

УДК 543.544

Л.И. Соколова, А.И. Молчанова, П.Г. Горовой, Н.Н. Трофименко
**Способы выделения и сезонные изменения
 состава хинолизидиновых алкалоидов побегов
Maackia amurensis Rupr. et Maxim.***

L.I. Sokolova, A.I. Molchanova, P.G. Gorovoy, N.N. Trofimenko
**Separation Methods and Seasonal Changes
 in Quinolizidine Alkaloid Composition
 of *Maackia amurensis* Rupr. et maxim. Shoots**

Изучены сезонные изменения содержания хинолизидиновых алкалоидов в 1–4-летних побегах *Maackia amurensis*. Исследовано влияние «солевого фона» экстрагента на выход хинолизидиновых алкалоидов из побегов *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. Максимальный выход достигается при значении ионной силы экстрагирующего растворителя 3,5 моль/л. Методом газовой хроматографии масс-спектрометрии проведены разделение и идентификация 14 хинолизидиновых алкалоидов.

Ключевые слова: маакия амурская, побеги, хинолизидиновые алкалоиды, ионная сила, газовая хроматография – масс-спектрометрия, сезонные и возрастные изменения содержания алкалоидов.

Введение. Маакия амурская (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) – единственный аборигенный древесный представитель семейства Бобовые (*Leguminosae*=*Fabaceae*) на территории материковой части юга российского Дальнего Востока [1, 2]. Химическое и фармакологическое исследование *M.amurensis* позволили получить из экстрактов ее древесины полифенольный препарат «Максар», обладающий гепатопротекторным действием [3]. Потенциальные же возможности медицинского использования веществ, содержащихся в этом растении, еще полностью не раскрыты. По данным исследований, проведенных в Тихоокеанском институте биорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, запасы *M.amurensis* достаточны для промышленных заготовок с последующим получением лекарственных препаратов.

Побеги *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. – это отходы при производстве лекарственного препарата «Максар». Известно, что эта часть растения богата хинолизидиновыми алкалоидами, состав которых до настоящего времени мало изучен [4, 5]. Интерес к изучению алкалоидов вызывается прежде всего тем, что многие из них являются незаменимыми лекарственными веществами.

* Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (проект №05-04-49110), ДВО РАН (проект №09-1-П23-04, № 06-04-63056) и фонда CRDF (проект VL-003-1X).

The work studies seasonal changes in quinolizidine alkaloid composition in *M. amurensis* 1-4-year shoots. The influence of ionic force of solvent on extracting efficiency of quinolizidine alkaloids from vegetable materials was investigated.

The maximum efficiency was reached when ionic force of solvent extracting efficiency is equal to 3,5 mole/l. Using gas chromatographic – mass-spectrographic analysis 14 alkaloids were separated and identified.

Key words: *maackia amurensis*, shoots, quinolizidine alkaloids, ionic force, gas chromatography – mass-spectrometry, seasonal changes in alkaloid composition.

Цель настоящей работы – выделение, анализ и исследование сезонного изменения содержания хинолизидиновых алкалоидов из побегов *Maackia amurensis*.

Экспериментальная часть. *Растительный материал.* Для исследования качественного состава и относительного содержания хинолизидиновых алкалоидов использовали побеги (возраст 1–4 года), листья и цветки *Maackia amurensis*, заготовленные в 2003–2004 гг. в окрестностях с. Андреевка Хасанского района Приморского края. Для сезонных и возрастных изменений использовали побеги, заготовленные в разные периоды развития растения (фенофазы) примерно в 3 км восточнее устья р. Рязановка (берег Рязановских озер) Хасанского района Приморского края.

Экспериментальные условия. Исследовано влияние «солевого фона» на экстрагирующую способность растворителя. Хлорид натрия добавляли в виде раствора, изменяя ионную силу (I) экстрагирующего растворителя. Для исследования влияния ионной силы на суммарный выход алкалоидов проводили экстракцию равных навесок исходного материала растворителем с различными значениями I. Раствор электролита использовали как один из компонентов экстрагирующего растворителя. Значения ионной силы электролита варьировали от 0,01 до 5,00 моль/л.

Разделение и идентификацию алкалоидов проводили методом ГХ-МС на приборе Agilent 5973N

GC/MSD (США) с масс-селективным детектором, колонка HP-5 (30 м×0,25 мм), программирование температуры от 150 до 270 °С, скорость программирования 10 °/мин. Фрагментацию разделенных пиков осуществляли в режиме электронного удара (70 эВ). По характерным фрагментам делали предположение о структуре выделенных алкалоидов. Полученные масс-спектры сравнивали с данными библиотеки NIST и опубликованными масс-спектрами известных хинолизидиновых алкалоидов [6].

Обсуждение результатов. При выделении алкалоидов из растительного сырья чаще всего применяют экстракцию смесью аммиак – хлороформ или этиловым спиртом [7]. Нами проведено сравнение этих способов экстракции. В таблице 1 приведено содержание хинолизидиновых алкалоидов, выделенных двумя способами из побегов *M. amurensis*.

Экстракция этиловым спиртом увеличивает выход алкалоидов примерно в 1,6 раза по сравнению с экстракцией аммиак – хлороформ.

Добавление хлорида натрия является общеизвестным способом уменьшения «вспенивания» при экс-

тракции природного материала. Однако присутствие солей сильных электролитов оказывает влияние и на экстрагирующую способность растворителя. В таблице 2 приведены количественные данные по выходу хинолизидиновых алкалоидов из побегов *Maackia amurensis* при различных значениях ионной силы растворителя (I).

Суммарный выход алкалоидов возрастает с увеличением ионной силы раствора, от 0 до значения I = 3,5 моль/л, затем начинается процесс «высаливания» алкалоидов на кристаллах хлорида натрия, что не позволяет оценить полученные результаты. Оптимальное значение ионной силы раствора для наиболее полной экстракции алкалоидов составило 3,5 моль/л.

Суммарное содержание хинолизидиновых алкалоидов с возрастом побегов практически не изменяется и составляет в одно-, двух-, трех- и четырехлетних побегах 0,23±0,02% от массы сухой навески, в листьях и цветках – 0,12±0,02%.

Методом газовой хроматографии масс-спектрометрии идентифицировано 14 хинолизидиновых алкалоидов:

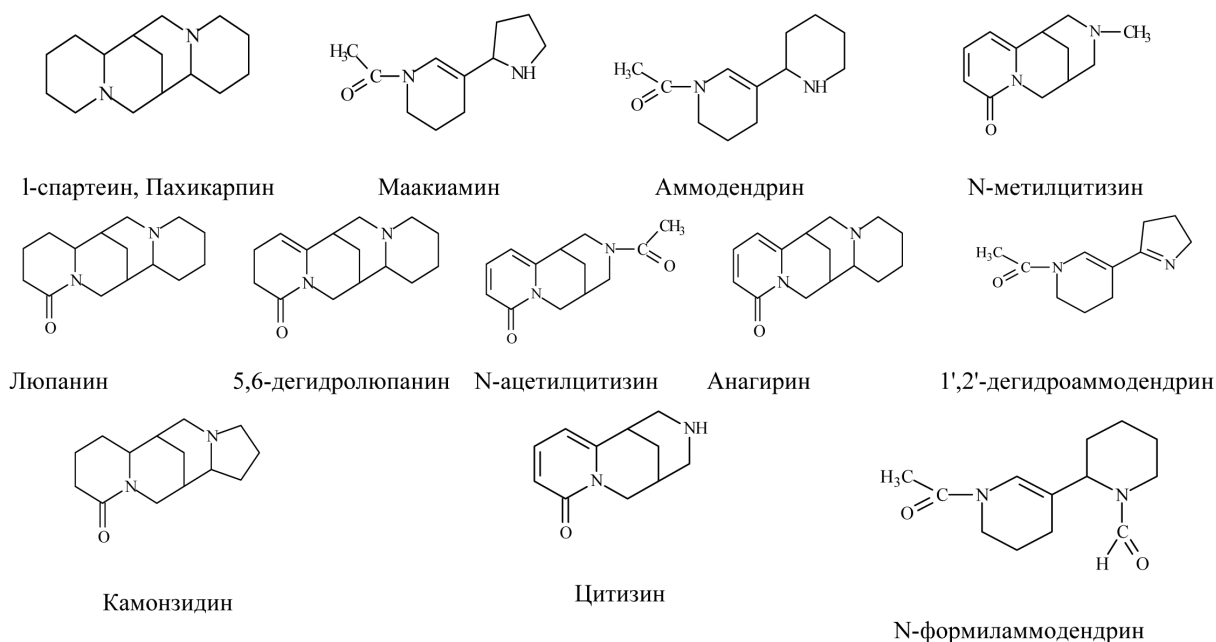


Таблица 1
Суммарное содержание алкалоидов (мг/г сухого образца) в различных частях ствола *Maackia amurensis*

	Исследуемая часть растения	Экстрагирующий растворитель	Содержание алкалоидов (мг/г) (среднее из 3-х измерений)
<i>Maackia amurensis</i>	Заболонь	а) NH ₄ OH+ CHCl ₃	0,95±0,04
	Заболонь	б) C ₂ H ₅ OH	1,56±0,05
	Кора Ядровая древесина	б) C ₂ H ₅ OH	0,97±0,07
			0,58±0,06

Таблица 2

Выход алкалоидов (мг/г) при различных значениях ионной силы раствора

Ионная сила раствора электролита (I) (моль/л)	0,00	0,01	0,05	0,20	0,50	1,00	2,00	3,50	5,00
Масса алкалоидов (мг/г сухого образца)	1,82	2,03	2,72	5,30	5,52	5,06	5,79	6,57	*

* – происходило «высаливание».

Таблица 3

Хинолизидиновые алкалоиды, идентифицированные в побегах *M.amurensis*

Алкалоид*	Относительное содержание некоторых хинолизидиновых алкалоидов, (%)					
	Возраст побегов				Цветки	Листья
	Четырехлетние	Трехлетние	Двухлетние	Однолетние		
Анагинин	16,0	27,3	41,8	39,7	5,4	13,4
Люпанин	22,5	12,9	0,1	20,2	6,5	45,2
5,6-дегидролюпанин	10,1	6,8	8,8	10,6	4,6	30,6
Цитизин	16,1	13,3	8,7	7,2	8,5	0,1
Камонзидин	29,1	30,4	18,0	16,3	6,2	2,5
N-метилцитизин	1,5	1,7	1,4	1,2	58,4	0,7
N-ацетилцитизин	1,4	1,6	1,1	0,7	1,6	1,4

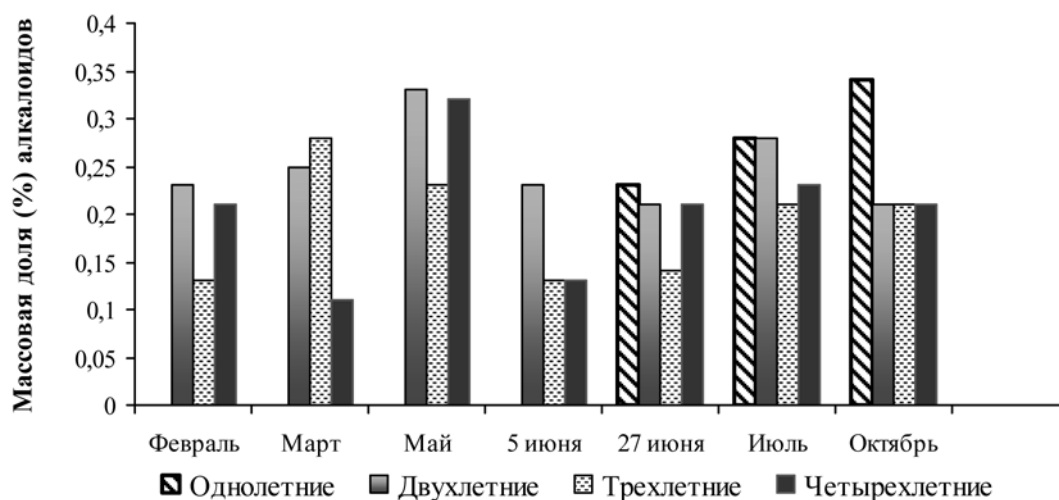
* В таблице представлены алкалоиды, содержание которых превышает следовые количества (>0,01%)..

Впервые в *M. amurensis* идентифицированы алкалоиды: 1',2'-дегидромаакиамин, N-формиламмодедрин, 1',2'-дегидроаммодедрин, 11,12-дегидролюпанин, 5,6-дегидролюпанин, N-ацетилцитизин, афиллин и камонзидин.

В таблице 3 представлены результаты исследования содержания алкалоидов в побегах *M.amurensis*, идентифицированных методом ГХ/МС.

В побегах *M.amurensis* преобладающими алкалоидами являются: анагинин, люпанин, 5,6-дегидролюпанин, цитизин и камонзидин.

Содержание 5,6-дегидролюпанина в побегах колеблется в пределах от 10 до 6%, в листьях оно максимально и составляет 30%, в цветках – 4%. По-видимому, содержание этого алкалоида не отражает возрастных особенностей побегов. Количество ци-



Сезонные и возрастные изменения содержания хинолизидиновых алкалоидов

тизина с ростом побегов увеличивается от 7 до 16%. Преобладающим алкалоидом в цветках является N-метилцитизин – 58%, в листьях – 0,7%, а в побегах его содержание колеблется от 1,2 до 1,5%.

Таким образом, побеги, листья и цветки *M. amurensis* можно считать перспективными источниками для выделения как суммы, так и индивидуальных хинолизидиновых алкалоидов.

При исследовании сезонных и возрастных изменений относительного содержания хинолизидиновых алкалоидов в побегах *Maackia amurensis* использовали образцы, собранные в различных фенофазах: наличие почек (середина февраля – середина мая), распускание листьев (начало июня), бутонизация (конец июня), цветение (конец июля), окончание вегетации (начало октября). Полученные результаты представлены на рисунке.

Качественный состав хинолизидиновых алкалоидов в разные периоды развития растения практически идентичен. В стадиях бутонизации, цветения и до окончания вегетации массовая доля алкалоидов в молодых побегах увеличивается от 0,23 до 0,34%. В двухлетних побегах максимальное содержание суммы алкалоидов наблюдается в мае (т.е. в период распускания листьев) и составляет

0,33% от массы побегов, а к концу вегетации снижается до 0,11%.

Для двухлетних и трехлетних побегов в стадиях цветения и до окончания вегетации (т.е. с июля по октябрь) массовая доля алкалоидов практически одинакова. Однако в фазах появления почек, бутонизации и цветения заметны существенные различия в относительном содержании хинолизидиновых алкалоидов.

Выводы:

1. В результате исследования влияния ионной силы экстрагента на суммарный выход хинолизидиновых из *Maackia amurensis* показано, что наиболее целесообразно использование экстрагента со значением ионной силы 3,5 моль/л.

2. Методом газовой хроматографии масс-спектрометрии определен качественный состав и относительное содержание хинолизидиновых алкалоидов в побегах, листьях и цветках *Maackia amurensis*. В побегах идентифицировано 14 алкалоидов, восемь из них идентифицированы в *Maackia amurensis* впервые.

3. Максимальное накопление хинолизидиновых алкалоидов происходит в однолетних побегах *Maackia amurensis*.

Библиографический список

1. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Горовой П.Г. Биологически активные вещества *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. и перспективы использования этого вида в медицине // Растительные ресурсы. – 1992. – Т. 28, вып. 3.
2. Максимов О.Б. Приморский парадокс – маакия // Химия и жизнь. – 1999. – №3.
3. Максимов О.Б., Кривошекова О.Е., Степаненко Л.С. и др. Пат. РФ 1510147 (1994) // Бюл. изобретений. – 1994. – №22/3.
4. Молчанова А.И., Соколова Л.И., Горовой П.Г., Груздев В.Г. Хинолизидиновые алкалоиды молодых побегов *Maackia amurensis* (Fabaceae) // Растительные ресурсы. – 2004. – Т. 40, вып. 4.
5. Molchanova A.I., Sokolova L.I., Gorovoy P.G., Zarembo T.V. Gas-Chromatography analysis quinolizidine alkaloids *Maackia amurensis* // 3rd International Symposium on Separations in BioSciences SBS'03. – Moscow, 2003.
6. Murakoshi I., Kidoguchi E., Haginiwa J., Ohmiya S., Higashiyama K., Otomasu H. Isokuraramine and (-)-7,11-dehydromatrine, lupin alkaloids from flowers of *Sophora flavescens* // Phytochemistry. – 1982. – V. 21, No.9.
7. Мироненко А.В. Методы определения алкалоидов. – Минск, 1966.
8. Cho Y.D., Martin R.O. Resolution and unambiguous identification of microgram amounts of 22 lupin alkaloids by sequential use of thin-layer and gas-liquid chromatography and mass spectrometry // Analytical Biochemistry. – 1971. – V. 44.