основном в экстрактах, полученных по прописям из ГФ. В экстрактах, полученных по прописям из ГФ, не обнаруживаются дигидросангвинарин и коптисин, которые всегда есть в экстрактах, получаемых настаиванием.



*Количественный анализ содержания алкалоидов*

Приведенные в фармакопее методики выделения суммы алкалоидов для оценки их количественного содержания подразумевают экстракцию растительного сырья с использованием минеральной или органической кислоты для извлечения веществ, обладающих основными свойствами, с последующей нейтрализацией кислотного экстракта для перевода оснований в органическую фазу. Согласно Фармакопее СССР XI издания [28], сырье смачивали водным раствором аммиака (для перевода солей алкалоидов в форму оснований), после чего экстрагировали хлороформом при комнатной температуре, хлороформный экстракт обрабатывали 5%-ной водной серной кислотой, сернокислотный экстракт нейтрализовали концентрированным водным аммиаком и сумму оснований (алкалоидов) извлекали хлороформом. В Фармакопее РФ XIV издания [3] прописана методика, повторяющая нормы Европейской фармакопеи [29]. По этой методике экстракцию выполняют 12%-ным водным раствором уксусной кислоты при нагревании на кипящей водяной бане, затем экстракт нейтрализуют концентрированным водным аммиаком и сумму оснований (алкалоидов) извлекают хлористым метиленом. И тот, и другой вариант экстракции подразумевает контакт алкалоидов с кислотой и включает последующую обработку экстрактов концентрированным водным аммиаком, что является небезобидным с точки зрения сохранности нативных компонентов. Известно, например, что при контакте хелитрина и сангвинарина с аммиаком образуются «димерные» амины [32] и так называемые «свободные основания» (*англ.* free bases, pseudobases), которые по факту являются 8-гидроксипроизводными. Сходным образом ведут себя берберин и коптизин [33]. С другой стороны, обработка кислотами может приводить к увеличению выхода алкалоидов. Подобно другим вторичным метаболитам растений, алкалоиды могут содержаться в растениях не только в свободном виде, но и в виде нерастворимых в органических растворителях конъюгатов с другими веществами. В этом случае кислотная обработка может приводить к разрушению таких конъюгатов и высвобождению алкалоидов. Однако в отношении чистотела таких данных в литературе нет. Таким образом, экстракция с использованием кислот, с одной стороны, позволяет избавиться от большого количества «нейтральных» веществ, которые мешают количественному определению алкалоидов, но, с другой стороны, вызывают нежелательные вторичные химические процессы, что искажает картину нативных алкалоидов.

Последовательная экстракция травы чистотела растворителями разной полярности (гексан, этилацетат, этанол) позволяет избежать вторичных химических превращений и образования артефактов, сохраняя алкалоиды, изначально содержащиеся в растительном сырье. Вместе с тем отсутствие кислотной обработки приводит к извлечению из травы большого количества других веществ. Поэтому получающиеся при этом экстракты содержат множество разнообразных растительных метаболитов, а алкалоиды являются лишь примесями в таких смесях. Однако в случае чистотела из-за особенностей спектральных характеристик входящих в состав экстрактов алкалоидов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  есть характерные области, в которых легко идентифицировать характеристичные сигналы маркерных алкалоидов (рис. 2–4). Добавление внутреннего стандарта – очищенного 1,3,5-тринитробензола [34] – позволяет выполнить раздельное интегрирование сигналов алкалоидов и стандарта, поскольку сигнал тринитробензола не перекрывается с сигналами целевых соединений.

Результаты количественных измерений приведены в таблице 2, а соответствующие диаграммы показаны на рисунках 5 и 6. Полученные данные показывают, что результаты экстракции по методикам, приведенным в Государственной фармакопее РФ XIV издания [3] и в Государственной фармакопее СССР XI издания [28], дают сходные результаты: (а) в составе экстрактов обнаруживаются одни и те же алкалоиды – хелидонин, стилопин и протопин (рис. 5); (б) суммарное содержание алкалоидов в 1.6–1.8 раз меньше, чем при экстракции тех же самых образцов сырья методом настаивания (табл. 2).

Несмотря на то, что общее содержание алкалоидов в экстрактах, получаемых методом настаивания, во всех случаях лежит в достаточно узких пределах 0.516–0.636% (табл. 2), наблюдаются заметные различия в содержании индивидуальных алкалоидов, что связано с вариабельностью растительного сырья. Так, если анализ состава алкалоидов двух партий аптечного сырья от одного и того же производителя дают схожие результаты (рис. 6, образцы 5 и 6), то анализ образцов собственного сбора показывает иное содержание индивидуальных компонентов (рис. 6, образцы 1–4). Примечательно, что состав образцов из одной и той же популяции чистотела, собранных в разные годы (рис. 6, образцы 1, 2 и 4), сильно различаются по составу, в то время как образцы, полученные из разных популяций в одно и то же время, имеют сходный состав (рис. 6, образцы 3 и 4).

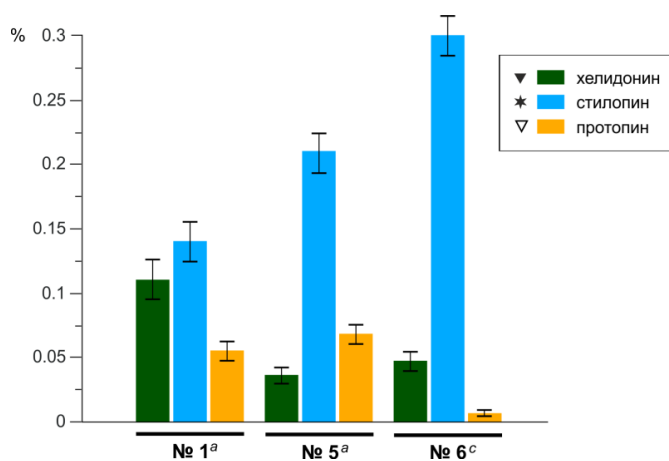


Рис. 5. Содержание индивидуальных алкалоидов в экстрактах чистотела (*Chelidonium majus* L.), приготовленных по прописям из Государственной фармакопеи, по данным qNMR. Обозначение экстрактов дано в таблице 2, обозначения алкалоидов соответствуют обозначениям, приведенным на рисунке 2

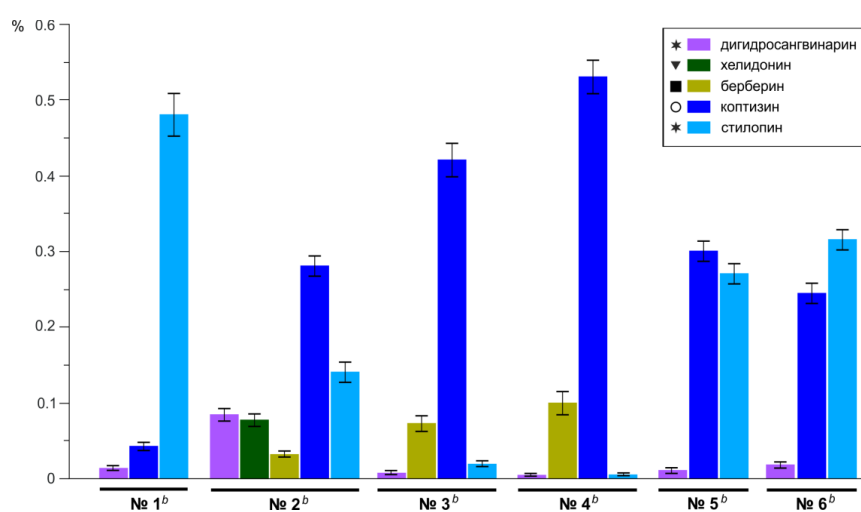


Рис. 6. Содержание индивидуальных алкалоидов в экстрактах чистотела (*Chelidonium majus* L.), приготовленных методом настаивания, по данным qNMR. Обозначение экстрактов дано в таблице 2, обозначения алкалоидов соответствуют обозначениям, приведенным на рисунках 3 и 4

Содержание алкалоидов, определяемое в составе экстрактов чистотела методом qNMR (0.35%) в 2 раза ниже, чем при использовании процедуры спектрофотометрического определения, описанной в ГФ РФ XIV (0.72%) (табл. 2, образцы 6<sup>c</sup> и 6<sup>c,d</sup>). Причиной такого различия может быть следующее. Экстракция растительного сырья кислотами призвана селективно извлечь компоненты, имеющие основные свойства. Подразумевается, что такими веществами могут быть только растительные алкалоиды. Однако обработка растительного сырья кислотами может приводить к частично или полной деструкции других азотсодержащих соединений, продукты превращений которых могут попадать в конечный экстракт. Хромотроповая кислота не является селективным реагентом на алкалоиды: она широко применяется в органическом и неорганическом анализе, поскольку дает окрашенные аддукты (комплексы) со многими группами веществ. Поэтому вклад в поглощение при длине волны 570 нм будут давать не только комплексы алкалоидов с хромотроповой кислотой, но и комплексы и аддукты с другими органическими веществам, что будет приводить к завышению расчетного содержания алкалоидов.

### Выводы

Анализ экстрактов чистотела (*Chelidonium majus* L.) методом ЯМР <sup>1</sup>H позволяет идентифицировать основные алкалоиды – производные фенантридина, протоберберина и протопина, а использование метода qNMR дает с удовлетворительной точностью информацию о содержании этих алкалоидов. Анализ состава алкалоидов в экстрактах, получаемых по методикам, описанным в фармакопеях, показывает, что такие ме-

тодики сильно искажают состав алкалоидов по сравнению с «мягкими» методами экстракции, не включающими контакт растительного сырья кислотами ни на одном из этапов обработки. Профили алкалоидов подвержены значительной изменчивости и зависят не только от метода получения экстракта, но также и от места и года сбора растительного сырья.

*Авторы выражают благодарность Химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН за проведение спектральных и аналитических измерений.*

### Список литературы

1. Флора СССР / под ред. В.Л. Комарова. М., Л., 1937. Т. 7. 792 с.
2. Hassler M. Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World // Catalogue of Life Checklist. 2022. DOI: 10.48580/dfpk-3dd.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIV. М., 2018. Т. 4. С. 6606–6613.
4. Sárközi Á., Janicsák G., Kursinszki L., Kéry Á. Alkaloid Composition of *Chelidonium majus* L. Studied by Different Chromatographic Techniques // Chromatographia. 2006. Vol. 63. N13. Pp. 81–86. DOI: 10.1365/s10337-006-0728-7.
5. Zhou Q., Liu Y., Wang X., Di X. Microwave-assisted extraction in combination with capillary electrophoresis for rapid determination of isoquinoline alkaloids in *Chelidonium majus* L. // Talanta. 2012. Vol. 99. Pp. 932–938. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.07.061.
6. Gu Y., Qian D., Duan J., Wang Z., Guo J., Tang Y., Guo S. Simultaneous determination of seven main alkaloids of *Chelidonium majus* L. by ultra-performance LC with photodiode-array detection // Journal of Separation Science. 2010. Vol. 33. N8. Pp. 1004–1009. DOI: 10.1002/jssc.200900690.
7. Wianowska D., Garbaczewska S., Cieniecka-Roslonkiewicz A., Typek R., Dawidowicz A.L. Chemical composition and antifungal activity of *Chelidonium majus* extracts – antagonistic action of chelerythrine and sanguinarine against *Botrytis cinerea* // Chemistry and Ecology. Taylor & Francis. 2018. Vol. 34. N6. Pp. 582–594. DOI: 10.1080/02757540.2018.1462345.
8. Orland A., Knapp K., König G.M., Ulrich-Merzenich G., Knöß W. Combining metabolomic analysis and microarray gene expression analysis in the characterization of the medicinal plant *Chelidonium majus* L. // Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology. 2014. Vol. 21. N12. Pp. 1587–1596. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.07.012.
9. Capistrano I.R., Wouters A., Lardon F., Gravekamp C., Apers S., Pieters L. In vitro and in vivo investigations on the antitumour activity of *Chelidonium majus* // Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology. 2015. Vol. 22. N14. Pp. 1279–1287. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.10.013.
10. Leong F., Hua X., Wang M., Chen T., Song Y., Tu P., Chen X.-J. Quality standard of traditional Chinese medicines: comparison between European Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia and recent advances // Chinese Medicine. 2020. Vol. 15. N1. P. 76. DOI: 10.1186/s13020-020-00357-3.
11. Bogucka-Kocka A., Zalewski D. Qualitative and quantitative determination of main alkaloids of *Chelidonium majus* L. using thin-layer chromatographic-densitometric method // Acta Chromatographica. 2017. Vol. 29. N3. Pp. 385–397. DOI: 10.1556/1326.2017.29.3.09.
12. Artamonova E.S., Kurkin V.A. Developing methods for qualitative and quantitative analysis of *Chelidonium majus* herbs // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2008. Vol. 42. N11. Pp. 633–636. DOI: 10.1007/s11094-009-0193-3.
13. Czeszak A., Resztak M., Czyski A., Nowak I. Determination of the partition coefficient of isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* by reversed phase thin layer chromatography // New J. Chem. The Royal Society of Chemistry. 2020. Vol. 44. N18. Pp. 7484–7489. DOI: 10.1039/D0NJ00307G.
14. Migas P., Heyka M., Pobłocka-Olech L., Krauze-Baranowska M. BMD-TLC –the Useful Technique for Quantitative Analysis of Chelidone, Chelerythrine and Berberine in Herbal Drugs // JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC. 2012. Vol. 25. Pp. 439–444. DOI: 10.1556/JPC.25.2012.5.9.
15. Suchomelová J., Bochoráková H., Paulová H., Musil P., Táborská E. HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family *Papaveraceae* // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. Vol. 44. N1. Pp. 283–287. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.005.
16. Погочкая А.А., Бузук Г.Н., Алексеев Н.А. Влияние возрастающих концентраций уксусной кислоты на извлечение алкалоидов из травы чистотела большого – *Chelidonium majus* // Вестник фармации. 2009. №3(45). С. 21–27.
17. Strzemski M., Dresler S., Podkościelna B., Skic K., Sowa I., Załuski D., Verpoorte R., Zielińska S., Krawczyk P., Wójciak-Kosior M. Effectiveness of Volatile Natural Deep Eutectic Solvents (VNADESS) for the Green Extraction of *Chelidonium majus* Isoquinoline Alkaloids // Molecules. 2022. Vol. 27. Article 2815. DOI: 10.3390/molecules27092815.
18. Gañán N.A., Dias A.M.A., Bombaldi F., Zygadlo J.A., Brignole E.A., Sousa H.C. de, Braga M.E.M. Alkaloids from *Chelidonium majus* L.: Fractionated supercritical CO<sub>2</sub> extraction with co-solvents // Separation and Purification Technology. 2016. Vol. 165. Pp. 199–207. DOI: 10.1016/j.seppur.2016.04.006.
19. Ткачев А.В. Проблемы качественного и количественного анализа летучих веществ растений // Химия растительного сырья. 2017. №3. С. 5–37. DOI: 10.14258/jcrpm.2017032712.

20. Markley J.L., Brüschweiler R., Edison A.S., Eghbalnia H.R., Powers R., Raftery D., Wishart D.S. The future of NMR-based metabolomics // *Curr Opin Biotechnol.* 2017. Vol. 43. Pp. 34–40. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.
21. Nagana Gowda G.A., Raftery D. Recent advances in NMR-based metabolomics // *Anal. Chem.* 2017. Vol. 89. N1. Pp. 490–510. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04420.
22. Kumar D. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy for metabolic profiling of medicinal plants and their products // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2016. Vol. 46. N5. Pp. 400–412. DOI: 10.1080/10408347.2015.1106932.
23. Hatzakis E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review // *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019. Vol. 18. N1. Pp. 189–220. DOI: 10.1111/1541-4337.12408.
24. Singh S., Roy R. The application of absolute quantitative textsuperscript <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in drug discovery and development // *Expert Opin Drug Discovery.* 2016. Vol. 11. N7. Pp. 695–706. DOI: 10.1080/17460441.2016.1189899.
25. Benedito L.E.C., Maldaner A.O., Oliveira A.L. An external reference <sup>1</sup>H qNMR method (PULCON) for characterization of high purity cocaine seizures // *Anal Methods.* 2018. Vol. 10. N5. Pp. 489–495. DOI: 10.1039/C7AY02343J.
26. Wu R.Y., He Y., He W., Zhang Y., Lu J., Dai Z., Ma S., Lin R. Application of quantitative <sup>1</sup>H NMR for the calibration of protoberberine alkaloid reference standards // *J. Pharm. Biomed. Anal. England.* 2014. Vol. 90. Pp. 92–97. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.11.018.
27. Khatib N.M., Pieraccini G., Innocenti M., Melani F., Mulinacci N. An insight on the alkaloid content of *Capparis spinosa* L. root by HPLC-DAD-MS, MS/MS and <sup>1</sup>H qNMR // *J. Pharm. Biomed. Anal. England.* 2016. Vol. 123. Pp. 53–62. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.063.
28. Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик. 11-е издание. М., 1990. Т. 2. С. 309–311.
29. European Pharmacopoeia. The 8th Edition. 2013.
30. Евдокимова О.В. Разработка методологии стандартизации и контроля качества средств растительного происхождения (гармонизация, унификация, валидация). М., 2012. 338 с.
31. Ивлев В.А., Прокопьев А.С., Калабин Г.А. Количественная спектроскопия ЯМР в идентификации и контроле качества лекарственных препаратов и растительных биологически активных композиций // *Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности.* 2015. №1. С. 5–14.
32. Toušek J., Dommissie R., Dostál J., Žák Z., Pieters L., Marek R. Configurations and conformations of sanguinarine and chelerythrine free bases stereoisomers // *Journal of Molecular Structure.* 2002. Vol. 613. N1. Pp. 103–113. DOI: 10.1016/S0022-2860(02)00138-2.
33. Dostál J., Man S., Sečkářová P., Hulová D., Nečas M., Potáček M., Toušek J., Dommissie R., Van Dongen W., Marek R. Berberine and coptisine free bases // *Journal of Molecular Structure.* 2004. Vol. 687. N1. Pp. 135–142. DOI: 10.1016/j.molstruc.2003.09.018.
34. Коротких М.О., Ткачев А.В. Химическое профилирование *Papaver kuvajevii*: определение содержания таксифиллина – основного цианогенного гликозида // *Химия растительного сырья.* 2018. №2. С. 71–75. DOI: 10.14258/jcrpm.2018023506.

*Поступила в редакцию 11 июля 2022 г.*

*После переработки 30 декабря 2022 г.*

*Принята к публикации 9 января 2023 г.*

**Для цитирования:** Коротких М.О., Романенко Е.П., Тихова В.Д., Ткачев А.В. Исследование экстрактов чистотела (*Chelidonium majus* L.) методом ЯМР <sup>1</sup>H // *Химия растительного сырья.* 2023. №1. С. 101–114. DOI: 10.14258/jcrpm.20230111663.

**Korotkikh M.O., Romanenko E.P., Tikhova V.D., Tkachev A.V.\*** INVESTIGATION OF CELANDINE EXTRACTS (*CHELIDONIUM MAJUS* L.) BY <sup>1</sup>H NMR AND QNMR METHODS

N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of SB RAS, pr. Lavrentieva, 9, Novosibirsk, 630090 (Russia), e-mail: atkachev@nioch.nsc.ru

The analysis of Celandine extracts (*Chelidonium majus* L.) by <sup>1</sup>H NMR method makes it possible to identify the main alkaloids – derivatives of phenanthridine, protoberberin and protopin, and the use of the qNMR method provides information with satisfactory accuracy about the content of these alkaloids. The content of alkaloids determined in the composition of Celandine extracts by the qNMR method (0.35%) is 2 times lower than when using the spectrophotometric determination procedure described in the GF of the Russian Federation XIV (0.72%). The extraction results according to the methods given in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XIV edition and in the State Pharmacopoeia of the USSR of the IX edition give similar results: the same alkaloids are found in the extracts – chelidonin, stylopine and protopine, and the total content of alkaloids is 1.6–1.8 times less than when extracting the same raw material samples by the method insistence. When extracted by infusion, the main alkaloids in the extracts are dihydrosanguinarin, chelidonin, stylopine, berberine and coptisin.

**Keywords:** celandine, *Chelidonium majus* alkaloids, State Pharmacopoeia of the Russian Federation, NMR profiling.

### References

1. *Flora SSSR*. [Flora of the USSR], ed. V.L. Komarov. Moscow, Leningrad, 1937, vol. 7, 792 p. (in Russ.).
2. Hassler M. *Catalogue of Life Checklist*, 2022. DOI: 10.48580/dfpk-3dd.
3. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. Izdaniye XIV*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIV]. Moscow, 2018, vol. 4, pp. 6606–6613. (in Russ.).
4. Sárközi Á., Janicsák G., Kursinszki L., Kéry Á. *Chromatographia*, 2006, vol. 63, no. 13, pp. 81–86. DOI: 10.1365/s10337-006-0728-7.
5. Zhou Q., Liu Y., Wang X., Di X. *Talanta*, 2012, vol. 99, pp. 932–938. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.07.061.
6. Gu Y., Qian D., Duan J., Wang Z., Guo J., Tang Y., Guo S. *Journal of Separation Science*, 2010, vol. 33, no. 8, pp. 1004–1009. DOI: 10.1002/jssc.200900690.
7. Wianowska D., Garbaczewska S., Cieniecka-Roslonkiewicz A., Typek R., Dawidowicz A.L. *Chemistry and Ecology*, 2018, vol. 34, no. 6, pp. 582–594. DOI: 10.1080/02757540.2018.1462345.
8. Orland A., Knapp K., König G.M., Ulrich-Merzenich G., Knöß W. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2014, vol. 21, no. 12, pp. 1587–1596. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.07.012.
9. Capistrano I.R., Wouters A., Lardon F., Gravekamp C., Apers S., Pieters L. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2015, vol. 22, no. 14, pp. 1279–1287. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.10.013.
10. Leong F., Hua X., Wang M., Chen T., Song Y., Tu P., Chen X.-J. *Chinese Medicine*, 2020, vol. 15, no. 1, p. 76. DOI: 10.1186/s13020-020-00357-3.
11. Bogucka-Kocka A., Zalewski D. *Acta Chromatographica*, 2017, vol. 29, no. 3, pp. 385–397. DOI: 10.1556/1326.2017.29.3.09.
12. Artamonova E.S., Kurkin V.A. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2008, vol. 42, no. 11, pp. 633–636. DOI: 10.1007/s11094-009-0193-3.
13. Czeszak A., Resztak M., Czyrski A., Nowak I. *New J. Chem. The Royal Society of Chemistry*, 2020, vol. 44, no. 18, pp. 7484–7489. DOI: 10.1039/D0NJ00307G.
14. Migas P., Heyka M., Poblócka-Olech L., Krauze-Baranowska M. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 2012, vol. 25, pp. 439–444. DOI: 10.1556/JPC.25.2012.5.9.
15. Suchomelová J., Bochoráková H., Paulová H., Musil P., Táborská E. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 44, no. 1, pp. 283–287. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.005.
16. Pogotskaya A.A., Buzuk G.N., Alekseyev N.A. *Vestnik farmatsii*, 2009, no. 3(45), pp. 21–27. (in Russ.).
17. Strzemski M., Dresler S., Podkościelna B., Skic K., Sowa I., Załuski D., Verpoorte R., Zielińska S., Krawczyk P., Wójciak-Kosior M. *Molecules*, 2022, vol. 27, article 2815. DOI: 10.3390/molecules27092815.
18. Gañán N.A., Dias A.M.A., Bombaldi F., Zygadlo J.A., Brignole E.A., Sousa H.C. de, Braga M.E.M. *Separation and Purification Technology*, 2016, vol. 165, pp. 199–207. DOI: 10.1016/j.seppur.2016.04.006.
19. Tkachev A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2017, no. 3, pp. 5–37. DOI: 10.14258/jcprm.2017032712. (in Russ.).
20. Markley J.L., Brüschweiler R., Edison A.S., Eghbalnia H.R., Powers R., Raftery D., Wishart D.S. *Curr Opin Biotechnol.*, 2017, vol. 43, pp. 34–40. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.
21. Nagana Gowda G.A., Raftery D. *Anal. Chem.*, 2017, vol. 89, no. 1, pp. 490–510. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04420.
22. Kumar D. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2016, vol. 46, no. 5, pp. 400–412. DOI: 10.1080/10408347.2015.1106932.
23. Hatzakis E. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 189–220. DOI: 10.1111/1541-4337.12408.
24. Singh S., Roy R. *Expert Opin Drug Discovery*, 2016, vol. 11, no. 7, pp. 695–706. DOI: 10.1080/17460441.2016.1189899.
25. Benedito L.E.C., Maldaner A.O., Oliveira A.L. *Anal. Methods*, 2018, vol. 10, no. 5, pp. 489–495. DOI: 10.1039/C7AY02343J.
26. Wu R.Y., He Y., He W., Zhang Y., Lu J., Dai Z., Ma S., Lin R. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, vol. 90, pp. 92–97. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.11.018.

\* Corresponding author.

27. Khatib N.M., Pieraccini G., Innocenti M., Melani F., Mulinacci N. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, vol. 123, pp. 53–62. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.063.
28. *Gosudarstvennaya farmakopeya Soyuzo Sovetskikh Sotsialisticheskikh Respublik. 11-e izdaniye*. [State Pharmacopoeia of the Union of Soviet Socialist Republics. 11 edition]. Moscow, 1990, vol. 2, pp. 309–311. (in Russ.).
29. *European Pharmacopoeia. The 8th Edition*. 2013.
30. Yevdokimova O.V. *Razrabotka metodologii standartizatsii i kontrolya kachestva sredstv rastitel'nogo proiskhozhdeniya (garmonizatsiya, unifikatsiya, validatsiya)*. [Development of a methodology for standardization and quality control of herbal products (harmonization, unification, validation)]. Moscow, 2012, 338 p. (in Russ.).
31. Ivlev V.A., Prokop'yev A.S., Kalabin G.A. *Vestnik RUDN. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*, 2015, no. 1, pp. 5–14. (in Russ.).
32. Toušek J., Dommissie R., Dostál J., Žák Z., Pieters L., Marek R. *Journal of Molecular Structure*, 2002, vol. 613, no. 1, pp. 103–113. DOI: 10.1016/S0022-2860(02)00138-2.
33. Dostál J., Man S., Sečkářová P., Hulová D., Nečas M., Potáček M., Toušek J., Dommissie R., Van Dongen W., Marek R. *Journal of Molecular Structure*, 2004, vol. 687, no. 1, pp. 135–142. DOI: 10.1016/j.molstruc.2003.09.018.
34. Korotkikh M.O., Tkachev A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 2, pp. 71–75. DOI: 10.14258/jcprm.2018023506. (in Russ.).

Received July 11, 2022

Revised December 30, 2022

Accepted January 9, 2023

**For citing:** Korotkikh M.O., Romanenko E.P., Tikhova V.D., Tkachev A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 1, pp. 101–114. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230111663.