

**ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИНЕЙНЫХ ФУРОКУМАРИНОВ ИЗ СЕМЯН  
*AMMI MAJUS* С ПОМОЩЬЮ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ  
ФЛЮИДНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ  
ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

**<sup>1</sup>О. И. Покровский\*, <sup>2</sup>А. А. Марколия, <sup>1</sup>Ф. Д. Лепёшкин,  
<sup>1</sup>И. В. Кувькин, <sup>1</sup>О. О. Паренаго, <sup>2</sup>С. А. Гончуков**

<sup>1</sup>Институт общей и неорганической химии РАН им. Н. С. Курнакова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский инженерно-физический институт, Москва, Россия

\*opokrovskiy@schag.ru

Поступила в редакцию 15.05.2009 г.

Разработана методика экстракции семян зонтичного растения *Ammi Majus* с помощью сверхкритического диоксида углерода, позволяющая извлекать основные фурукумариновые компоненты — бергаптен, ксантотоксин и изопимпинеллин, используемые в медицине в качестве фотосенсибилизирующих агентов ПУФА-терапии. Предложена методика анализа состава получаемых экстрактов, а также выделения фурукумаринов в индивидуальном виде с помощью сверхкритической флюидной хроматографии.

Ключевые слова: сверхкритическая флюидная экстракция, сверхкритическая флюидная хроматография, *Ammi Majus*, бергаптен, ксантотоксин, изопимпинеллин.

**ВВЕДЕНИЕ**

Фурукумарины — трициклические ароматические соединения (рис. 1), являющиеся одним из наиболее распространенных видов фитоалексинов, обладающих фунгицидной, противовирусной и противомикробной активностью [1 — 3]. Данные вещества обладают двумя особенными свойствами, позволяющими растениям использовать их для борьбы с различными паразитирующими микроорганизмами. Во-первых, эти соединения могут, проникая в живые клетки, концентрироваться в клеточном ядре, интеркалируя ДНК и образуя с ней термодинамически устойчивые комплексы [4 — 6]. Во-вторых, под воздействием УФ облучения они способны вступать в реакцию [2 + 2]-циклоприсоединения с пиримидиновыми основаниями ДНК. При этом активными в данной реакции являются как двойная связь в пириновом кольце (связь 3,4), так и несконденсированная двойная связь в фурановом кольце (связь 4', 5') [7, 8]. Ввиду этого линейные фурукумарины могут образовывать циклоаддукты с обеими спиральями ДНК клетки, сшивая таким образом цепочки ДНК между собой [9]. Принято считать, что вследствие этого клетка не может делиться, так как не способна распарить двойную спираль ДНК для осуществления мейоза, и, отжив положенный ей срок, погибает. Растения синтезируют фурукумарины в корнях, транспортируют их в поверхностные слои клеток, где те могут проникать в клетки организмов-агрессоров и сшивать их ДНК, препятствуя таким образом их размножению.

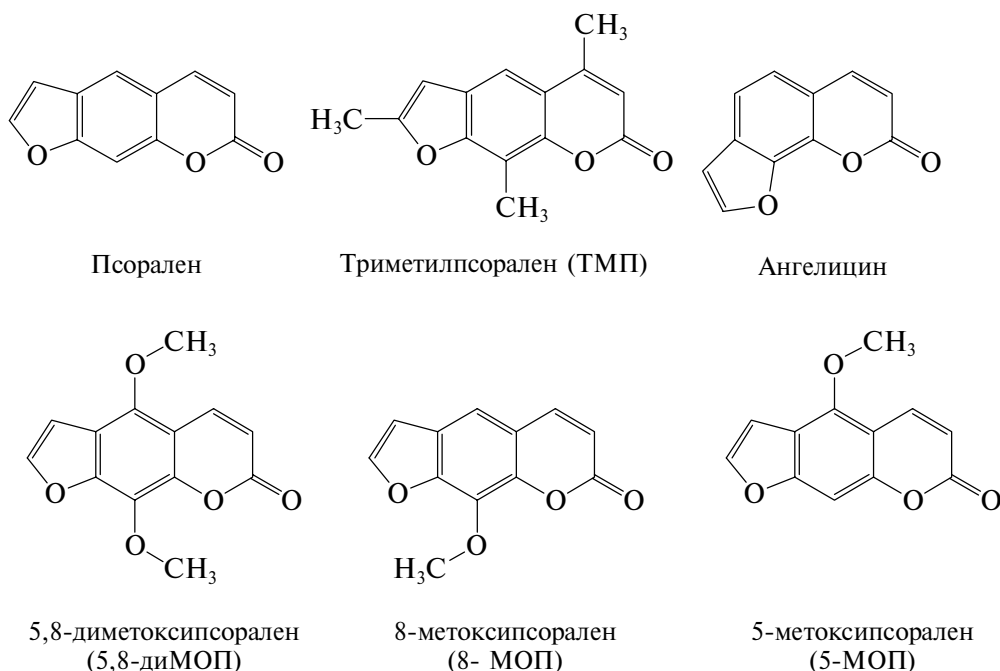


Рис. 1. Структурные формулы фурукумаринов

Человечество научилось использовать вышеописанные свойства растений очень давно. В Древнем Египте отвары из семян зонтичного растения *Ammi Majus* применяли при кожных заболеваниях, таких как псориаз, витилиго и пр. [10]. Отвар наносили на пораженные болезнью участки кожи, после чего подвергали их облучению солнечным светом. В Древней Индии с этой же целью использовали отвары растения *Psoralea Corylifolia* семейства бобовых. От названия этого растения происходит еще одно тривиальное название для этой группы химических соединений — псоралены. Рекомендации по использованию этого растения при «белой проказе» — витилиго содержатся еще в Аюрведе [11,12]. Оба этих растения содержат значительные количества фурукумаринов в своем составе, что и обуславливает терапевтический эффект.

В настоящее время фурукумарины, выделяемые из растений, широко используются в медицине как фотосенсибилизирующий агент в методе так называемой ПУФА-терапии (Псорален-УФ А терапии). Суть ее заключается в следующем. Пациент употребляет лекарственный препарат, содержащий те или иные фурукумарины, наружно либо орально, после чего подвергается облучению в диапазоне УФ А (320 ÷ 400 нм). Несколько таких сеансов позволяют полностью элиминировать внешние проявления целого ряда кожных заболеваний. ПУФА-терапия активно применяется против витилиго, псориаза, атопического дерматита и других кожных заболеваний [13]. Однако только кожной проблематикой область применимости данного метода не исчерпывается. В последние десятилетия медиками и биохимиками активно исследуются принципиально новые сферы использования ПУФА-терапии. Ее применяют для очистки донорской крови от вирусов при переливаниях [14], для лечения грибковых заболеваний [15], для экстракорпорального превентивного лечения Т-клеточной лимфомы [16].

Все эти приложения так или иначе базируются на способности фурукумаринов умерщвлять клетки при активации их светом в УФ диапазоне. Между тем исчерпывающего описания процессов, происходящих в клетке при попадании в нее фурукумаринов с последующим облучением, на данный момент не существует. Показано, что после поглощения кванта света псоралены могут реагировать по целому ряду маршрутов [17]. Кроме [2+2]-циклоприсоединения по двойным связям, фурукумарины в возбужденном электронном состоянии могут участвовать в процессах прямого или косвенного переноса электронов, результатом которых может являться генерация активного синглетного кислорода [17]. Реакции с образованием циклобутанового кольца необязательно проходят с участием пиримидиновых оснований ДНК. В ряде работ показано, что псоралены могут образовывать устойчивые аддукты с ненасыщенными жирными кислотами, входящими в структуру липидных слоев клеток [18]. Нельзя назвать полностью изученным и взаимодействие псораленов собственно с ДНК. Уже не подвергается сомнению то, что в данном процессе могут образовываться сшивки между двумя цепочками полинуклеотидов. Однако нет неопровержимых свидетельств того, что именно этот механизм ответственен за терапевтический эффект ПУФА-терапии. В последние годы появились свидетельства того, что псоралены инициируют целый ряд сложных процессов в клетке, не связанных напрямую с образованием циклоаддуктов, но, тем не менее, в конечном итоге приводящих к гибели клетки. В ряде работ было показано, что после УФ облучения тканей, обработанных фурукумарином, в клетках может запускаться механизм апоптоза [19, 20] либо активируются различные иммунные процессы, приводящие к желаемому результату [21]. Среди исследователей, работающих в данной области, постепенно формируется мнение, что текущее представление о природе терапевтического действия фурукумаринов в комбинации с УФ облучением как минимум неполное, а возможно и просто неверное.

В связи с этим особенно остро встает вопрос верификации применимости различных фурукумаринов в ПУФА-терапии. Известно, что разные вещества этого ряда обладают разной эффективностью в данном методе лечения. По химической структуре они подразделяются на две группы — линейные, или псоралены, и ангулярные, или ангелицины (рис. 1). Сшивки двух спиралей ДНК могут осуществляться только с помощью линейных фурукумаринов. Ангелицины в данном процессе неактивны ввиду стерических ограничений [22] — образовав циклоаддукт по одной связи, соединение ангелицинового ряда оказывается в такой пространственной конфигурации, при которой другая двойная связь находится слишком далеко от соответствующего пиримидинового основания. Было показано, что ангелицин, в отличие от линейных псораленов, практически не обладает активностью в реакции перекисного окисления липидов — клеточном процессе, происходящем с участием фурукумаринов при УФ облучении наряду с циклоприсоединением [23]. Тем не менее, ангулярные фурукумарины находят во множестве растений, в частности, сам ангелицин является одним из двух основных фурукумариновых компонентов экстрактов из *Psoralea Corylifolia* [24]. Косвенным образом это также может свидетельствовать о том, что механизм защитного действия фурукумаринов сложнее, чем препятствование делению через образование межспиральных сшивок ДНК.

Наиболее часто используемые в современной врачебной практике соединения — 5-метоксипсорален (5-МОП, бергаптен), 8-метоксипсорален (8-МОП, ксантотоксин, метоксален) и 4',5',8-триметилпсорален (ТМП). Объективных

данных, обосновывающих преимущество именно этих соединений перед остальными фурукумаринами, как природными, так и синтетическими, нам обнаружить не удалось. Наибольшее распространение получили препараты на основе 8-МОП. По всему миру существует несколько десятков лекарственных средств на основе фурукумаринов. В России одним из наиболее распространенных является препарат аммифурин, выпускаемый ЗАО «Фармцентр Вилар» [25]. Препарат изготавливается методом жидкостной экстракции из семян *Ammi Majus* и представляет собой смесь всех трех основных линейных фурукумаринов, входящих в состав экстрактов этого растения: бергаптена, ксантотоксина, а также изопимпинеллина (5,8-диметоксипсорален, 5,8-диМОП, рис. 1). В западной медицине в основном используются препараты, содержащие лишь один фурукумарин, как правило, 8-МОП. Препараты на его основе обладают ярко выраженными побочными эффектами как при разовом, так и при длительном регулярном приеме (тошнота, головокружение, покраснение кожи при наружном использовании, общее недомогание). В разные годы проводилось несколько клинических исследований, показавших, что в случае использования 5-МОП в качестве основного агента ПУФА-терапии наблюдается существенно меньше побочных эффектов [26, 27]. Дозировка двух фурукумаринов, необходимая для достижения определенного лечебного действия, тоже оказалась заметно отличающейся. В [28] было найдено, что для достижения одного и того же эффекта бергаптена требуется в два раза больше, чем ксантотоксина. Неопровержимых данных о действенности в ПУФА-терапии изопимпинеллина, третьего основного фурукумаринового компонента *Ammi Majus*, нет. В работах [29, 30] указывалось, что использование этого псоралена в ПУФА-терапии эритемы не приводит к появлению эритемного ответа. В ряде других исследований, напротив, показано, что 5,8-диМОП обладает фотоактивностью против ряда микроорганизмов [31], в частности, является потенциально перспективным препаратом для борьбы с лейшманиозом [32], заболеванием, от которого, по оценкам ВОЗ, страдают 12 миллионов человек в 88 странах мира. Кроме того, было показано, что изопимпинеллин, как и другие фурукумарины, обладающие активностью в ПУФА-терапии, способен интеркалировать и образовывать межспиральные сшивки с ДНК [33]. Позднее было показано, что некоторые ранее полученные данные, свидетельствующие о фотоактивности 5,8-диМОП, могли быть ложно проинтерпретированы ввиду наличия в использовавшихся препаратах примесей других фурукумаринов [34]. Так, например, в работе [35] исследовалась фотоактивность фурукумаринов, извлеченных из семян техасской *Ammi Majus*. Было показано, что все извлеченные компоненты, в том числе и изопимпинеллин, проявляют заметную фотоактивность в опытах с пробами куриной кожи. Однако позднее сами авторы провели дополнительное исследование и выяснили, что найденный ими эффект в случае 5,8-диМОПа полностью исчезал при удалении из исследуемых веществ примесей других активных компонентов [34]. Было сделано предположение о том, что активность 5,8-диМОПа против ряда насекомых объясняется не фотохимическими причинами. Для окончательного прояснения вопроса об активности изопимпинеллина в ПУФА-терапии необходимы дополнительные клинические испытания.

Стандартным промышленным способом извлечения кумаринов из растений на настоящий момент является жидкостная экстракция с помощью таких растворителей, как этанол, метанол, хлороформ, бензол, петролейный эфир и др. [36]. Между тем, существует некоторое количество лабораторных исследований,

посвященных изучению методов выделения фурукумаринов из зонтичных растений с помощью сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ) [37, 38]. Метод СФЭ по праву считается более экологичным, более экономичным и более экспрессным методом извлечения различных биологически активных соединений из растительного сырья, нежели жидкостная экстракция. Все эти преимущества относятся и к процессам извлечения фурукумаринов из различных частей растений семейства зонтичных [37, 38]. Однако до сих пор в отношении методик экстракции фурукумаринов из семян *Atmi Majus* проводились лишь исследования в области жидкостной экстракции [39—44, 35]. В данной работе мы предлагаем методику сверхкритической флюидной экстракции из семян *Atmi Majus*, а также методику разделения и выделения основных фурукумаринов из тотального экстракта с помощью сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы и материалы

Семена *Atmi Majus* были предоставлены М.В. Мошным (МИФИ). Непосредственно перед проведением экстракции семена перетирали в ступке и отбирали фракцию диаметром частиц от 1 до 3 мм.

В качестве экстрагента использовали диоксид углерода марки «пищевой» (99,8 %, ОАО «Линде Газ Рус»). В качестве соразворителя-модификатора флюида в сверхкритической экстракции использовали этанол марки Ч (99,9 %, ЗАО «Ферейн»).

В качестве основного компонента подвижной фазы в сверхкритической флюидной хроматографии использовали диоксид углерода марки ОСЧ (99,995 %, ОАО «Линде Газ Рус»). В качестве соразворителя-модификатора флюида, а также для приготовления растворов проб стандартов сравнения для СФХ использовали этанол марки ХЧ (99,98 %, ЗАО «Ферейн»).

Стандарты 5-МОП и 8-МОП были приобретены в Merck & Co и использовались без дополнительной очистки.

### Сверхкритическая флюидная экстракция

Экстракцию осуществляли с помощью лабораторного сверхкритического экстрактора SFE 1000 производства компании Thar Technologies Inc. (Питтсбург, США). Экстрактор представляет собой полностью укомплектованную систему для проведения опытов по изучению как проточного, так и стационарного режимов экстракции. В сосуд емкостью 200 мл загружали навеску предварительно измельченных семян массой 50,0 г. Сосуд герметизировали, в систему подавали диоксид углерода из баллона. После нагнетания во всей системе давления, равного входящему давлению из баллона, включали нагреватель экстракционного сосуда, выжидали 10 минут для предварительного нагрева, после чего запускали систему. При запуске одновременно включаются оба насоса: насос CO<sub>2</sub>, работа которого контролируется массовым расходомером Кориолиса, и насос соразворителей, а также все оставшиеся до этого неактивными термостатируемые блоки. Во всех опытах величину скорости потока флюида поддерживали одинаковой и равной 50 г/мин, количество соразворителя во флюиде поддерживали равным 10 %. После установления в системе необходимого давления и, соответственно, начала выхода отработавшего газа из выходного отверстия сборника фракций

устанавливали требуемое значение давления в сборнике с помощью ручного регуляторного клапана. Во всех опытах последняя величина устанавливалась равной 10 бар. Временем начала экстракции считали время выхода на режим всех рабочих параметров системы. Количество пропущенного через сырье флюида контролировали с помощью массового расходомера. По окончании процесса перекрывали ток диоксида углерода из баллона и полностью сбрасывали давление в системе, пропуская выходящий флюид через сборник фракций. После этого извлекали полученный продукт из сборника фракций с помощью донного крана. При исследовании зависимости выхода фурукумаринов от времени экстрагирования отбор всего накопленного продукта проводили не в конце всего эксперимента, а через каждые 20 минут, после чего процесс перезапускали повторно. Полученные экстракты дегазировали в течение суток, храня их в месте, защищенном от света, во избежание инициации процессов фотодеструкции фурукумаринов. Выход извлекаемых псораленов определяли с помощью СКФ-хроматографии.

### **Сверхкритическая флюидная хроматография**

Хроматографический анализ и разделение полученных смесей производили с использованием полупрепаративного сверхкритического флюидного хроматографа SD-SFC14 Investigator производства компании Thar Technologies Inc. (Питтсбург, США). Трехходовой поршневой насос высокого давления с сапфировыми стержнями обеспечивает стабильную подачу сжатого диоксида углерода под большим давлением на относительно малых скоростях потока (до 10 мл/мин). Насос соработчиков позволяет переключаться между различными источниками модификаторов флюида в автоматическом режиме. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в петлю объемом 100 мкл. При отработке параметров разделения фурукумаринов использовали режим частичного ввода пробы, подавая до 30 мкл раствора за одну инъекцию. При накоплении индивидуальных веществ использовали режим инъекции полной петли. Детектирование осуществляли с использованием монохроматического УФ-детектора на длине волны 235 нм. Контроль давления в системе осуществлялся с помощью автоматического регулятора обратного давления. В качестве неподвижной фазы использовали насадочную нормально-фазовую колонку Kromasil Silica (250 × 4,6 мм, 60 Å). Накопление индивидуальных компонентов осуществляли с помощью автоматизированной системы сбора фракций.

После первоначального установления измененных условий разделения выжидали 40 минут в стационарном режиме, после чего приступали к введению проб. Каждую инъекцию повторяли как минимум трижды до достижения воспроизводимых значений времен удерживания компонентов. Первоначальную идентификацию 5-МОП и 8-МОП проводили методом внутреннего стандарта, отношение 5,8-диМОП осуществляли по остаточному принципу. Идентификацию минорных компонентов экстрактов не проводили.

Калибровочные графики зависимости площадей пиков от концентрации для бергаптена и ксантотоксина строили в предположении о линейном характере зависимости. Аппроксимацию вели по трем точкам с наложением условия наличия на графике точки с координатами (0; 0). Стандартные этанольные растворы 5-МОП и 8-МОП концентрациями  $1,2 \cdot 10^{-4}$  М разбавляли в 2 и 4 раза, каждый из трех полученных растворов вводили в систему. Каждый опыт повторяли как минимум 10 раз. На основании средних значений площадей пиков строили калибровочные графики, по которым впоследствии определяли концентрации бергаптена и ксантотоксина в извлекаемых экстрактах.

## ЯМР

Регистрацию спектров  $^1\text{H}$  ЯМР индивидуальных фурукумаринов осуществляли с помощью спектрометра Bruker AD-360. В качестве растворителя использовали  $\text{CDCl}_3$  марки ХЧ с изотопной чистотой 99,8 % по дейтерию. Использовались следующие параметры регистрации спектров:  $\text{AQ} = 1,1 \text{ с}$ ,  $\text{TS} = 16384$ ,  $\text{NS} = 128$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Сверхкритическая флюидная экстракция семян *Ammi Majus*

Были получены оценки зависимостей выхода каждого из трех основных фурукумаринов от количества пропущенного флюида, давления и температуры. На рис. 2 приведены зависимости выходов от количества флюида, то есть, с учетом постоянства скорости потока, от времени экстракции. График приведен в дифференциальном виде: каждой точке соответствует площадь того или иного фурукумарина только в пробе, отобранной по прошествии очередных 20 минут экстракции, но не в суммарно накопленном продукте.

Пик скорости извлечения всех трех целевых компонентов приходится на интервал 80 ÷ 100 минут. По прошествии 2 часов при скорости потока 50 г/мин извлечение фурукумаринов практически становилось пренебрежимо малым.

На рис. 3 приведены зависимости выхода фурукумаринов от давления при постоянных температуре и времени экстракции. Степень извлечения всех трех псораленов при повышении давления в интервале 250 ÷ 550 бар монотонно возрастает. Скорость этого роста заметно различается на интервалах 250 ÷ 350 бар и 350 ÷ 550 бар. Особенно резко этот эффект проявляется для 8-МОП.

Графики зависимости степени извлечения всех трех основных фурукумаринов от температуры в интервале 40 ÷ 80 °С (см. рис. 4) имеют вид гладких монотонных кривых с небольшим подъемом. Кривые, соответствующие 5-МОП и 5,8-ди-МОП, практически симбатны. Кривая для 8-МОП имеет более резкий подъем в интервале 40 ÷ 50 °С, при более высоких температурах отличия ее от двух других кривых сглаживаются практически полностью.

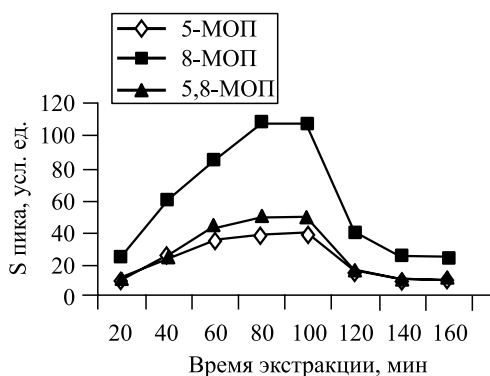


Рис. 2. Зависимости выходов 5-МОП, 8-МОП и 5,8-МОП от времени экстракции при постоянной скорости потока флюида

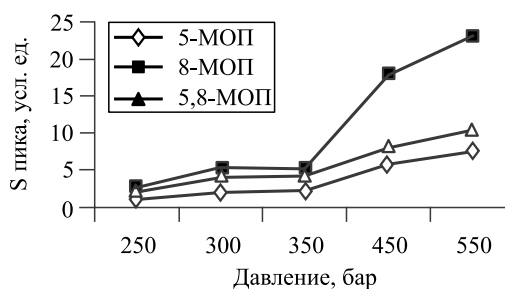


Рис. 3. Зависимости выходов 5-МОП, 8-МОП и 5,8-МОП от давления при постоянной температуре и времени экстракции

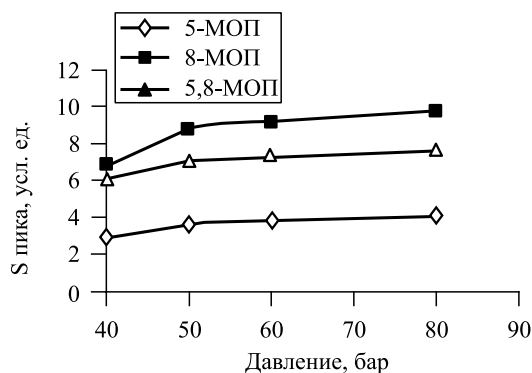


Рис. 4. Зависимости степени извлечения 5-МОП, 8-МОП и 5,8-МОП от температуры в интервале 40—80 °С

### Сверхкритическая флюидная хроматография экстрактов семян *Ammi Majus*

При концентрациях фурукумаринов в растворе, не превышающих  $10^{-4}$  моль/л, полного хроматографического разделения трех исследуемых компонентов экстрактов за минимальное время удается достичь в следующих условиях: 100 бар, 35 °С, состав подвижной фазы 99 %  $\text{CO}_2$  + 1 % EtOH, скорость потока 4 мл/мин. В данных условиях времена удерживания фурукумаринов на колонке Silica равны 12,1 мин для 5-МОП, 15,5 мин для 8-МОП и 16,4 мин 5,8-диМОП.

Типичная хроматограмма СК экстракта *Ammi Majus* приведена на рис. 5.

Для накопления индивидуальных компонентов из экстрактов была отработана более «растянутая» схема разделения. При объеме инъекции больше 50 мкл и суммарной концентрации трех фурукумаринов в исследуемом растворе больше  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л разделения, позволяющего вести накопление индивидуальных компонентов из смеси с помощью автоматизированной системы сбора фракций,

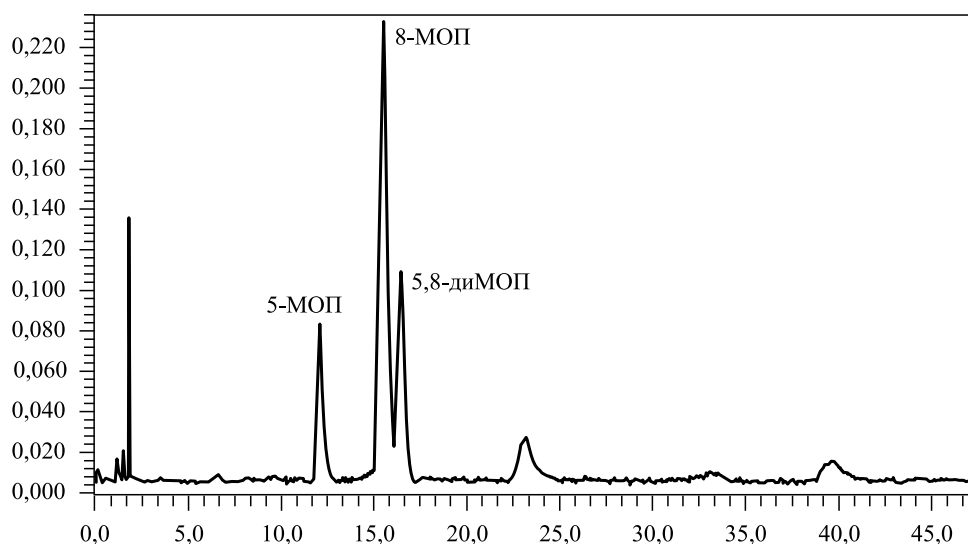


Рис. 5. Типичная хроматограмма СК экстракта *Ammi Majus*



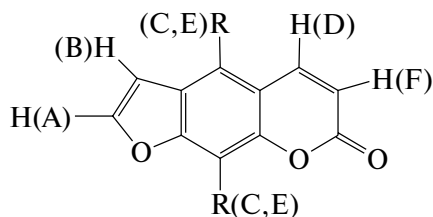


Рис. 6. Обозначение протонов в молекулах фурукумаринов

удалось достичь в следующих условиях: 120 бар, 35 °С, состав подвижной фазы 99 % CO<sub>2</sub> + 1 % EtOH, скорость потока 2 мл/мин. Времена удерживания искомым псораленов в данных условиях оказываются равными 25,5 (5-МОП), 33,2 (8-МОП) и 35,7 (5,8-диМОП) мин.

### Идентификация индивидуальных компонентов с помощью спектроскопии <sup>1</sup>H ЯМР

Структура накопленных образцов фурукумаринов была подтверждена с помощью спектроскопии ЯМР. Были зарегистрированы следующие спектры:

1)  $\delta(E) = 4.27$  (3 H, синглет);  $\delta(F) = 6.28$  (1 H, дублет,  $J_{DF} = 9,73$  Гц);  $\delta(B) = 7.02$  (1 H, дублет дублетов,  $J_{AB} = 2,22$  Гц,  $J_{BD} = 0,88$  Гц);  $\delta(C) = 7.15$  (1 H, синглет);  $\delta(A) = 7.59$  (1 H, дублет,  $J_{AB} = 2,21$  Гц);  $\delta(D) = 8.16$  (1 H, дублет дублетов,  $J_{DF} = 9,74$  Гц,  $J_{BD} = 0,88$  Гц). В соответствии с данными работы [45] соединение было идентифицировано как бергаптен.

2)  $\delta(E) = 4.30$  (3 H, синглет);  $\delta(F) = 6.37$  (1 H, дублет,  $J_{DF} = 9,74$  Гц);  $\delta(B) = 6.82$  (1 H, дублет,  $J_{AB} = 2,21$  Гц);  $\delta(C) = 7.34$  (1 H, синглет);  $\delta(A) = 7.69$  (1 H, дублет,  $J_{AB} = 2,21$  Гц);  $\delta(D) = 8.16$  (1 H, дублет,  $J_{DF} = 9,73$  Гц). В соответствии с данными работы [45] соединение было идентифицировано как ксантотоксин.

3)  $\delta(E,C) = 4.17$  (6 H, синглет);  $\delta(F) = 6.29$  (1 H, дублет,  $J_{DF} = 9,73$  Гц);  $\delta(B) = 7.00$  (1 H, дублет,  $J_{AB} = 2,21$  Гц);  $\delta(A) = 7.63$  (1 H, дублет,  $J_{AB} = 2,22$  Гц);  $\delta(D) = 8.12$  (1 H, дублет,  $J_{DF} = 9,73$  Гц). В соответствии с данными работы [45] соединение было идентифицировано как изопимпинеллин.

Зарегистрирована ранее не описанная константа дальней связи в спектре бергаптена. Мы полагаем, что константа характеризует спин-спиновое взаимодействие ядер В и D (см. рис. 6) и, таким образом, является константой через 6 связей, однако эти данные нуждаются в более детальном изучении.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Сверхкритическая флюидная экстракция

Проведенные эксперименты показали, что СФЭ может служить методом извлечения фурукумаринов из измельченных семян *Atmi Majus*. Качественный состав получаемых экстрактов соответствует аналогам, извлекаемым с помощью жидкостной экстракции [39 — 44, 35]. Основными тремя компонентами являются бергаптен, ксантотоксин и изопимпинеллин. Наибольшей степени извлечения фурукумаринов удастся достичь при использовании давления 550 бар и температуры 80 °С. Давление существенно влияет на степень извлечения, особенно при значениях выше 300 бар. При этом наибольшее влияние данный фактор оказыва-

ет на экстракцию ксантотоксина. Если при давлении, равном 350 бар, концентрация 8-МОП в получаемых экстрактах лишь чуть выше концентрации 5,8-ди-МОП, то при переходе к 550 бар концентрации этих двух псораленов в экстрактах отличаются уже в 2,5 раза. Влияние температуры на степень извлечения гораздо менее значительно. Фактически разница массового выхода фурукумаринов при 50 и 80 °С пренебрежимо мала, существенные отличия наблюдаются лишь в интервале температур 40 ÷ 50 °С. В ряде работ, посвященных химии фурукумаринов, отмечалось, что данные соединения обладают достаточно высокой термоллабильностью и могут разлагаться уже при температурах выше 60 °С [17]. Соответственно при проведении экстракции при температурах выше 60 °С можно было бы ожидать появления дополнительных компонентов в получаемых продуктах в результате термического распада основных. Однако в этих условиях мы не наблюдали никаких дополнительных пиков на хроматограммах, которые могли бы подтвердить это предположение. При этом нами не проводилась идентификация компонентов экстрактов с временами удерживания больше времен удерживания трех основных фурукумаринов, поэтому полностью исключать возможность термодеструкции псораленов в ходе сверхкритической экстракции при относительно высоких температурах на данный момент нельзя. В экспериментах по влиянию давления и времени экстракции мы выдерживали температуру равной 60 °С.

Разработанная методика анализа экстрактов с помощью СКФ хроматографии позволяет быстро оценивать количественный состав вытяжек не только из семян, но и из любых других частей *Ammi Majus*, а также разнообразных лекарственных средств, изготавливаемых на его основе. Методика может быть востребована в качестве экспрессного метода анализа вытяжек из данного растения для проведения исследований вклада различных фурукумаринов в защитную функцию всего псораленового комплекса *Ammi Majus*. С использованием разработанной полупрепаративной методики были накоплены образцы трех основных фурукумаринов для проведения клинических испытаний. С их помощью в частности будет проведено исследование активности изопимпинеллина в ПУФА-терапии, что позволит дать ответ на вопрос о целесообразности его включения в состав одобренных препаратов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика экстракции семян зонтичного растения *Ammi Majus* с помощью сверхкритического диоксида углерода. Методика позволяет извлекать основные фурукумарины, входящие в состав данного растения. Разработанная методика определения этих веществ с использованием сверхкритической флюидной хроматографии позволяет проводить экспрессную оценку содержания бергаптена, ксантотоксина и изопимпинеллина в экстрактах растений, а также в коммерчески реализуемых препаратах, изготавливаемых на их основе. Накопленные с ее помощью препараты переданы на клинические испытания, могущие пролить свет на вопрос о механизме биологического действия ПУФА-терапии, а также о правомочности использования изопимпинеллина в лечебной практике.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 08-02-00528 а.

Авторы выражают сердечную признательность за регистрацию спектров ЯМР Дмитрию Чешкову (ГНИИХТЭОС).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Johnson C., Brannon D.R., Ku J. *Phytochemistry*. 1973. Vol. 12. No. 12. P. 2961.
2. Beier R.C., Oertly E.H. *Phytochemistry*. 1983. Vol. 22. No. 11. P. 2595.
3. Beier R.C., Ivie G.W., Oertly E.H. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 1983. Vol. 234. P. 295.
4. Chandra P., Marciani S., Dall'acqua F., Vedaldi D., Rodighiero G., Diswa R.K. *FEBS Lett.* 1973. Vol. 35. No. 2. P. 243.
5. Parsons B.J. *Photochem. Photobiol.* 1980. Vol. 32. No. 6. P. 813.
6. Song P.-S., Tapley K.J. *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29. No. 6. P. 1177.
7. Musajo L., Bordin F., Caporale G., Marciani S., Rigatti G. *Photochem. Photobiol.* 1967. Vol. 6. No. 10. P. 711.
8. Musajo L., Bordin F., Bevilacqua R. *Photochem. Photobiol.* 1967. Vol. 6. No. 12. P. 927.
9. Dall'acqua F., Marciani S., Rodighiero G. *FEBS Lett.* 1970. Vol. 9. No. 2. P. 121.
10. Fitzpatrick T.B., Pathak M.A. *J. Invest. Dermatol.* 1959. Vol. 32. No. 2. P. 229.
11. Hoernle A.F.R. *Studies in Medicine of Ancient India*. Bower Manuscript. Calcutta, Government Printing, India. 1893—1912. Цитировано по [10].
12. Laufer B. *Sino-Iranica, Anthropological Series*. 1874. Vol. XV. No. 3. Field Museum of Natural History, Chicago. Цитировано по [10].
13. Pathak M.A., Fitzpatrick T.B. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1992. Vol. 14. No. 1. P. 3.
14. Wischahn G.P., Moore P.A., Lin L., Corash L. *Photochem. Photobiol.* 1991. Vol. 53. No. 1. P. 40.
15. Lowe N.J., Cripps D.J., Dutton P.A. *Arch. Dermatol.* 1979. Vol. 115. No. 1. P. 50.
16. Armus S., Keyes B., Cahill C., Berger C. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1990. Vol. 23. No. 5. P. 898.
17. Kitamura N., Kohtani Sh., Nakagaki R. *J. Photochem. Photobiol. C*. 2005. Vol. 6. No. 2—3. P. 168.
18. Zarebska Z., Waszkowska E., Caffieri S., Dall'acqua F. *Il Farmaco*. 2000. Vol. 55. No. 8. P. 515.
19. Godar D.E. *J. Invest. Dermatol.* 1999. Vol. 112. No. 1. P. 3.
20. Marks D.I., Fox R.M. *Biochem. Cell. Biol.* 1991. Vol. 69. No. 10. P. 754.
21. Vallat V.P., Gilleaudeau P., Battat L., Wolfe J., Nabeya R., Heflner N., Hodak E., Gottlieb A.B., Krueger J.G. *J. Exp. Med.* 1994. Vol. 180. No. 1. P. 283.
22. Rodighiero G., Dall'acqua F., Marciani S. *Biophysik*. 1971. Vol. 8. No. 1. P. 1.
23. Аносов А.К., Гончуков С.А., Мошнин М.В., Паренаго О.О., Покровский О.И. *Альманах клинической медицины*. 2008. Т. 17. Ч. 2. С. 26.
24. Sah P., Agarwal D., Garg S.P. *Indian J. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 68. No. 6. P. 768.
25. Фармакопейная статья ЗАО «Фармцентр Вилар». ТУ № 42-1312-83 от 28 марта 1983 г.
26. Honigsmann H., Jaschke E., Gschnait F., Brenner W., Fritsch P. *Br. J. Dermatol.* 1979. Vol. 101. No. 4. P. 369.
27. Tanew A., Bernard O., Rappersberger K., Honigsmann H. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1988. Vol. 18. No. 2. P. 333.
28. Fitzpatrick T.B., Pathak M.A., Lowe N.I., Baughman R.D., Bernhard J.D. *US FDA Investigational IND 32213*. 1989—1991.
29. Pathak M.A., Fellman J.H. *Nature*. 1960. Vol. 185. No. 4710. P. 382.
30. Fitzpatrick T.B., Pathak M.A. *J. Invest. Dermatol.* 1959. Vol. 32. No. 2. P. 255.
31. Kavli G., Krokan H., Midelfart K., Volden G., Raa J. *Photobiochem. Photobiophys.* 1983. Vol. 5. P. 159.
32. Napolitano H.B., Silva M., Ellena J., Rocha W.C., Vieira P.C., Thiemann O.H., Oliva G. *Acta Crystallogr. E*. 2003. Vol. 59. No. 10. P. o1506.
33. Altamirano-Dimas M., Hudson J.B., Towers G.H.N. *Photochem. Photobiol.* 1986. Vol. 44. No. 2. P. 187.
34. Ivie G.W., Beier R.C. *Photochem. Photobiol.* 1996. Vol. 63. No. 3. P. 306.
35. Ivie G.W. *J. Agric. Food Chem.* 1978. Vol. 26. No. 6. P. 1394.
36. Lozhkin A.V., Sakanyan E.I. *Pharm. Chem. J.* 2006. Vol. 40. No. 6. P. 47.
37. Kerrola K., Galambosi B., Kallio H. *J. Agric. Food Chem.* 1994. Vol. 42. No. 9. P. 1979.
38. Wang X., Wang Y., Yuan J., Sun Q., Liu J., Zheng Ch. *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1055. No. 1—2. P. 135.
39. Starkowsky N.A., Bardan N. *J. Org. Chem.* 1958. Vol. 23. No. 11. P. 1818.
40. Abdel-Hay F.M., Abu-Mustafa E.A., Fayed M.B.E. *Naturwissenschaften*. 1966. Vol. 53. No. 16. P. 406.

41. Abu-Mustafa E.A., El-Bay F.K.A., Fayed M.B.E. *Naturwissenschaften*. 1974. Vol. 62. No. 1. P. 39.
  42. Elgamal M.H.F., Shalaby N.M.M., Duddeck H., Hiegemann M. *Phytochemistry*. 1993. Vol. 34. No. 3. P. 829.
  43. Exiert H., Gomolka E. *Pharmazie*. 2000. Vol. 55. No. 9. P. 684.
  44. Garcia C., Moyna P., Fernandez G., Heizen H. *Chemoecology*. 2002. Vol. 12. No. 2. P. 107.
  45. Liu R., Feng L., Sun A., Kong L. J. *Chromatograph. A*. 2004. Vol. 1055. No. 1–2. P. 71.
- 
- 

## SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION AND SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY OF FUROCUMARINS FROM *AMMI MAJUS*

<sup>1</sup>O. I. Pokrovskiy, <sup>2</sup>A. A. Markolia, <sup>1</sup>F. D. Lepeshkin, <sup>1</sup>I. V. Kuvykin,  
<sup>1</sup>O. O. Parenago, <sup>2</sup>S. A. Gonchukov

<sup>1</sup>*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Moscow Engineering Physics Institute (State University), Moscow, Russia*

A method of supercritical fluid extraction of furocoumarin components from the seeds of apiaceous plant *Ammi Majus* is developed. Linear furocoumarins from *Ammi Majus*: bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin — are used as photosensitizers in PUVA-therapy — photochemotherapy of various skin diseases. A method for chromatographic detection and separation of these furocoumarins using supercritical fluid chromatography is established.

Key words: supercritical fluid extraction, supercritical fluid chromatography, *Ammi Majus*, bergapten, xanthotoxin, isopimpinellin.

---

---