

СТАТЬЯ

УДК 615.074:615.32:547

КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОТОПИНА В ТРАВЕ *MACLEAYA CORDATA* И *MACLEAYA MICROCARPA* МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**Копытько Я.Ф.***ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, e-mail: kopytko@mail.ru*

Маклейя сердцевидная (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) и маклейя мелкоплодная (*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde) являются источниками изохинолиновых алкалоидов (сангвинарина, хелеретрина, протопина, аллокриптопина и др.), которые идентифицируют различными хроматографическими методами. Целью исследования является качественное обнаружение протопина в образцах травы маклейи методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии на хромато-масс-спектрометре 450GC-220MS (Varian, США) с масс-анализатором типа «ионная ловушка», с кварцевой капиллярной колонкой FactorFour VF-5ms (30 м × 0,25 мм). В качестве испытуемого раствора использовали спиртовое извлечение из травы. В результате проведенного анализа качественно обнаружены протопиновые алкалоиды. Для оптимизации хроматографического разделения алкалоидных соединений проведен подбор температурной программы, выявлено, что протопиновые алкалоиды образуют паровую фазу при температуре 240 °C, как соединения близкой химической структуры, они выходят близко расположенными пиками. Выявлено, что в спиртовых извлечениях из образцов обоих видов маклейи преобладают протопин и аллокриптопин, причем в таковом из *M. cordata* содержание этих соединений заметно выше, чем в *M. microcarpa*, что явствует из площадей пиков. Отношение содержаний протопина и аллокриптопина, вычисленное по площадям пиков, составляет в лекарственном растительном сырье маклейи сердцевидной – 1,6, в мелкоплодной – 1,3. Предложенная методика и полученные результаты позволяют использовать их при количественной оценке в пересчете на стандартный образец при его наличии. В извлечении из *M. cordata* также найден алкалоид дидронитидин. Наряду с алкалоидами в обеих пробах обнаружено азотгетероциклическое соединение – 2,4-диамино-7,8,9,10-тетрагидро-11-(3-пиридил)пиримидо[5',4':2',3']тиено[5,4-b]хинолин, которое может не являться нативным, так как при высоких температурах могут происходить различные процессы, приводящие к появлению дериватов и артефактов, а также бензо[f]бензимидазоло[2,1-b]бензотиазол и 4-амино-2-[p-(диметиламино)фенил]-5H-1]бензопирано[4,3-d]пиримидин-5-он, которые могут как быть нативными соединениями, так и являться артефактами.

Ключевые слова: *Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*, протопин, ГЖХ-МС**QUALITATIVE DETECTION OF PROTOPINE IN *MACLEAYA CORDATA* AND *MACLEAYA MICROCARPA* HERBA BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC MASS SPECTROMETRY****Kopytko Ya.F.***All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, e-mail: kopytko@mail.ru*

Plume poppy *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) and *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde are sources of isoquinoline alkaloids (sanguinarin, chelerythrin, protopin, allocryptopin, etc.), which are identified by various chromatographic methods. The objective of the study is the qualitative detection of protopin in plume poppy samples by gas-liquid chromatographic mass spectrometry on a 450GC-220MS chromatographic mass spectrometer (Varian, USA) with an ion trap mass analyzer, with a FactorFour VF-5ms quartz capillary column (30 m × 0.25 mm). Alcohol extraction from plant was used as the test solution. As a result of the analysis, protopine alkaloids were qualitatively detected. To optimize the chromatographic separation of alkaloid compounds, a temperature program was selected, it was found that protopine alkaloids form a vapor phase at a temperature of 240 °C, as compounds of a similar chemical structure, they come out with closely spaced peaks. It was found that protopine and allocryptopin predominate in alcoholic extracts from samples of both species of macleia, and in such of *M. cordata* the content of these compounds is noticeably higher than in *M. microcarpa*, which is evident from the peak areas. The ratio of protopin and allocryptopin content, calculated from peak areas, is 1.6 in medicinal plant raw material of *M. cordata*, and 1.3 in *M. microcarpa*. The proposed method and the obtained results make it possible to use them for quantitative evaluation and calculation as reference standard, if any. The alkaloid dihydroneitidine was also found in the extract from *M. cordata*. Along with alkaloids, an azoheterocyclic compound was found in both samples – 2,4-diamino-7,8,9,10-tetrahydro-11-(3-pyridyl)pyrimido[5',4':2',3']thieno[5,4-b]quinoline, which may not be native, since various processes leading to the appearance of derivatives and artifacts can occur at high temperatures, as well as benzo[f]benzimidazole[2,1-b]benzothiazole and 4-amino-2-[p-(dimethylamino)phenyl]-5H-1]benzopyrano[4,3-d]pyrimidin-5-one, which can be both native compounds and artifacts.

Keywords: *Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*, protopine, GC-MS

Введение

Маклейя сердцевидная (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) и маклейя мелкоплодная (*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde) сем. маковые – Papaveraceae являются источниками изохинолиновых алкалоидов, обладающих важными фармакологическими свойствами – седативным, психотропным, обезболивающим, противомикробным и противовоспалительным действием. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) маклейи используется для получения препарата Сангвиритрина – суммы бисульфатов бензо[с]фенантридиновых алкалоидов сангвинарина и хелеритрина, обладающих противомикробным действием [1, 2].

В надземной части маклейи среди алкалоидов преобладают сангвинарин и хелеритрин, сумма которых составляет в листьях образцов растений, выращенных в России (ВИЛАР), до 2,01 %; в листьях *M. cordata* из Польши – 3,1 и 5,6 мг/г; в траве – 0,7 и 1,8 сангвинарина и хелеритрина соответственно. Также содержатся алкалоиды протопинового типа среди которых преобладают протопин (до 35 %) и аллокриптопин (до 15 %), которые характеризуются выраженным противовоспалительным действием. В образцах листьев *M. cordata* протопина найдено 1,76 мг/г; в траве – 0,47 мг/г [3–5]. Протопина гидрохлорид, изохинолиновый алкалоид, является специфическим обратимым и конкурентным ингибитором ацетилхолинэстеразы, проявляет противовоспалительную, антимикробную, антиангиогенную, нейропротективную и противоопухолевую активность [3, 6, 7].

Скрининг биологически активных веществ, их качественное и количественное определение требует использования высокоселективных физико-химических методов. Для анализа алкалоидных соединений маклейи используются различные хроматографические методы. ВЭЖХ – квадратупольная времяпролетная масс-спектрометрия чаще всего используется для комплексных исследований сырья и лекарственных средств растительного происхождения. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с tandem-масс-селективным детектированием в экстракте маклейи сердцевидной были идентифицированы 32 алкалоида, в том числе 16 минорных алкалоидных соединений, включая нандазурин, гидроксигелидонин, капауридин, (-)-дицентрин, лептопин, адлумидин, такатонин и др. [8, 9].

Протопин также может быть идентифицирован и количественно определен методами газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ГЖХ-МС) и тонкослойной

хроматографией в комбинации с ГЖХ-МС (ТСХ/ГЖХ-МС). По сравнению с высокоэффективной жидкостной хроматографией в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) или высокоэффективной жидкостной хроматографией, соединенной с методом ядерного магнитного резонанса (ВЭЖХ-ЯМР), ТСХ/ГЖХ-МС имеет преимущества в виде короткого времени анализа, низкой стоимости разделения и простоты определения. ТСХ/ГЖХ-МС больше подходит для быстрого скрининга большого количества образцов небольшой массы из растений, содержащих алкалоиды [10]. Для анализа алкалоидов в экстрактах применялся также биоавтографический анализ ТСХ, совместно с препаративной ТСХ и ГЖХ-МС [11].

С помощью метода ВЭЖХ выявлено, что доминирующим алкалоидом маклейи сердцевидной, культивируемой в Чехии, является аллокриптопин (3,8–13,6 и 24,2–48,9 мг/г соответственно для надземной и подземной частей). Также присутствовали хелеритрин (2,9–5,7 и 3,6–10,7 мг/г соответственно для надземной и подземной частей), сангвинарин (2,9–4,3 и 2,9–10,1 мг/г) и протопин (1,1–5,1 и 0,8–5,8 мг/г для надземной и подземной частей соответственно [5]. Методом ВЭЖХ-МС идентифицированы альфа-аллокриптопин и бета-аллокриптопин в плодах *M. cordata*. В плодах *M. cordata* и *M. microcarpa* родом из Китая обнаружены хелидонин, криптопин, ваиллатин, 2-диметилкрамин, гуннеманнин, корикавидин, мурамин, корикавамин, 2,3-диметилэритопин [2, 12].

Определение алкалоидного состава также проводится с помощью других методов инструментального тестирования, таких как газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГЖХ-МС), капиллярный электрофорез-масс-спектрометрия и ВЭЖХ-ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Для разделения и анализа изохинолиновых алкалоидов (протопин, криптопин, синактин, стилопин, бикукуллин, адлюмин, парфумин, фумарин, фумарофин, фумаритин, дигидрофумарин, парфумидин и дигидросангвинарин) успешно применяется метод ГЖХ-МС с использованием хромато-масс-спектрометра Hewlett Packard 5988A MS – HP 5980 GC, оснащенного капиллярной колонкой HP-1 (12 м × 0,2 мм; толщина пленки 0,33 м). Температурная программа колонки: 200 °C в течение 0,8 мин, увеличение со скоростью 10 °C/мин до 250 °C, затем 250 °C в течение 24 мин. Алкалоиды извлекали из ЛРС последовательно экстракцией метанолом, затем выпариванием растворителя, рас-

творением полученного остатка в кислоте хлористоводородной 2,5%, фильтрацией и подщелачиванием до pH 8 концентрированным аммиаком, экстракцией дихлорметаном [13]. Протопин количественно определяли методом ТСХ с денситометрией и спектрофотометрии в системе растворителей толуол – хлороформ-метанол – 25 % аммиак (5:3:1:1) и циклогексан – диэтиламмин (9:1) [14].

Изохинолиновые алкалоиды протопин, криптопин, синактин, стилопин, бикукуллин, адлюмин, парфумин, фумарин, фумарофизин, фумаритин, дигидрофумарин, парфумидин и дигидросангвинарин были определены и идентифицированы методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в видах *Fumaria* и *Sarcocarpnos* [15, 16].

Цель исследования – качественное обнаружение протопина в траве *Macleaya cordata* и *Macleaya microcarpa* методом ГЖХ-МС.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили образцы травы *M. cordata* и *M. microcarpa*, выращенных на опытных полях Средне-Волжского филиала ФГБНУ ВИЛАР в 2023 г.

Подготовка пробы: около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в коническую колбу со шлифом объемом 150 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, полученное извлечение фильтруют в колбу объемом 50 мл через бумажный складчатый фильтр.

Анализ проводили методом ГЖХ-МС на хромато-масс-спектрометре 450GC-220MS (Varian, США) с масс-анализатором типа «ионная ловушка». Хроматографическое разделение компонентов пробы проводили на кварцевой капиллярной колонке FactorFOUR VF-5ms (30 м × 0,25 мм). Газ-носитель – гелий с постоянной скоростью потока 1,0 мл/мин. В инжектор хроматографа при температуре 200 °С (деление потока 5) вводят по 1 мкл пробы. Температурная программа колонки: 150 °С – 1 мин, нагрев до 240 °С – 10 °С/мин, изотерма при 240 °С – 30 мин. Включение ионизации на 4-й мин. Общее время анализа – 40 мин.

Идентификацию разделенных компонентов проводили с использованием библиотеки масс-спектров (NIST-08 MS Library and MS Search Program, Version 2f) и алгоритмов сравнения программного обе-

спечения Saturn (Varian). Количественную оценку осуществляли методом нормализации по площади пиков (полный ионный ток) идентифицированных соединений с использованием автоматической системы обработки.

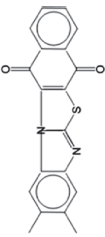
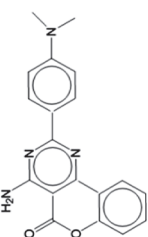
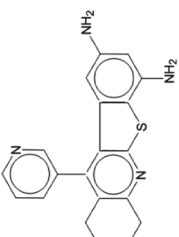
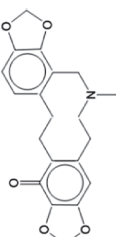
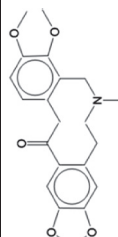
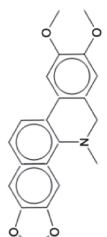
Результаты исследования и их обсуждение

Всех соединений в пробах, включая неидентифицированные, насчитывается более 90 (рисунок). С помощью анализа методом ГЖХ-МС в извлечениях из ЛРС маклей обнаружено шесть азотсодержащих соединений (таблица). Также в извлечениях были найдены соединения других классов – углеводороды C21–C25, дитерпеновый спирт фитол, который присутствует во всех зеленых растениях, эфиры фталевой кислоты, часто встречающиеся в извлечениях из ЛРС, что может быть обусловлено загрязнением почвы и воды пластиком.

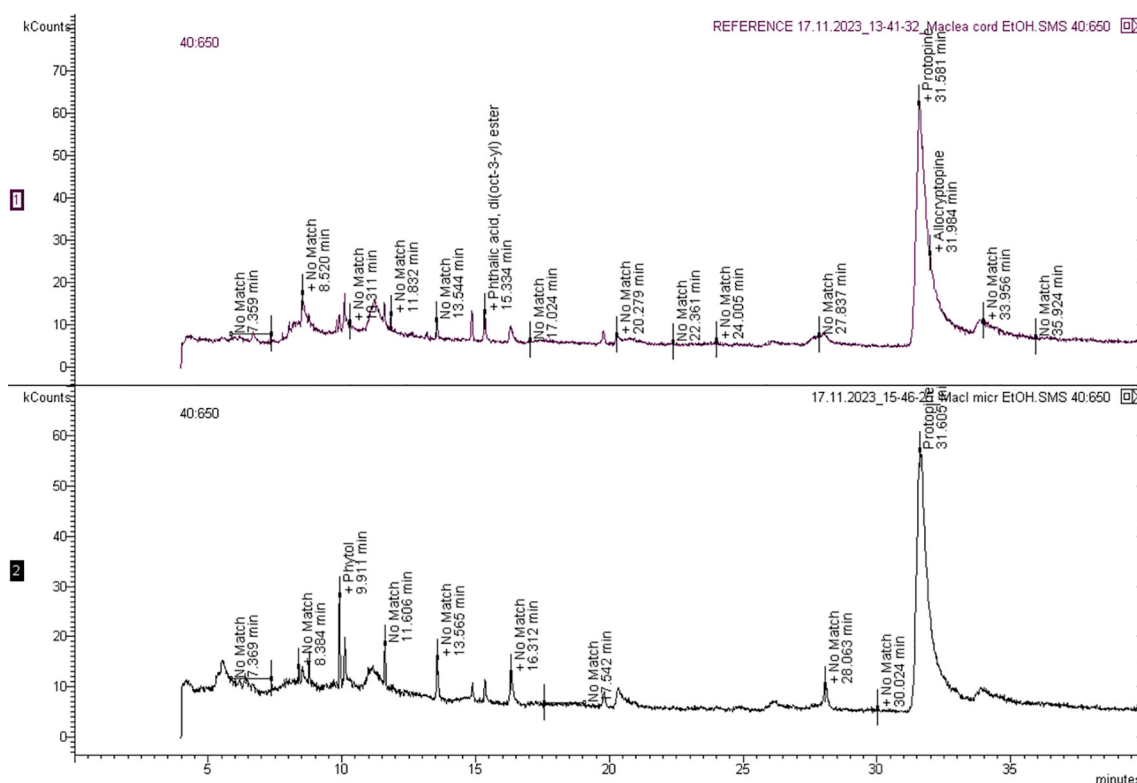
Для оптимизации хроматографического разделения алкалоидных соединений проведен подбор температурной программы, выявлено, что протопиновые алкалоиды образуют паровую фазу при температуре 240 °С, как соединения близкой химической структуры они выходят близко расположенными пиками. Выявлено, что в извлечении из образцов обоих видов маклей превалируют протопин и аллокриптопин, причем в таком из *M. cordata* содержание этих соединений заметно выше, чем в *M. microcarpa*, что явствует из площадей пиков. Отношение содержаний протопина и аллокриптопина, вычисленное по площадям пиков, составляет в ЛРС маклей сердцевидной – 1,6, в мелкоплодной – 1,3. Предложенная методика и полученные результаты позволяют использовать их при количественной оценке в пересчете на стандартный образец при его наличии.

В обоих пробах найдено азогетероциклическое соединение 2,4-диамино-7,8,9,10-тетрагидро-11-(3-пиридил)пиримидо[5',4':2',3']тиено[5,4-b]хинолин, оно может не являться нативным, так как при высоких температурах могут происходить различные процессы, приводящие к появлению дериватов и артефактов, которых нет в ЛРС, а именно окисление и другие процессы, приводящие к деградации соединений, перегруппировкам и т.д. В извлечении из *M. cordata* также найдены алкалоид дигидронитидин, а также бензо[f]бензимидазоло[2,1-b]бензотиазол и 4-амино-2-[p-(диметиламино)фенил]-5H-1]бензопирано[4,3-d]пиримидин-5-он, которые также могут как быть нативными соединениями, так и являться артефактами.

Протопиновые алкалоиды и азотсодержащие соединения *Macleaya*, идентифицированные методом ГЖХ-МС

№	Время удерживания	Название вещества	Формула вещества	<i>Macleaya cordata</i> (Willd.) R. Br.)		<i>Macleaya microcarpa</i> (Maxim.) Fedde		CAS	R. Match
				Площадь пика	Содержание	Площадь пика	Содержание		
1	13.639	Бензо[f]бензимидазол [2,1-b]бензотиазол		54590	2.1	–	–	296885-53-5	735
2	13.674	4-Амино-2-[p-(диметиламино)фенил]-5Н-[1]бензопирано[4,3-d]пиримидин-5-он		198505	7.638	–	–	326444-52-3	758
3	15.827	2,4-Диамино-7,8,9,10-тетрагидро-11-(3-пиридил)пиримидо [5',4':2',3']пиено [5,4-b]хинолин		270672	10.414	2090	0.61	159717-99-4	790
4	31.587	Протопин		663014	25.516	313125	10.798	485-91-6	800
5	31.623	Аллокриптопин		393186	15.130	235150	8.248	130-86-9	805
6	34.021	Дигидронитидин		4093	0.157	–	–	13063-06-4	772

Источник: составлено автором на основе полученных данных в ходе исследования.



Хроматограммы извлечений из *Macleaya cordata* (верхняя) и *Macleaya microcarpa* (нижняя)
Источник: составлено автором по результатам данного исследования

Существование в растении второго соединения из вышеуказанных вполне возможно, так как известно, что кольцевая система бензотиазола первоначально была обнаружена в различных морских и других природных соединениях, такие соединения широко используются в качестве антиоксидантов, регуляторов роста растений, противовоспалительных средств, ингибиторов ферментов и др. благодаря своей высокой фармацевтической и биологической активности [17].

Закключение

Предложена методика качественного обнаружения протопиновых алкалоидов в образцах травы маклейи методом ГЖХ-МС. При наличии стандартного образца анализируемые вещества можно оценивать количественно.

В извлечениях из ЛРС *M. cordata* и *M. microcarpa* обнаружено шесть азотсодержащих соединений – протопиновые алкалоиды – протопин и аллокриптопин, дигидронитидин обнаружен только в извлечении из ЛРС *M. cordata*.

В обоих пробах найдено азогетероциклическое соединение 2,4-диамино-7,8,9,10-тетрагидро-11-(3-пиридил)пирими-

до[5',4':2',3']тиено[5,4-b]хинолин, а также бензо[f]бензимидазоло[2,1-b]бензотиазол и 4-амино-2-[p-(диметиламино)фенил]-5H-1]бензопирано[4,3-d]пиримидин-5-он, которые также могут как быть нативными соединениями, так и являться артефактами.

Список литературы

1. Абизов Е.А., Толкачёв О.Н., Копылова И.Е., Лыферов А.Н. Распределение суммы алкалоидов сангвинарина и хелеритрина в надземной части *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde (Papaveraceae) // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37 (8). С. 18–19.
2. Lin L., Liu Y.C., Huang J.L., Liu X.B., Qing Z.X., Zeng J.G., Liu Z.Y. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology // Phytother Res. 2018. Vol. 32 (1). P. 19–48. DOI: 10.1002/ptr.5952.
3. Huang J., Yue M., Yang Y., Liu Y., Zeng J. Protopine-Type Alkaloids Alleviate Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Inflammation and Modulate the Gut Microbiota in Mice // Animals (Basel). 2024. Vol. 14 (15). P. 2273. DOI: 10.3390/ani14152273.
4. Dong Z., Wang Y.H., Tang Z.S., Li C.H., Jiang T., Yang Z.H., Zeng J.G. Exploring the Anti-inflammatory Effects of Protopine Total Alkaloids of *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. // Front Vet Sci. 2022. Vol. 9. № 6. P. 935201. DOI: 10.3389/fvets.2022.935201.
5. Petruczynik A., Plech T., Tuzimski T., Misiurek J., Kaproń B., Misiurek D., Szultka-Młyńska M., Buszewski B., Waksmundzka-Hajnos M. Determination of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Mahonia Aquifolia*; *Meconopsis Cambrica*; *Corydalis Lutea*; *Dicentra Spectabilis*; *Fumaria Officinalis*;

- Macleaya Cordata* Extracts by HPLC-DAD and Comparison of Their Cytotoxic Activity // *Toxins* (Basel). 2019. Vol. 11 (10). P. 575. DOI: 10.3390/toxins11100575.
6. Nie C., Wang B., Wang B., Lu N., Yu R., Zhang E. Protopine triggers apoptosis via the intrinsic pathway and regulation of ROS/PI3K/Akt signalling pathway in liver carcinoma // *Cancer Cell Int.* 2021. Vol. 21 (1). P. 396.
 7. Lu L., Pang M., Chen T., Hu Y., Chen L., Tao X., Chen S., Zhu J., Fang M., Guo X., Lin Z. Protopine Exerts Neuroprotective Effects on Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Rats via Activation of the AMPK/PGC1 α Pathway // *Drug Des Devel Ther.* 2024. Vol. 18. P. 4975–4992. DOI: 10.2147/DDDT.S484969.
 8. Pěňčíková K., Urbanová J., Musil P., Táborská E., Gregorová J. Seasonal Variation of Bioactive Alkaloid Contents in *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde // *Molecules*. 2011. Vol. 16. P. 3391–3401. DOI: 10.3390/molecules16043391.
 9. Zhou X., Peng Y., Zhou H., Wang W., Yi G., Xia Q., Guo Y., Xie L. Profiling 32 alkaloid compounds from *Macleaya cordata* by UPLC-DAD-QTOF-MS/ms // *Nat Prod Res.* 2024. P. 1–8. DOI: 10.1080/14786419.2024.2408409.
 10. Huang W., Kong L., Cao Y., Yan L. Identification and Quantification, Metabolism and Pharmacokinetics, Pharmacological Activities, and Botanical Preparations of Protopine: A Review // *Molecules*. 2022. Vol. 27 (1). P. 215. DOI: 10.3390/molecules27010215.
 11. Berkov S., Bastida J., Nikolova M., Viladomat F., Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts // *Phytochem Anal.* 2008. Vol. 19. № 5. P. 411–419. DOI: 10.1002/pca.1066.
 12. Dong Z., Liu M., Zhong X., Ou X., Yun X., Wang M., Ren S., Qing Z., Zeng J. Identification of the Trace Components in Bopuzong Jian and *Macleaya cordata* Extract Using LC-MS Combined with a Screening Method // *Molecules*. 2021. Vol. 26 (13). P. 3851. DOI: 10.3390/molecules26133851.
 13. Qing Z.X., Cheng P., Liu X.B., Liu Y.S., Zeng J.G. Systematic identification of alkaloids in *Macleaya microcarpa* fruits by liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with the isoquinoline alkaloids biosynthetic pathway // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015. Vol. 103. P. 26–34.
 14. Suau R., Cabezudo B., Rico R., Nájera F., López-Romero J.M. Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria species* by GC-MS // *Phytochem Anal.* 2002. Vol. 13 (6). P. 363–367. DOI: 10.1002/pca.669.
 15. Fafal T., Önur M.A. Determination of protopine in *Fumaria densiflora* DC by TLC densitometric and spectrophotometric method // *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2007. Vol. 36 (4). P. 223–235.
 16. Suau R., Cabezudo B., Valpuesta M., Posadas N., Diaz A., Torres G. Identification and quantification of isoquinoline alkaloids in the genus *Sarcocapnos* by GC-MS. // *Phytochem. Anal.* 2005. Vol. 16. P. 322–327.
 17. Gao X., Liu J., Zuo X., Feng X., Gao Y. Recent Advances in Synthesis of Benzothiazole Compounds Related to Green Chemistry // *Molecules*. 2020. Vol. 25 (7). P. 1675. DOI: 10.3390/molecules25071675.