

УДК 582.893.6+547.816.4

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ КЕЛЛАКТОНА И ДРУГИХ КУМАРИНОВ В *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* (APIACEAE)

© Д.Н. Оленников^{1*}, Н.К. Чирикова²

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,
ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047, Россия, olennikovdn@mail.ru

² Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова,
ул. Белинского, 58, Якутск, 677000, Россия

Phlojodicarpus sibiricus (Fisch.) Koso-Pol. – лекарственное растение семейства Apiaceae, подземные органы которого накапливают различные группы кумаринов, включая простые кумарины, фурукумарины и ангулярные дигидропиранокумарины в виде эфиров келлактона (3',4'-дигидрокси-3',4'-дигидросеселина), являющиеся доминирующей группой вторичных метаболитов. Известные методы анализа корневищ и корней *P. sibiricus* определяют содержание отдельных соединений (виснадин, дигидросамидин), что не позволяет получить полную информацию о присутствии кумариновых соединений в растении. В настоящем исследовании разработана методика количественного анализа кумаринов, включающая предварительный гидролиз сырья в среде водного гидроксида калия, что приводит к дезацилированию этерифицированных производных келлактона и ломатина, не затрагивая гликозиды простых кумаринов, с последующим анализом продуктов гидролиза (сумма келлактонов, ломатин) и 6'-О-апиозил скиммина методом ВЭЖХ. Разработанная методика характеризуется высокой скоростью анализа, удовлетворительными валидационными характеристиками и точностью. Апробация методики была проведена на образцах корневищ и корней *P. sibiricus*, собранных в трех регионах Сибири (Забайкальский край, Республика Бурятия, Республика Саха (Якутия)). Суммарное содержание кумаринов в растительном сырье из исследуемых популяций составило 12.70–74.03 мг/г. Методика может быть использована для анализа качества и стандартизации корневищ и корней *P. sibiricus*.

Ключевые слова: *Phlojodicarpus sibiricus*, Apiaceae, ангулярные дигидропиранокумарины, келлактон, ВЭЖХ, количественный анализ.

Для цитирования: Оленников Д.Н., Чирикова Н.К. Количественный анализ келлактона и других кумаринов в *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae) // Химия растительного сырья. 2024. №1. С. 124–131. DOI: 10.14258/jcprm.20240112591.

Введение

Кумарины представляют собой важную группу природных фитоконпонентов, обладающих различной биологической активностью и встречающихся во многих растениях, причем наибольшее количество концентраторов отмечено в семействе Apiaceae [1]. Во флоре Восточной Сибири встречаются виды данного семейства, способные к накоплению простых кумаринов (*Bupleurum*) [2], пиранокумаринов (*Seseli*) [3], *Phlojodicarpus* [4], фурукумаринов (*Angelica* [5], *Ferulopsis* [4]) и других. Известным лекарственным растением, отличающимся высоким содержанием кумаринов, является *Phlojodicarpus sibiricus* (Fisch.) Koso-Pol., в корневищах и корнях которого обнаружено около 40 соединений (табл. 1). Ангулярные дигидропиранокумарины, образованные от келлактона (3',4'-дигидрокси-3',4'-дигидросеселина), представляют основную группу производных [4, 6–8].

Для осуществления количественной стандартизации корневищ и корней *P. sibiricus* ранее была разработана комплексная методика, включающая экстракцию в аппарате Сокслета, концентрирование в вакууме, растворение в этаноле и анализ методом газовой хроматографии [9]. В результате определяется содержание суммы виснадина и дигидросамидина, на долю которых приходится только 40–60% от суммы кумаринов в сырье [4], что приводит к заниженным результатам по причине неучтенности оставшихся соединений. В состав последних входят умбеллиферон и скополетин и их производные, которые обладают противовоспалительным, антибактериальным, антиоксидантным, цитотоксическим и антидиабетическим действием [10, 11], а также

* Автор, с которым следует вести переписку.

различные эфиры келлактона, являющиеся известными биоактивными агентами с кардиопротекторной, нейропротекторной, противоопухолевой и антиатеросклеротической активностью [12]. В этой связи целью настоящей работы явилась разработка методики количественного анализа корневищ и корней *P. sibiricus*, позволяющая определять содержание основных групп кумариновых соединений.

Таблица 1. Кумарины корневищ и корней *Phlojodicarpus sibiricus*

Исходный кумарин: производные (указано расположение заместителя)	Литература
Умбеллиферон: н.з., 7- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -Ari)-Glc (6'- <i>O</i> -апиозил скиммин)	[4, 6]
Пеucedанол: 7- <i>O</i> -Glc, 2'- <i>O</i> -Glc, 3'- <i>O</i> -Glc	[4]
Скополетин	[6]
Бергаптен	[4]
Ломатин: 3'- <i>O</i> -изовалерат	[4]
Келлактон: н.з., 4'- <i>O</i> -Me, 4'- <i>O</i> -Ac (кьянхукумарин С), 4'- <i>O</i> -iBu, 4'- <i>O</i> -iVal (тургениифолин В), 4'- <i>O</i> -mBu, 4'- <i>O</i> -Ang (d-лазерпитин), 3'- <i>O</i> -Ac-4'- <i>O</i> -iVal (суксдорфин), 3'- <i>O</i> -Ac-4'- <i>O</i> -iBu (хьюганин D), 3'- <i>O</i> -Ac-4'- <i>O</i> -Ang (птериксин), 3'- <i>O</i> -Ac-4'- <i>O</i> -mBu (хьюганин С), 3',4'-ди- <i>O</i> -Ac (кьянхукумарин D), 3'- <i>O</i> -iVal-4'- <i>O</i> -Ac (дигидросамидин), 3'- <i>O</i> -iVal-4'- <i>O</i> -mBu (прерупторин H), 3'- <i>O</i> -iVal-4'- <i>O</i> -Sen, 3'- <i>O</i> -iVal-4'- <i>O</i> -Ang, 3',4'-ди- <i>O</i> -iVal, 3'- <i>O</i> -mBu-4'- <i>O</i> -Ac (виснадин), 3'- <i>O</i> -mBu-4'- <i>O</i> -iBu, 3'- <i>O</i> -mBu-4'- <i>O</i> -iVal (прерупторин G), 3'- <i>O</i> -mBu-4'- <i>O</i> -Sen, 3'- <i>O</i> -mBu-4'- <i>O</i> -Ang, 3',4'-ди- <i>O</i> -mBu, 3',4'-ди- <i>O</i> -iBu, 3'- <i>O</i> -Sen-4'- <i>O</i> -iVal (пеуяпонизин), 3'- <i>O</i> -Sen-4'- <i>O</i> -mBu, 3',4'-ди- <i>O</i> -Sen, 3'- <i>O</i> -Ang-4'- <i>O</i> -iVal (прерупторин E), 3'- <i>O</i> -Ang-4'- <i>O</i> -mBu (хьюганин А), 3',4'-ди- <i>O</i> -Ang (аномалин), 3'- <i>O</i> -Glc (прерозид II)	[4, 7, 8]

Ac – ацетат, Ang – ангелат, Ari – апиоза, Glc – глюкоза, iBu – изобутират, iVal – изовалерат, Me – метил, mBu – метилбутират, Sen – сенечиат, н.з. – незамещенный.

Экспериментальная часть

Растительное сырье. Корневища и корни *P. sibiricus* были собраны в Забайкальском крае, Республике Бурятия и Республике Саха (Якутия). Видовая принадлежность определена д.фарм.н. Н.К. Чириковой. Образцы сырья хранятся в гербарии ИОЭБ СО РАН. В качестве одного образца использовали все подземные органы от одной особи, а в одну ботаническую повторность входили пять образцов. Все образцы были высушены в конвекционном шкафу при 45 °С до влажности 4–5%.

Общие экспериментальные условия. В работе использованы коммерческие образцы веществ сравнения от BioCrick Biotech Co., Ltd. (Chengdu, Sichuan, PRC) – *транс*-келлактон (№BCN6920, >98%), *цис*-келлактон (№BCN3703, >98%), ChemFaces (Wuhan, Hubei, PRC) – 6'-*O*-апиозил скиммин (№CFN90311, ≥98%), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA – виснадин (№SMB00087, ≥95%). Ломатин (≥93%) получен синтезом из сеселина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в результате энантиоселективного эпоксицирования в безводной среде [13].

ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС. Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA), соединенном с диодно-матричным детектором (ДМД) и 3Q-детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС; electrospray ionization, ESI), используя колонку GLC Mastro C18 (150×2.1 мм, Ø 3 мкм; Shimadzu, Kyoto, Japan). Условия ВЭЖХ: подвижная фаза, элюент А – вода, элюент В – ацетонитрил; программа градиента – 0–20 мин 2–80% В, 20–30 мин 80–100% В, 30–36 мин 100% В, 36–40 мин 100–2% В; инжектируемый объем – 1 мкл; скорость потока – 150 мкл/мин, температура колонки – 25 °С; диапазон сканирования спектров поглощения – 200–600 нм. Условия ИЭР-МС: режим ионизации – электрораспыление, положительная ионизация; температура интерфейса ИЭР – 300 °С; температура линии десольватации – 250 °С; температура нагревательного блока – 400 °С; скорость газа-распылителя (N₂) – 3 л/мин; скорость газа-нагревателя (воздух) – 10 л/мин; давление газа, используемого для диссоциации, индуцируемой соударением (CID gas, Ar) – 270 кПа; скорость Ar – 0.3 мл/мин; напряжение на капилляре – 3 кВ; диапазон сканирования масс (*m/z*) 100–1900. Критерием достоверности идентификации соединений было совпадение времени удерживания (отличие не более 1%), УФ спектров (совпадение >95%) и масс-спектров положительной и отрицательной ионизации (совпадение >95%) с таковых известных образцов веществ сравнения.

Щелочной гидролиз экстракта. Навеску экстракта (5 мг) смешивали с 1 мл среды (метанол, этанол, диоксан, ДМСО, вода), приливали 250 мкл 40% водного раствора КОН и инкубировали при нагревании (50–90 °С) в течение 30 мин–8 ч. Далее смесь нейтрализовали ледяной уксусной кислотой (250 мкл), приливали 1 мл ацетонитрила, перемешивали 30 сек, центрифугировали (6000 г_г, 15 мин) и анализировали методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС.

Щелочная экстракция растительного сырья (пробоподготовка образцов). Для осуществления качественного и количественного анализа кумаринов точную навеску измельченного растительного сырья (200 мг) помещали в емкость для экстракции (5 мл) с завинчивающейся крышкой, приливали 4 мл 10% водного

раствора КОН и экстрагировали в ультразвуковой ванне (100 Вт, 35 кГц) при 60 °С в течение 20 мин. Полученную пробу центрифугировали (3000 g, 15 мин) и супернатант переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл. Экстракцию повторяли в тех же условиях еще раз. Объем объединенного экстракта доводили до метки 10% КОН (раствор А). Далее 2 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл, приливали 1 мл ледяной уксусной кислоты, доводили объем раствора до метки ацетонитрилом и перемешивали (раствор В). Перед процедурой ВЭЖХ раствор В фильтровали через PTFE фильтр (0.22 мкм) и использовали для анализа без предварительного разбавления.

Щелочной гидролиз веществ сравнения. Навеску виснадина (2, 4, 6 мг) или 6''-О-апиозил скиммина (1, 2, 3 мг) смешивали с 4 мл 10% водного раствора КОН и инкубировали в ультразвуковой ванне (100 Вт, 35 кГц) при 60 °С в течение 20 мин. Далее смесь переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл, нейтрализовали 1 мл ледяной уксусной кислоты и доводили объем раствора до метки водой (раствор А). Перед процедурой ВЭЖХ раствор А фильтровали через PTFE фильтр (0.22 мкм) и использовали для анализа без предварительного разбавления.

Валидационный анализ осуществляли как описано ранее [14]. Для построения градуировочных графиков серию разведений *транс*-келлактона, *цис*-келлактона, ломатина и 6''-О-апиозил скиммина (1–500 мкг/мл) хроматографировали в описанных выше условиях трижды для каждой концентрации вещества. По полученным данным проводили построение градуировочного графика в координатах «концентрация, мкг/мл – площадь пика» и определяли вид уравнения линейной регрессии ($y = a \cdot x + b$), значения коэффициента детерминации (r^2) и стандартного отклонения (S_{YX}) с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.2 (Alentum Software, Inc., США). Предел детектирования (LOD) и предел количественного определения (LOQ) определяли по уравнениям: $LOD = (3.3 \cdot S_{YX})/a$ и $LOQ = (10 \cdot S_{YX})/a$, где S_{YX} – стандартное отклонение, a – коэффициент при x в уравнении линейной регрессии.

Обсуждение результатов

Известные сведения о кумаринах корневищ и корней *P. sibiricus* указывают на присутствие шести простых кумаринов производных умбеллиферона [4, 6], пеucedанола [4] и скополетина [6], фурукумарина бергаптена [4] и группы ангулярных дигидропиранокумаринов, среди которых эфир ломатина [4] и более 30 эфиров келлактона [4, 7, 8]. При разделении на обращено-фазовом сорбенте [4] упомянутые соединения распределяются по трем основным зонам, включая участки элюции кумариновых гликозидов (доминирующий компонент – 6''-О-апиозил скиммин), моноацилированных келлактонов и диацилированных келлактонов/моноацилированных ломатинов (доминирующие компоненты – виснадин, дигидросамидин) (рис. 1). В зависимости от индивидуальных особенностей анализируемого сырья на хроматограмме может одновременно находиться около 20–30 хроматографических пиков, что затрудняет задачу создания удобной методики количественного анализа ввиду необходимости применения большого числа веществ сравнения, основная часть из которых не являются коммерчески доступными. Ранние сведения о количественном составе фенольных соединений корневищ и корней *P. sibiricus* указывали на доминирование моно- и диацилированных эфиров келлактона [4], которые подвергаются дезацилированию в щелочной среде до незамещенного келлактона [15], что может значительно упростить состав анализируемых соединений и облегчить задачу количественной стандартизации.

При выборе оптимальных условий щелочного гидролиза были использованы известные условия дезацилирования эфиров келлактона с применением КОН в среде протонных (метанол, этанол) [16] и апротонных растворителей (диоксан, ДМСО) [17]. В результате было установлено, что использование 10% раствора КОН в среде спиртов при 50 °С и ультразвуковой обработки с рабочей частотой 50 кГц и мощностью 100 Вт приводило к полному гидролизу эфиров келлактона и ломатина в течение 40 мин. Анализ продуктов гидролиза указывал на образование смеси *транс*- и *цис*-келлактонов, что являлось следствием реакции типа S_N1 , протекающей по бензилэфирной группировке у С-4' келлактонов при их гидролизе или спиртовом сольволизе [15]. Также были обнаружены ломатин и смеси артефактов метил-келлактонов (среда – метанол) и этил-келлактонов (среда – этанол) (рис. 2, табл. 1). Ранее явление одновременной этерификации келлактонов при щелочном гидролизе в низкомолекулярных спиртах было описано для метанола [16] и этанола [17].

Гидролиз в среде апротонных растворителей не приводил к образованию артефактов, однако для полного дезацилирования эфиров келлактонов понадобилось от 5–8 ч при 50 °С до 3–5 ч при 80 °С. Для устранения недостатков, выявленных при применении органических растворителей, было предложено использование водного раствора КОН, который использовался ранее для гидролиза некоторых производных келлактона [18]. Ультразвуковая обработка растительного сырья при 60 °С в течение 20 мин в среде 10% КОН

приводила к полному гидролизу эфиров келлактона и ломатина. На итоговой хроматограмме были выявлены пики *транс*- и *цис*-келлактона, ломатина, а также 6''-*O*-апиозил скиммина, который является обычным компонентом корневищ и корней *P. sibiricus* [4], стабильным в щелочной среде (рис. 3А, В). Метанольный экстракт, полученный после двукратной обработки растительного сырья щелочным раствором, не содержал кумаринов (рис. 3С).

Обработка стандартных образцов виснадина и 6''-*O*-апиозил скиммина в указанных условиях приводила к количественному гидролизу виснадина до келлактонов и не влияла на 6''-*O*-апиозил скиммин (табл. 2). Открываемость суммы келлактонов после гидролиза дигидросамидина составила 98.89–100% от ожидаемой, а 6''-*O*-апиозил скиммина – 98.33–99%.

Метрологический анализ методики показал (табл. 3), что уравнения регрессии для четырех соединений характеризовались удовлетворительной линейностью с величиной коэффициентов корреляции 0.9907–0.9990 и стандартными отклонениями $1.17\text{--}12.72 \times 10^{-2}$. Пределы детектирования и количественного определения находились в диапазонах 0.01–0.29 и 0.04–0.89 мкг/мл соответственно, а диапазоны линейности составили 0.1–100.0 мкг/мл.

Отсутствие необходимости анализа липофильной части гидролизата позволило сократить время хроматографической процедуры до 14 мин, что с 2-минутным этапом регенерации составило 16 мин. Общая длительность анализа одного образца не превышала 1 ч, что значительно быстрее, чем в ранее предложенной методике (3.5 ч) [9].

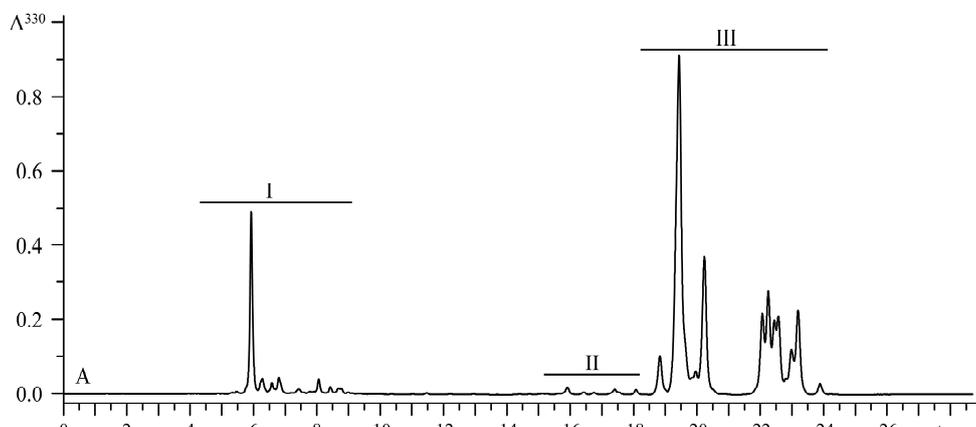


Рис. 1. Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД, λ 330 нм) этанольного экстракта корневищ и корней *P. sibiricus*. Отмечены зоны элюции кумариновых соединений согласно [4]: I – зона гликозидов кумаринов, II – зона моноацилированных келлактонов, III – зона диаацилированных келлактонов и моноацилированных ломатинов

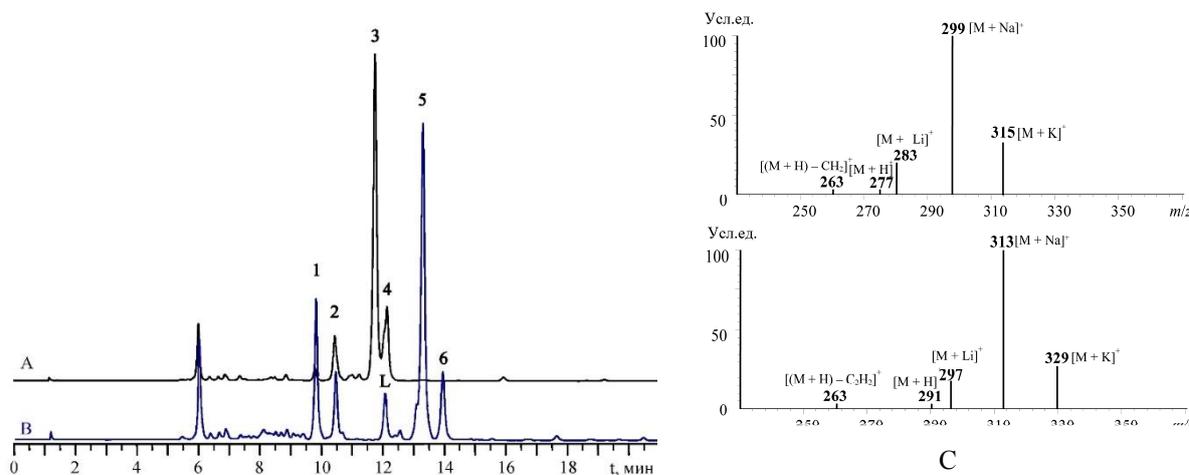


Рис. 2. Хроматограммы (ВЭЖХ-ДМД, λ 330 нм) экстракта корневищ и корней *P. sibiricus*, после щелочного гидролиза (10% КОН) в среде метанола (А) и этанола (В). Положение соединений обозначено как 1 – *транс*-келлактон, 2 – *цис*-келлактон, 3/4 – метил-келлактоны, 5/6 – этил-келлактоны, L – ломатин. На С – масс-спектры соединений 3 и 5

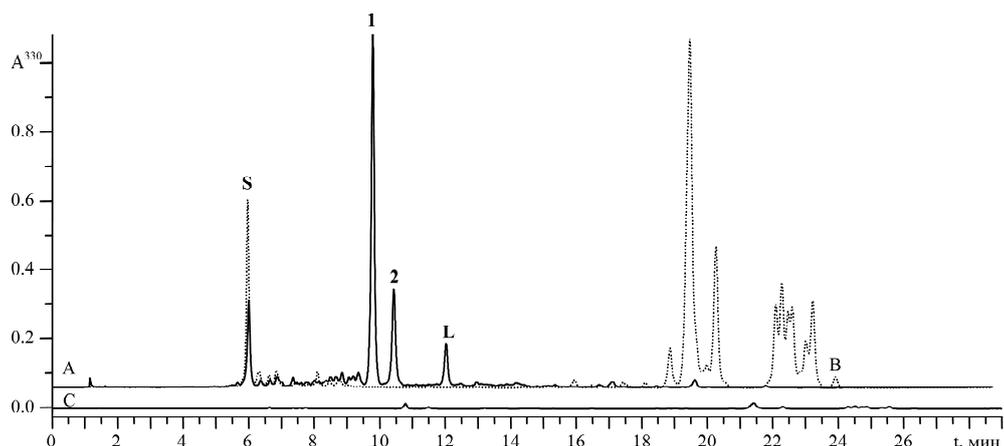


Рис. 3. Хроматограммы (ВЭЖХ-ДМД, λ 330 нм) водно-щелочного (А) и метанольных экстрактов корневищ и корней *P. sibiricus* (В – без щелочного гидролиза, С – после двух экстракций 10% КОН). Положение продуктов гидролиза обозначено как 1 – транс-келлактон, 2 – цис-келлактон, L – ломатин, S – 6''-О-апиозил скиммин

Таблица 2. Результаты гидролиза виснадина и 6''-О-апиозил скиммина в среде 10% водного раствора КОН при 60 °С в течение 30 мин

Исходная навеска виснадина, мг	Ожидается суммы келлактонов, мг	Найдено суммы келлактонов, мг	% от исходного
2.00	1.35	1.34; 1.35; 1.35	99.26; 100; 100
4.00	2.70	2.67; 2.67; 2.69	98.89; 98.89; 99.63
6.00	4.05	4.01; 4.02; 4.04	99.01; 99.26; 99.75
Исходная навеска 6''-О-апиозил скиммина, мг	Ожидается 6''-О-апиозил скиммина, мг	Найдено 6''-О-апиозил скиммина, мг	% от исходного
1.00	1.00	0.98; 0.98; 0.98	98.00; 98.00; 99.00
2.00	2.00	1.97; 1.98; 1.98	98.50; 99.00; 99.00
3.00	3.00	2.95; 2.96; 2.99	98.33; 98.67; 99.67

Анализ дикорастущих образцов корневищ и корней *P. sibiricus*, собранных в трех регионах РФ показал, что суммарное содержание кумаринов варьировало в зависимости от времени сбора: в Забайкальском крае 20.87–74.03 мг/г, в Республике Бурятия – 12.70–60.03 мг/г, в Республике Саха (Якутия) – 30.56–67.78 мг/г (табл. 4).

Наименьшая концентрация кумаринов была выявлена в образцах корней летнего сбора, а наибольшая – в сырье, собранном в сентябре, что характерно для видов *Araliaceae* [19] и указывало на оптимальный срок сбора корней данного вида в осенний период вегетации. На долю келлактонов и 6''-О-апиозил скиммина приходилось 54.6–82.1% и 10.0–41.7% от общего содержания кумаринов в корневищах и корнях *P. sibiricus* соответственно. Согласно фармакопейной статье «Корневища и корни вздутоплодника сибирского» (ФС 42-2667-89), содержание суммы виснадина и дигидросамидина в сырье должно быть не менее 3% [20], поэтому сырье, произрастающее в Восточной Сибири, соответствовало предъявляемому регламенту. Сравнительный анализ результатов определения суммы кумаринов методом ВЭЖХ и суммы виснадина и дигидросамидина методом газовой хроматографии [9] указывал на то, что разработанная методика позволяет учесть на 47.9–76.8% больше кумаринов от показателей известной методики (табл. 4).

Проведенные исследования показали, что применение щелочного гидролиза позволяет облегчить задачу количественной стандартизации растительного сырья со сложным химическим составом, каковым являются корневища и корни *P. sibiricus*. В настоящее время гидролиз растительного сырья с целью упрощения состава суммарного извлечения применяется в фармакопейном анализе РФ для количественной оценки содержания тритерпеноидов в *Aralia elata* (Miq.) Seem. и *Glycyrrhiza glabra* L., инулина в *Inula helenium* L., антраценов в *Rubia tinctorum* L. и *Senna alexandrina* Mill. [21]. Разработанная методика позволяет точно и быстро определить содержание кумаринов в корневищах и корнях *P. sibiricus* и может быть использована в практической фармации для определения качества растительного сырья.

Таблица 3. Уравнения регрессии, коэффициенты корреляции (r^2), стандартные отклонения (S_{yx}), пределы детектирования (LOD) и количественного определения (LOQ) и диапазоны линейности для четырех веществ сравнения

Соединение	Уравнение регрессии*		r^2	S_{yx}	LOD/LOQ, мкг/мл	Диапазон линейности, мкг/мл
	a	b				
транс-Келлактон	2.0859	-0.9171	0.9980	$6.18 \cdot 10^{-2}$	0.03/0.09	0.1–100.0
цис-Келлактон	2.6538	-0.1376	0.9990	$1.17 \cdot 10^{-2}$	0.01/0.04	0.1–100.0
Ломатин	1.9634	-0.4511	0.9952	$9.18 \cdot 10^{-2}$	0.15/0.46	0.5–100.0
6"-О-Апиозил скиммин	1.4267	-0.5637	0.9907	$12.72 \cdot 10^{-2}$	0.29/0.89	0.9–100.0

* Уравнение регрессии: $y = a \cdot x + b$.

Таблица 4. Содержание суммы келлактонов (ΣK), ломатина (Л), 6"-О-апиозил скиммина (АС) и суммы кумаринов методом ВЭЖХ ($\Sigma K_{умI}$) и суммы виснадина и дигидросамидина методом [9] ($\Sigma K_{умII}$) в корневищах и корнях *P. sibiricus*, мг/г воздушно-сухого сырья \pm S.D.

Место и год сбора	Дата сбора	ΣK	Л	АС	$\Sigma K_{умI}$	$\Sigma K_{умII}$
Забайкальский край, п. Первомайский, Шилкинский район, 2021	16.VII	15.63 \pm 0.31	0.97 \pm 0.02	4.27 \pm 0.08	20.87	7.24 \pm 0.21
	20.VIII	47.99 \pm 0.95	4.60 \pm 0.09	5.87 \pm 0.12	58.46	24.44 \pm 0.73
	16.IX	57.89 \pm 1.18	5.61 \pm 0.11	10.53 \pm 0.22	74.03	34.16 \pm 1.02
Республика Бурятия, с. Турка, Прибайкальский район, 2020	5.VI	7.04 \pm 0.15	0.37 \pm 0.01	5.29 \pm 0.10	12.70	2.95 \pm 0.10
	12.VII	11.12 \pm 0.23	1.64 \pm 0.03	7.60 \pm 0.15	20.36	5.32 \pm 0.16
	8.VIII	28.55 \pm 0.59	1.93 \pm 0.03	10.67 \pm 0.21	41.15	15.99 \pm 0.49
	11.IX	43.48 \pm 0.89	3.82 \pm 0.07	12.73 \pm 0.25	60.03	31.25 \pm 0.93
Республика Саха (Якутия), Алданский район, 2018	4.VII	20.66 \pm 0.42	0.28 \pm 0.00	9.62 \pm 0.17	30.56	8.89 \pm 0.27
	10.VIII	35.00 \pm 0.73	0.53 \pm 0.01	10.84 \pm 0.21	46.37	19.63 \pm 0.59
	4.IX	51.57 \pm 1.04	1.75 \pm 0.03	14.46 \pm 0.29	67.78	33.18 \pm 1.02

Выводы

1. Разработана методика количественного анализа кумаринов в корневищах и корнях *P. sibiricus*, включающая предварительный щелочной гидролиз и последующий анализ образовавшихся келлактонов, ломатина, 6"-О-апиозил скиммина методом ВЭЖХ и характеризующаяся удовлетворительными метрологическими параметрами.

2. Методика позволяет сократить число определяемых аналитов с 20–30 до четырех, что значительно упрощает процедуру стандартизации и сокращает время анализа растительного сырья.

3. Установлено, что суммарное содержание кумаринов в корневищах и корнях *P. sibiricus* может варьировать от 12.70 до 74.03 мг/г в зависимости от места и времени сбора сырья.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научных проектов № FWSM-2021-0005 (№121030100227-7), FSRG-2023-0027.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

- Venugopala K.N., Rashmi V., Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity // Biomed. Res. Int. 2013. Vol. 2013. 963248. DOI: 10.1155/2013/963248.
- Teng L., Guo X., Ma Y., Xu L., Wei J., Xiao P. A comprehensive review on traditional and modern research of the genus *Bupleurum* (*Bupleurum* L., Apiaceae) in recent 10 years // J. Ethnopharmacol. 2023. Vol. 306. 116129. DOI: 10.1016/j.jep.2022.116129.
- Onder A., Nahar L., Cinar A.S., Sarker S.D. The genus *Seseli* L.: A comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties // J. Herb. Med. 2023. Vol. 38. 100625. DOI: 10.1016/j.hermed.2023.100625.
- Olenikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C. Khellactone derivatives and other phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV profile, and antiobesity potential of dihydrosamidin // Molecules. 2019. Vol. 24. 2286. DOI: 10.3390/molecules24122286.
- Sarker S., Nahar L. Natural medicine: The genus *Angelica* // Curr. Med. Chem. 2004. Vol. 11. Pp. 1479–1500. DOI: 10.2174/0929867043365189

6. Antonova O.K., Shemeryankin B.V. Coumarins of the roots of *Phlojodicarpus sibiricus* // Chem. Nat. Comp. 1982. Vol. 17. Pp. 588–588. DOI: 10.1007/BF00574388.
7. Nikonov G.K., Vandyshev V.V. Visnadin – A new component of the plant genus *Phlojodicarpus* // Chem. Nat. Comp. 1969. Vol. 5. Pp. 101–102. DOI: 10.1007/BF00633290.
8. Gantimur D., Syrchina A.I., Semenov A.A. Khellactone derivatives from *Phlojodicarpus sibiricus* // Chem. Nat. Comp. 1986. Vol. 22. Pp. 103–104. DOI: 10.1007/BF00574597.
9. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск, 1990. 333 с.
10. Mazimba O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review // Bull. Faculty Pharm. 2017. Vol. 55. Pp. 223–232. DOI: 10.1016/j.bfopcu.2017.05.001.
11. Antika L.D., Tasfiyati A.N., Hikmat H., Septama A.W. Scopoletin: a review of its source, biosynthesis, methods of extraction, and pharmacological activities // Z. Naturforsch. C. 2022. Vol. 77. Pp. 303–316. DOI: 10.1515/znc-2021-0193.
12. Sarkhail P., Shafiee A., Sarkheil P. Biological activities and pharmacokinetics of praeruptorins from *Peucedanum* species: A systematic review // BioMed Res. Int. 2013. Vol. 2013. 343808. DOI: 10.1155/2013/343808.
13. Page P.C.B., Appleby L.F., Day D., Chan Y., Buckley B.R., Allin S.M., McKenzie M.J. Highly enantioselective total synthesis of (–)-(3'S)-lomatin and (+)-(3'S,4'R)-*trans*-khellactone // Org. Lett. 2009. Vol. 11. Pp. 1991–1993. DOI: 10.1021/ol900444h.
14. Olennikov D.N. Coumarins of lovage roots (*Levisticum officinale* W.D.J.Koch): LC-MS profile, quantification, and stability during postharvest storage // Metabolites. 2023. Vol. 13. Article 3. DOI: 10.3390/metabo13010003.
15. Smith E., Hosansky N., Bywater W.G., van Tamelen E.E. Constitution of samidin, dihydrosamidin and visnadin // J. Am. Chem. Soc. 1957. Vol. 79. Pp. 3534–3540. DOI: 10.1021/ja01570a062.
16. Schroeder H.D., Bencze W., Halpern O., Schmid H. Struktur der visnagine; Synthese von (±)-*trans*-Samidin // Chem. Ber. 1959. Vol. 92. Pp. 2338–2363. DOI: 10.1002/cber.19590920952.
17. Willette R.E., Soine T.O. Coumarins I: Isolation, purification, and structure determination of pteryxin and suksdorfina // J. Pharm. Sci. 1962. Vol. 51. Pp. 149–156. DOI: 10.1002/jps.2600510215.
18. Ikeshiro Y., Mase I., Tomita Y. Dihydropyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum* // Phytochemistry. 1992. Vol. 31. Pp. 4303–4306. DOI: 10.1016/0031-9422(92)80463-o.
19. Carbonnier J., Molho D. Variations saisonnières des quantités totales de coumarines de la racine d' *Heracleum lehmannianum* Bge (Umbelliferae) // Bull. Mus. Nat. Hist. Nat. 1978. Vol. 522. Pp. 13–16.
20. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. 2-е изд., испр. и доп. СПб., 2009. 863 с.
21. Государственная фармакопея РФ XIV изд. М., 2018. Т. 4. С. 5834–6675.

Поступила в редакцию 27 февраля 2023 г.

После переработки 29 марта 2023 г.

Принята к публикации 6 сентября 2023 г.

Olennikov D.N.^{1*}, Chirikova N.K.² QUANTITATIVE ANALYSIS OF KHELLACTONE AND OTHER COUMARINS IN *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* (APIACEAE)

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, Sakh'yanovoy st., 6, Ulan-Ude, 670047, Russia, e-mail: olennikovdn@mail.ru

² North-Eastern Federal University, Belinskogo st., 58, Yakutsk, 677027, Russia

Phlojodicarpus sibiricus (Fisch.) Koso-Pol. is a medicinal plant of the Apiaceae family, the underground organs of which accumulate various groups of coumarins, including simple coumarins, furocoumarins and angular dihydropyranocoumarins in the form of esters of khellactone (3',4'-dihydroxy-3',4'-dihydroxyseselin), which are the dominant group of secondary metabolites. Known methods for the analysis of rhizomes and roots of *P. sibiricus* determine the content of individual compounds (visnadin, dihydrosamidin), which does not allow obtaining complete information about the presence of coumarin compounds in the plant. In the present study, a method of quantitative analysis of coumarins was developed. It includes preliminary hydrolysis of raw materials in aqueous potassium hydroxide, which leads to deacylation of esterified derivatives of khellactone and lomatin, without affecting glycosides of simple coumarins, followed by analysis of hydrolysis products (sum of khellactones, lomatin) and 6'-*O*-apiosyl skimming by HPLC. The developed technique is characterized by high analysis speed, satisfactory validation characteristics, and accuracy. Approbation of the technique was carried out on samples of rhizomes and roots of *P. sibiricus* collected in three regions of Siberia (Zabaikalsky Krai, Buryatia Republic, Sakha (Yakutia) Republic). The total content of coumarins in plant materials from the studied populations was 12.70–74.03 mg/g. The method can be used for quality analysis and standardization of *P. sibiricus* rhizomes and roots.

Keywords: *Phlojodicarpus sibiricus*, Apiaceae, angular dihydropyranocoumarins, khellactone, HPLC, quantitative analysis.

For citing: Olennikov D.N., Chirikova N.K. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 1, pp. 124–131. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240112591.

* Corresponding author.

References

1. Venugopala K.N., Rashmi V., Odhav B. *Biomed. Res. Int.*, 2013, vol. 2013, 963248. DOI: 10.1155/2013/963248.
2. Teng L., Guo X., Ma Y., Xu L., Wei J., Xiao P. *J. Ethnopharmacol.*, 2023, vol. 306, 116129. DOI: 10.1016/j.jep.2022.116129.
3. Onder A., Nahar L., Cinar A.S., Sarker S.D. *J. Herb. Med.*, 2023, vol. 38, 100625. DOI: 10.1016/j.hermed.2023.100625.
4. Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C. *Molecules*, 2019, vol. 24, 2286. DOI: 10.3390/molecules24122286.
5. Sarker S., Nahar L. *Curr. Med. Chem.*, 2004, vol. 11, pp. 1479–1500. DOI: 10.2174/0929867043365189
6. Antonova O.K., Shemeryankin B.V. *Chem. Nat. Comp.*, 1982, vol. 17, pp. 588–588. DOI: 10.1007/BF00574388.
7. Nikonov G.K., Vandyshev V.V. *Chem. Nat. Comp.*, 1969, vol. 5, pp. 101–102. DOI: 10.1007/BF00633290.
8. Gantimur D., Syrchina A.I., Semenov A.A. *Chem. Nat. Comp.*, 1986, vol. 22, pp. 103–104. DOI: 10.1007/BF00574597.
9. Georgiyevskiy V.P., Komissarenko N.F., Dmitruk S.Ye. *Biologicheski aktivnyye veshchestva lekarstvennykh rasteniy*. [Biologically active substances of medicinal plants]. Novosibirsk, 1990, 333 p. (in Russ.).
10. Mazimba O. *Bull. Faculty Pharm.*, 2017, vol. 55, pp. 223–232. DOI: 10.1016/j.bfopcu.2017.05.001.
11. Antika L.D., Tasfiyati A.N., Hikmat H., Septama A.W. *Z. Naturforsch. C*, 2022, vol. 77, pp. 303–316. DOI: 10.1515/znc-2021-0193.
12. Sarkhail P., Shafiee A., Sarkheil P. *BioMed Res. Int.*, 2013, vol. 2013, 343808. DOI: 10.1155/2013/343808.
13. Page P.C.B., Appleby L.F., Day D., Chan Y., Buckley B.R., Allin S.M., McKenzie M.J. *Org. Lett.*, 2009, vol. 11, pp. 1991–1993. DOI: 10.1021/ol900444h.
14. Olennikov D.N. *Metabolites*, 2023, vol. 13, article 3. DOI: 10.3390/metabo13010003.
15. Smith E., Hosansky N., Bywater W.G., van Tamelen E.E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, vol. 79, pp. 3534–3540. DOI: 10.1021/ja01570a062.
16. Schroeder H.D., Bencze W., Halpern O., Schmid H. *Chem. Ber.*, 1959, vol. 92, pp. 2338–2363. DOI: 10.1002/cber.19590920952.
17. Willette R.E., Soine T.O. *J. Pharm. Sci.*, 1962, vol. 51, pp. 149–156. DOI: 10.1002/jps.2600510215.
18. Ikeshiro Y., Mase I., Tomita Y. *Phytochemistry*, 1992, vol. 31, pp. 4303–4306. DOI: 10.1016/0031-9422(92)80463-o.
19. Carbonnier J., Molho D. *Bull. Mus. Nat. Hist. Nat.*, 1978, vol. 522, pp. 13–16.
20. *Farmakognosiya. Lekarstvennoye syr'ye rastitel'nogo i zhivotnogo proiskhozhdeniya*. [Pharmacognosy. Medicinal raw materials of plant and animal origin]. St. Petersburg, 2009, 863 p. (in Russ.).
21. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition]. Moscow, 2018, vol. 4, pp. 5834–6675. (in Russ.).

Received February 27, 2023

Revised March 29, 2023

Accepted September 6, 2023

Сведения об авторах

Оленников Даниил Николаевич – доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией медико-биологических исследований, olennikovdn@mail.ru

Чирикова Надежда Константиновна – доктор фармацевтических наук, профессор биологического отделения ИЕН, hofnung@mail.ru

Information about authors

Olennikov Daniil Nikolaevich – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Head of the Laboratory of Biomedical Research, olennikovdn@mail.ru

Chirikova Nadezhda Konstantinovna – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor of the Biological Department of the Institute of Natural Sciences, hofnung@mail.ru