

ЭФИРОМАСЛИЧНЫЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ

УДК: 543.429.23

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТАХ
ДУДНИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*ANGELICA ARCHANGELICA* L.) МЕТОДОМ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР****Анжелика Валерьевна Шеремета, Василий Геннадьевич Васильев,
Василий Александрович Ивлев, Анастасия Анвяровна Муртазина**

Российский университет дружбы народов
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
E-mail: anzhelika.sheremeta@mail.ru

В современном фармакопейном анализе растёт спрос на высокоточные качественные и количественные данные о растительном сырье, используемом в производстве лекарственных средств, главным образом из-за строгого контроля качества и стандартов безопасности. Кроме того, сырье одного и того же вида может существенно различаться по составу вторичных метаболитов. В настоящее время в области фитохимического анализа для качественного и количественного определения веществ обычно используется традиционная высокоэффективная жидкостная хроматография с различными вариантами детекции или спектрофотометрия в видимом и ультрафиолетовом диапазоне. Однако большинство из этих методов имеют существенные недостатки, такие как длительное время пробоподготовки и необходимость в аутентичных стандартных образцах [1, 2]. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) лишена этих недостатков и поэтому представляется перспективным методом для идентификации и количественного определения биологически активных веществ растительного происхождения. В данной работе был проведён целевой метаболомный анализ экстракта дудника лекарственного (*Angelica archangelica* L.) методом спектроскопии ЯМР, в результате которого было обнаружено и количественно определено 23 метаболита в водном экстракте, а также проведены предварительные исследования для разработки методики идентификации и количественного определения остола в экстракте из корней дудника лекарственного в ДМСО- d_6 методом спектроскопии ЯМР 1H .

Ключевые слова: остол; метаболомный анализ; количественная ЯМР-спектроскопия; кумариновые производные; лекарственное растительное сырьё

Введение

Angelica archangelica L., является одним из наиболее важных представителей рода Дудник. Лекарственное и ароматическое растение используется как в лечебных целях, так и в пищевой отрасли. Его высушенный корень и эфирное масло используются для производства ликеров, парфюмерии и экстрактов специй. В сырье также присутствуют флавоноиды, органические кислоты, стероиды, сапонины, алкалоиды, простые сахара и жиры. Оно может эффективно регулировать работу пищеварительной системы, стимулировать иммунитет и повышать сопротивляемость нервной системы при тревожности и слабоумии. Ввиду высокой востребованности сырья на основе Дудника лекарственного, необходимы быстрые и надежные методики подтверждения его подлинности. Такие методики могут быть основаны на экспрессном, высокоточном, высокочувствительном, не требующем аутентичных стандартных образцов методе спектроскопии ЯМР [1, 2, 3].

Объекты и методы исследований

В работе были исследованы измельченные корни и листья дудника лекарственного трех различных производителей. Образцы были приобретены в интернет-магазинах. Эксперименты проводили на спектрометрах ЯМР: JNM ECA-600

(JEOL, Япония) с рабочей частотой для протонов 600 МГц и Avance NEO 700 (Bruker, Швейцария) с рабочей частотой для протонов 700 МГц, оборудованный криодатчиком Prodigy. Для проведения анализа были использованы такие растворители и стандартные образцы как: диметилсульфоксид-d₆ ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, номер CAS № 2206-27-1) и диметилсульфон (CAS № 67-71-0). Пострегистрационная обработка спектров проводилась в программном обеспечении Delta IV (JEOL, Япония), Topspin 4.0 (Bruker, Швейцария), MestReNova (MestRe, Испания), Chenomx (Chenomx, Канада). Настройка фазы и базовой линии проводилась вручную. Статистический анализ полученных количественных результатов проводился с использованием Microsoft Office Excel 2016 и представлен, как среднее значение трех измерений $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для оценки возможностей программного обеспечения Chenomx в определении метаболитов в растительном сырье образцы корней и корневищ дудника лекарственного растворялись в заранее приготовленном буферном растворе (0,1 мМ DSS, 2 мМ NaN₃, 150 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,07 в D₂O).

Результаты и обсуждение

В спектре ЯМР ¹H дудника лекарственного в ДМСО-d₆ наблюдается большое количество сигналов как в области проявления сигналов углеводов (3.0-5.5 м.д.) и алифатических протонов (0.5-2.0 м.д.), так и сигналов ароматических протонов (6.0 – 8.5 м.д.) (рис. 1).

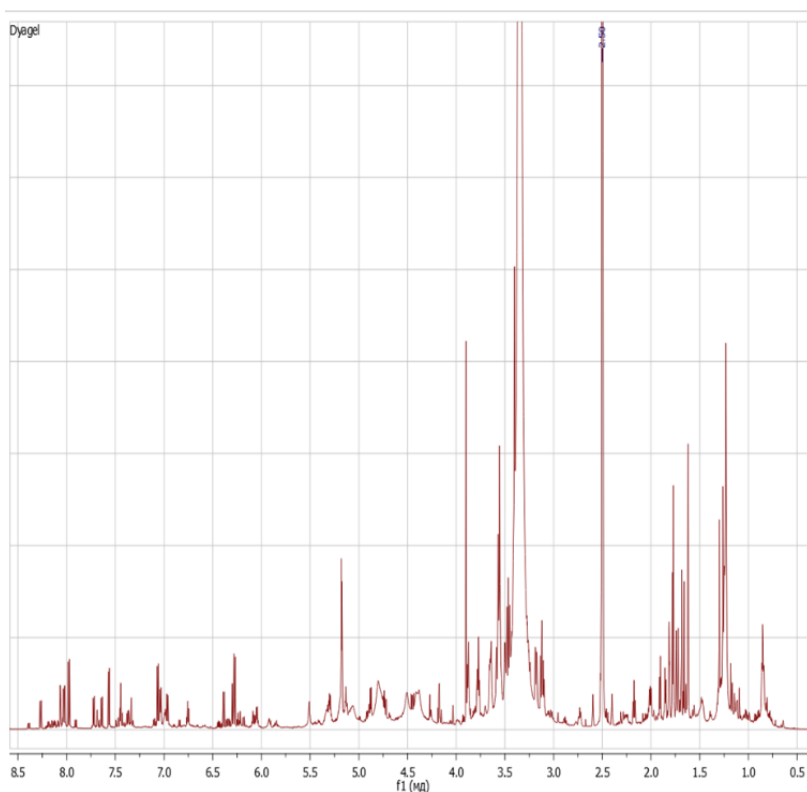


Рис. 1 Спектр ЯМР ¹H экстракта дудника лекарственного в ДМСО-d₆ (2.5 м.д.)

Большой интерес с точки зрения идентификации представляет область проявления ароматических протонов (рис. 2), поскольку в этой области наблюдается большое количество дублетных сигналов.

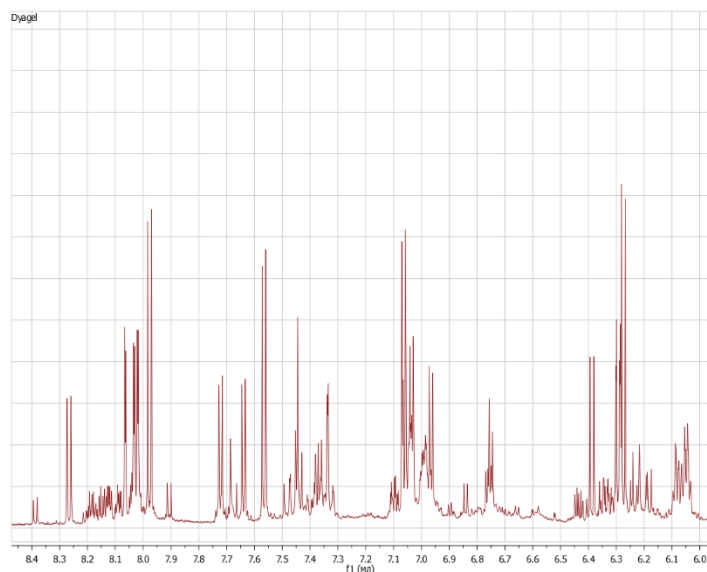


Рис. 2 Спектр ЯМР ^1H экстракта дудника лекарственного в ДМСО- d_6 в области 6.0 – 8.5 м.д.

Большинство из этих сигналов относятся к протонам кумариновых производных, которые являются основными биологически активными веществами дудника лекарственного, поскольку преимущественно в них возможно наблюдать дублетные сигналы с разными константами спин-спинового взаимодействия в этой области. Перечень основных кумариновых производных, которые содержатся в дуднике лекарственном согласно литературным источникам, приведён в таблице 1.

Таблица 1

Содержание кумариновых соединений в дуднике лекарственном

Часть растения	Корень					Плоды								
	[4]	[8]	[5]	[16]	[11]	[15]	[13]	[4]	[7]	[10]	[6]	[9]	[8]	[14]
Остенол	+		+	+				+				0.31		
Умбеллипренин	+							+						
Умбеллиферон	+		+			+		+						
Остол	+	+	+	+		+		+						
Скополетин					+							0.01	+	
Архангелицин	+	+		+				+		+				
Бергаптен	+	+	+	+	+	0.33	+	+	0.29	+	0.16–0.56	0.59	+	0.06–0.40
Императорин	+	+	+	+	+	1.31	+	+	2.44	+	0.96–2.57	2.33	+	0.58–1.55
Изоимператорин	+	+	+	+			+	+		+		0.04	+	0.03–0.62
Изоимпинеллин	+	+	+	+		0.12	+	+					+	
Окспейседанин	+	+	+	+				+				0.13	+	0.00–0.64
Гидрат окспейседанина	+	+	+	+				+						
Ксантотоксин	+	+	+	+	+	0.13		+	0.25	+	0.09–0.51	0.08	+	0.06–0.36
Ксантотоксол			+									0.01		
Острутол	+	+	+					+					+	
Псорален		+	+									0.30		
Феллоптерин		+	+	+		0.66	+			+				0.11–0.75
Бьякангелицин		+		+	+									

Примечание: * + – обнаружено; цифра – определено количественно в %.

Для оценки возможности определения остола в экстракте, был зарегистрирован его спектр ЯМР ^1H . Сравнение спектров ЯМР ^1H индивидуального остола и экстракта дудника лекарственного в DMSO-d_6 показывает наличие этого биологически активного соединения в экстракте дудника лекарственного, поскольку все сигналы протонов индивидуального остола наблюдаются в спектре экстракта корней и корневищ дудника лекарственного (рис. 3).



Рис. 3 Стек спектров ЯМР ^1H : 1 – индивидуального остола; 2 – экстракта дудника лекарственного в DMSO-d_6

Также присутствие остола в экстракте дудника лекарственного подтверждали двумерной спектроскопией ЯМР ^1H - ^1H COSY (рис. 4), где наблюдаются кросс-пики сигналов при 7.97 и 6.27 м.д., которые относятся к протонам Н-4 и Н-3, соответственно. Также наблюдаются кросс-пики сигналов при 7.56 и 7.04 м.д., которые относятся к Н-5 и Н-6, соответственно.

Это показывает, что протоны сигналов при 7.97 и 6.27 м.д. имеют спин-спиновое взаимодействие между собой. То же самое можно сказать и про пару сигналов 7.56 и 7.04 м.д.

Количественное определение целевого анализата в спектроскопии ЯМР основывается на сравнении его сигнала с сигналом сравнения. Для этих целей, хотя бы один сигнал целевого анализата не должен перекрываться с другими сигналами в спектре.

В качестве сигнала сравнения нами был выбран сигнал остаточных протонов растворителя DMSO-d_6 , поскольку он уже был выбран в качестве растворителя, а также, так как его сигнал не перекрывается с другими сигналами. Калибровку количества вещества остаточных протонов растворителя проводили относительно внутреннего стандарта диметилсульфона.

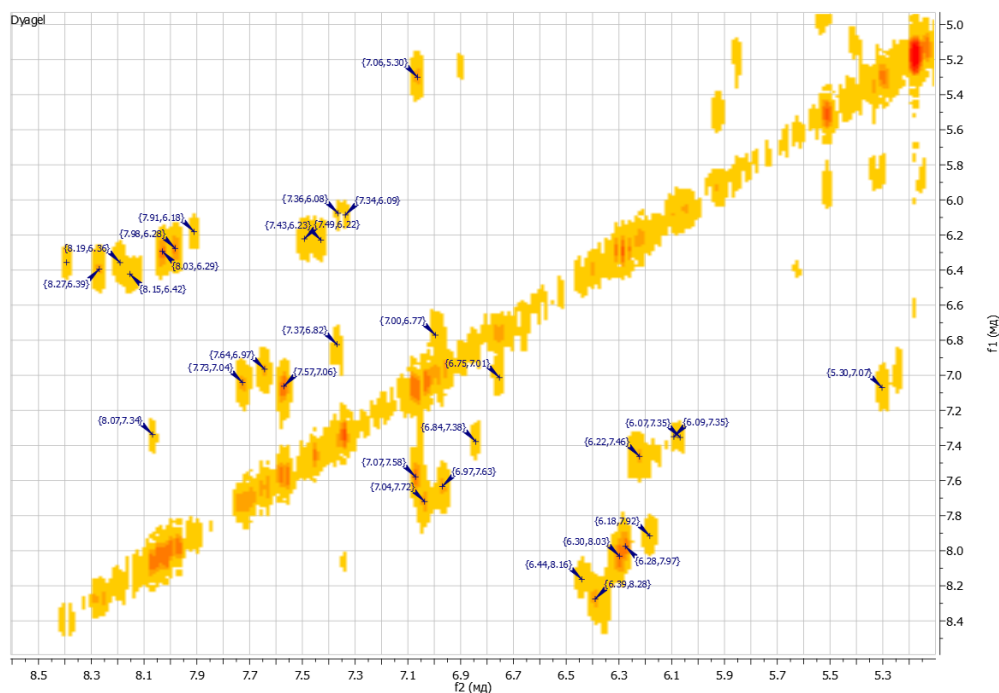


Рис. 4 Спектр ЯМР¹H, ¹H COSY экстракта дудника лекарственного в ДМСО-d₆

Для апробации методики количественного определения остола в дуднике лекарственном нами были выбраны два образца корней и корневищ, а также один образец надземной части.

Для количественного определения остола в экстрактах дудника лекарственного выбран сигнал при 7.53 м.д. ($J = 8.6$ Гц), поскольку он не перекрывается с другими сигналами в этой области. Количественное определение остола проводилось путем сравнения этого сигнала с сигналом остаточных протонов растворителя ДМСО-d₆. Результаты количественного определения остола в корнях и корневищах, а также надземной части дудника лекарственного представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты количественного определения остола в экстрактах из корней и корневищ, а также надземной части дудника лекарственного методом спектроскопии ЯМР

Наименование образца	Содержание, % от навески*
Образец 1 (корни и корневища)	0,39±0,02
Образец 2 (корни и корневища)	0,42±0,01
Образец 2 (надземная часть)	-

Результаты представлены как среднее значение 3 измерений $\pm$ стандартное отклонение (SD). Как показано в таблице 2 содержание остола в корнях и корневищах дудника лекарственного практически идентично и составило для образца 1 и образца 2: 0,39±0,02 и 0,42±0,01, соответственно.

Однако, остол не был обнаружен в надземной части дудника лекарственного. Это указывает на то, что содержание остола в экстракте из надземной части растения ниже предела его обнаружения методом спектроскопии ЯМР ¹H.

Кроме того, профиль спектра ЯМР ¹H надземной части кардинально отличается от профиля спектров ЯМР ¹H корней и корневищ дудника лекарственного (рис. 5).

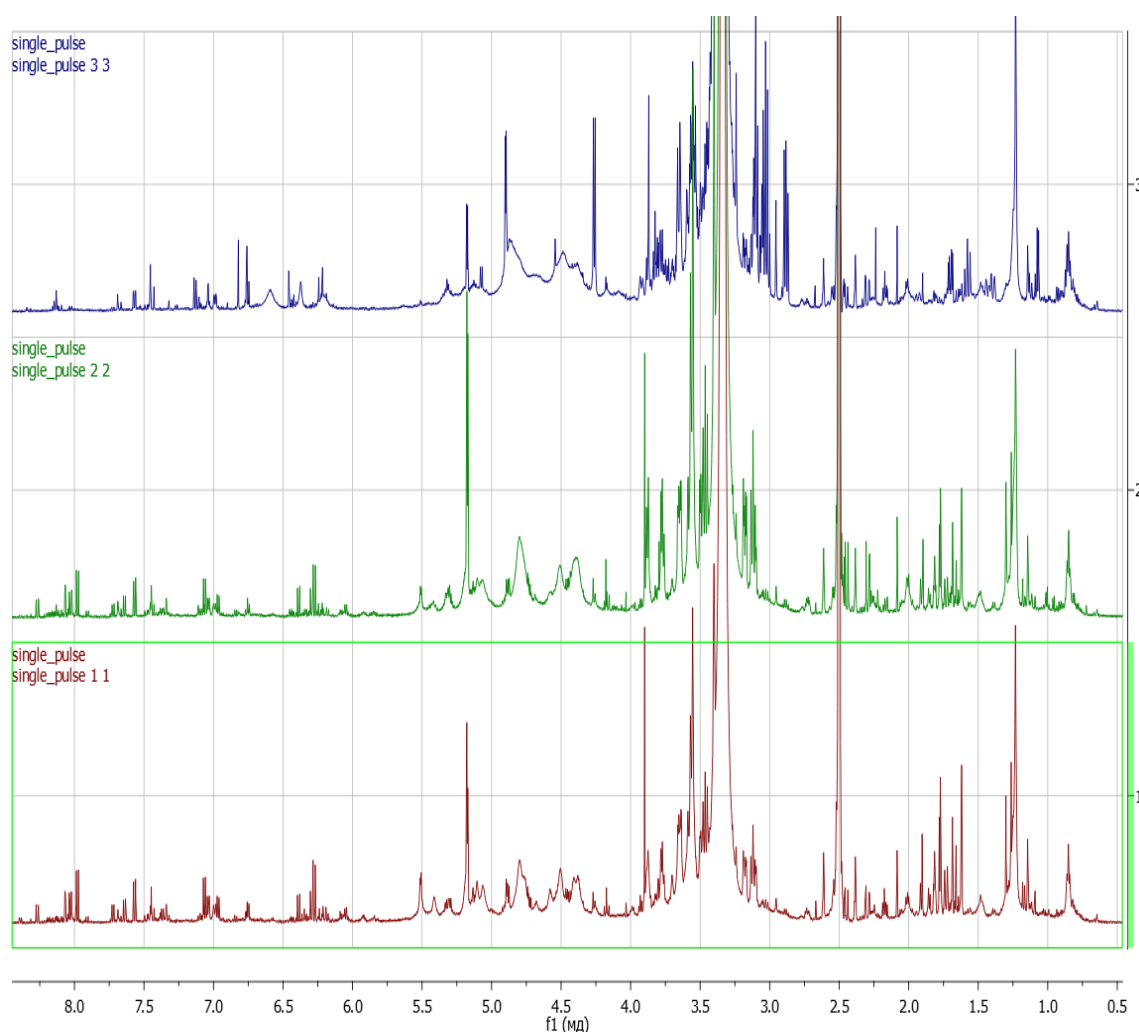


Рис. 5 Стек спектров ЯМР ^1H в DMSO-d_6 : 1 – образца №1 (корни и корневища); 2 – образца №2 (корни и корневища); 3 – образца №3 (надземная часть)

Для определения других биологически активных веществ в экстракте корней и корневищ дудника лекарственного нами был использован подход метаболомного профилирования с использованием программного обеспечения (ПО) Chenomx. Поскольку данное ПО используется преимущественно к объектам животного происхождения, то нами была поставлена цель – оценить возможности его использования относительно экстрактов растительного происхождения на примере дудника лекарственного.

Для этих целей был зарегистрирован спектр ЯМР ^1H водного экстракта корней и корневищ дудника лекарственного в буферном растворе.

В таблице 3 представлены метаболиты, которые возможно определить с использованием ПО Chenomx.

Таблица 3

Описание химических соединений для метаболомного исследования

Химическое соединение	Концентрация (mM)
Фруктоза	$2,7098 \pm 0,1$
Глюкоза	$2,6223 \pm 0,1$
Малат	$0,6591 \pm 0,02$
Ацетон	$0,3971 \pm 0,02$
Аспартат	$0,3402 \pm 0,02$
Ацетат	$0,3113 \pm 0,01$

Продолжение таблицы 3	
Формиат	0,2605 ± 0,02
Галактоза	0,1904 ± 0,01
Глутамат	0,183 ± 0,01
Этанол	0,172 ± 0,01
4-Аминобутират	0,1274 ± 0,01
Треонин	0,0985 ± 0,006
Сахароза	0,0905 ± 0,005
Аланин	0,0836 ± 0,006
Сукцинат	0,0707 ± 0,004
Аскорбат	0,0591 ± 0,005
Капрат	0,0575 ± 0,005
Фумарат	0,057 ± 0,005
Валин	0,046 ± 0,002
Лейцин	0,0362 ± 0,002
Изолейцин	0,027 ± 0,001
Фенилаланин	0,0202 ± 0,001
Тригонеллин	0,0114 ± 0,001

По полученным данным (табл. 3) можно сделать вывод, что с помощью ПО *Chenomx* можно определять различные классы метаболитов в экстракте корней и корневищ дудника лекарственного, такие как углеводы, аминокислоты, соли органических кислот и др.

Однако, основными метаболитами, определяемыми в процессе обработки ЯМР спектра, являются углеводы: фруктоза и глюкоза.

Важно отметить, что в исследуемом образце определены соли глутаминовой и аспарагиновой кислоты, которые являются, согласно литературным источникам [12], маркерными соединениями анализируемого растения.

Заключение

В результате проведенных исследований идентифицирован и количественно определен остол в корнях дудника лекарственного методом спектроскопии ЯМР ^1H . По итогам работы изучена возможность использования *Chenomx* в определении метаболитов в растительном сырье. По результатам исследования в водном экстракте корней дудника лекарственного было обнаружено и количественно определено 23 метаболита. Важно отметить, что обнаружено присутствие солей глутаминовой и аспарагиновой кислоты, которые являются, согласно литературным источникам, маркерными соединениями исследуемого растения. Это означает, что метод спектроскопии ЯМР ^1H в тандеме с ПО *Chenomx* может быть использован и в метаболомных исследованиях объектов растительного происхождения, в частности дудника лекарственного. Данные результаты в работе можно использовать для полноценной разработки методики идентификации и количественного определения остола, а также других водорастворимых биологическиактивных веществ в корнях дудника лекарственного методом спектроскопии ЯМР ^1H .

Список литературы

1. Абрамчук А.В., Карпунин М.Ю. Морфо-биологические особенности дягиля лекарственного (*Angelica archangelica* L.) // Вестник биотехнологии. – 2020. – № 1. – С. 5-10.
2. Кароматов И.Д., Мавлонов С.С. Лекарственное растение дудник // Биология и интегративная медицина. – 2017. – № 1. – С. 283-290.

3. Bharti S.K., Roy R. Quantitative H-1 NMR spectroscopy // TrAC Trends Anal. Chem. – 2012. – Vol. 35. – P. 5-26.
4. Cisowski W., Głowniak K., Matysik G., Soczewiński E. Analiza frakcji kumary nowych z *Angelica archangelica* L. i *Archangelica litoralis* Fries. Z pomocą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) // Herba Pol. — 1987. – Vol. 33, № 4. – P. 233-243.
5. Eeva M., Rauha J. P., Vuorela P., Vuorela H. Computer-assisted, high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of coumarins in *Peucedanumpalustre* and *Angelica archangelica* // Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques. – 2004. – Vol. 15, № 3. – P. 167-174.
6. Forycka A., Buchwald W. Variability of composition of essential oil and coumarin compounds of *Angelica archangelica* L. // HerbaPolonica. – 2019. – Vol. 65, № 4.
7. Gawdzik J., Kawka S., Mardarowicz M., Supryniewicz Z., Wolski T. Carbon Dioxide Fractionated Supercritical Fluid Extraction of Furanocoumarins from the Fruits of *Archangelica officinalis* Hoffm // Herba Pol. – 1996. – Vol. 42, № 1. – P. 26-35.
8. Härmälä P., Vuorela H., Hiltunen R., Nyiredy S., Sticher O., Törnquist K. et al. Strategy for the isolation and identification of coumarins with calcium antagonistic properties from the roots of *Angelica archangelica* // Phytochem Anal. – 1992. – Vol. 3, № 1. – P. 42-48.
9. Herde A. Untersuchung der Cumarinmuster in FrüchtenausgewählterApiaceae: PhD thesis. – University of Hamburg, Germany, 2005.
10. Muller M., Byres M., Jaspars M., Kumarasamy Y., Middleton M., Nahar L. et al. 2D NMR spectroscopic analyses of archangelicin from the seeds of *Angelica archangelica* // Acta Pharm. – 2004. – Vol. 54, № 4. – P. 277-285.
11. Nemeth S., Paşca B., Teodorescu A., Coita I., Teaha D. Coumarins isolated from the dry roots of *Angelica archangelica* L. and their antibacterial activity // Analele Universităţii din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnieşi Tehnologii de Industrie Alimentară. — 2015. – Vol. 14. – P. 355-362.
12. Rizzo V., Pinciroli V. Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – Vol. 38. – P. 851-857.
13. Sieniawska E., Baj T., Ulz Z., Głowniak K. Analysis of coumarin fraction from *Angelica archangelica* L. fruits using multiple development HPTLC method // Farm PrzeglNauk. – 2011. – № 1. – P. 11-15.
14. Sigurdsson S., Jonsdottir S., Gudbjarnason S. Geographical variation of the furanocoumarin composition of the fruits of Icelandic *Angelica archangelica* // Z Naturforsch. – 2012. – Vol. 67. – P. 1-7.
15. Waksmundzka-Hajnos M., Petruczynik A., Dragan A., Wianowska D., Dawidowicz A.L. Effect of extraction method on the yield of furanocoumarins from fruits of *Archangelica officinalis* Hoffm // Phytochem Anal. – 2004. – Vol. 15. – P. 313-319.
16. Wszelaki N., Paradowska K., Jamróz M.K., Granica S., Kiss A.K. Bioactivity-guided fractionation for the butyrylcholinesterase inhibitory activity of furanocoumarins from *Angelica archangelica* L. roots and fruits // J Agric Food Chem. – 2011. – Vol. 59, № 17. – P. 9186-9193.

Статья поступила в редакцию 16.05.2025 г.

Sheremeta A.V., Vasiliev V.G., Ivlev V.A., Murtazina A.A. Determination of biologically active substances in extracts of (*Angelica archangelica* L.) by NMR spectroscopy // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2025. - № 155 - P. 132-140

In modern pharmacopoeial analysis, there is an increasing demand for high-precision qualitative and quantitative data on plant raw materials used in pharmaceutical production, mainly due to strict quality control

and safety standards. In addition, raw materials of the same species can vary significantly in the composition of secondary metabolites. Currently, in the field of phytochemical analysis, conventional high-performance liquid chromatography with various detection options or spectrophotometry in the visible and ultraviolet range are commonly used for qualitative and quantitative determination of substances. However, most of these methods have significant disadvantages such as long sample preparation time and the need for authentic standard samples [1, 2]. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is devoid of these limitations and therefore appears to be a perspective method for the identification and quantification of bioactive substances of plant origin. In this work, a targeted metabolomic analysis of *Angelica archangelica* L. by NMR spectroscopy was made, as a result of which 23 metabolites were detected and quantified in the water extract, and preliminary studies were carried out to develop a methodology for the identification and quantification of ostol in DMSO-d₆ extract of *Angelica archangelica* L. roots by ¹H NMR spectroscopy.

Key words: *ostol; metabolomic analysis; qNMR; coumarin derivatives; medicinal plant materials.*