

УДК 547.99+615.015.43

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ α -АМИЛАЗЫ ИЗ *Rhaponticum uniflorum*

© 2023 г. Д. Н. Оленников¹*, Н. И. Кащенко¹

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Основной стратегией лечения сахарного диабета является контроль постпрандиального уровня глюкозы, в связи с чем α -амилаза поджелудочной железы, гидролизующая сложные углеводы, является важной ферментативной мишенью для научных исследований. В настоящем исследовании водный экстракт и его этилацетатная фракция (ЭАФ) из семян *Rhaponticum uniflorum* оказывали выраженный ингибиторный эффект на активность панкреатической α -амилазы человека. В результате хроматографического разделения из ЭАФ впервые были выделены и охарактеризованы 16 метаболитов, включая 4-*O*-, 5-*O*-, 3,4-ди-*O*-, 3,5-ди-*O*-, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 6-гидроксилитеолин 7-*O*-глюкозид, раунозид В, лютеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид, лютеолин, картамозид, картамогенин, трахелозид, изоферулоил-серотонин, 20-гидроксиэкдизон, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон и новое природное соединение, которое представляло собой картамогенин 4-*O*-(6"-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид (6"-*O*-ацетил-картамозид). Данные количественной ВЭЖХ указывали на различное распределение индивидуальных компонентов между эндоспермом и кожурой семени. Исследование влияния соединений на активность панкреатической α -амилазы человека показало, что некоторые флавоноиды, кофеилхинные кислоты, лигнаны и производные серотонина оказывали выраженное ингибиторное действие. Полученные результаты подтверждают вывод о том, что семена *Rhaponticum uniflorum* могут быть полезным природным источником для разработки средств, ингибирующих α -амилазу.

Ключевые слова: *Rhaponticum uniflorum*, панкреатическая α -амилаза человека, ингибиторы, фенольные соединения

DOI: 10.31857/S0555109923010063, **EDN:** CUYJIV

Сахарный диабет является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, лечение которого без каких-либо побочных эффектов по-прежнему остается большой проблемой. Постпрандиальная гипергликемия, связанная с нарушением углеводного обмена, считается наиболее опасным фактором, вызывающим возникновение и постепенное ухудшение течения сахарного диабета [1]. Ингибиторы панкреатической α -амилазы, фермента играющего ключевую роль в расщеплении сложных углеводов, рассматриваются в качестве эффективных средств для профилактики и лечения таких метаболических расстройств как диабет и ожирение [2]. Растения являются важным источником химических соединений, способных подавлять активность α -амилазы и оказывать положительный биологический эффект на организм человека. В традиционной восточной медицине для лечения диабета применяли различные растительные средства, в том числе сибирский вид *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. (*Leuzea uniflora* (L.)

Holub, *Stemmacantha uniflora* (L.) Dittrich) семейства Compositae (Asteraceae), отвары семян которого использовались для лечения мочеизнурения [3]. Данные литературы указывают на присутствие в корнях и траве *R. uniflorum* экидистероидов [4], полисахаридов [5], сесквитерпенов [6], флавоноидов [4] и гидроксициннаматов [7], однако метаболиты семян *R. uniflorum* ранее не изучались. Продолжая поиски растительных ингибиторов α -амилазы [8], представляло интерес определить химические соединения – носители биологического эффекта семян *R. uniflorum* для их дальнейшего практического применения в качестве потенциальных противодиабетических агентов.

Цель работы – исследование химического состава отвара семян *R. uniflorum*, выделение основных соединений и определение их ингибиторного влияния на активность панкреатической α -амилазы человека.

МЕТОДИКА

Общие экспериментальные условия. Семена *R. uniflorum* были собраны в Прибайкальском районе (Республика Бурятия, Россия) и высушены в микроволновой вакуумной камере Муссон-1 ("ПК Ингредиент", Россия) до влажности <5%. Образец сырья хранится в гербарии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (№ ВУ-СОМ-0920/29-428).

Для колоночной хроматографии использовали полиамид, нормально- (SiO_2) и обращено-фазовый силикагель (ОФ- SiO_2), сефадекс LH-20, оксид алюминия (Al_2O_3) ("Sigma-Aldrich", Сент-Луис, США). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 ("ОКБ Спектр", Россия).

Масс-спектры регистрировали на TQ-масс-спектрометре LCMS-8050 ("Shimadzu", Япония) [7], спектры ЯМР – на спектрометре VXR 500S ("Varian", США). Препаративную ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence ("Shimadzu"), снабженном колонкой Shim-pak PREP-ODS (20 × 250 мм, d – 15 мкм) и фотодиодным детектором SPD-M30A ("Shimadzu"), при скорости – 1.0 мл/мин и температуре колонки 20°C.

Экстракция и выделение соединений из семян *R. uniflorum*. Измельченное сырье (1 кг) экстрагировали водой (1 : 15, 90°C) трижды, после чего водный экстракт упаривали досуха в вакууме (320 г). Экстракт обрабатывали последовательно гексаном, этилацетатом и бутанолом при температуре кипения в аппарате Соклета до истощения, что приводило к получению гексановой (20 г), этилацетатной (ЭАФ, 55 г) и бутанольной фракций (125 г). Фракцию ЭАФ далее анализировали методом хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием, ВЭЖХ-ДМД-МС) на TQ-масс-спектрометре LCMS-8050 ("Shimadzu", Япония) в условиях, описанных ранее [7]. Для выделения индивидуальных соединений ЭАФ (50 г) разделяли методом колоночной хроматографии на полиамиде (1.5 кг; элюент вода – фракция А, 60%-ный этанол – фракция В, 0.5%-ный аммиак в 90%-ном этаноле – фракция С). Фракцию А (25 г) хроматографировали на колонке с Al_2O_3 (2 × 50 см, хлороформ–метанол 100 : 0 → 70 : 30), а затем на колонке с ОФ- SiO_2 (1 × 20 см, вода–ацетонитрил 95 : 5 → 70 : 30), что привело к выделению 20-гидроксиэкдизона (10 г) и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона (140 мг).

Для разделения фракций В (15 г) и С (18 г) применяли колоночную хроматографию на Сефадексе LH-20 (2 × 90 см) с элюцией в градиенте метанол–вода 90 : 10 → 0 : 100, в результате чего были получены 10 фракций, которые далее хроматогра-

фировали на колонке с SiO_2 (2 × 40 см, этилацетат–этанол 100 : 0 → 70 : 30), а затем на колонках с ОФ- SiO_2 (1 × 20 см, вода–ацетонитрил 95 : 5 → 50 : 50) и Сефадексе LH-20 (1 × 60 см, метанол–вода–уксусная кислота 90 : 5 : 5 → 20 : 75 : 5). Для дополнительной очистки применяли препаративную ВЭЖХ, используя воду и ацетонитрил в качестве элюентов I и II, соответственно (программа элюирования: 0–40 мин 5–30% I в II, 40–90 мин 30–45% I в II, 90–120 мин 45–58% I в II). В результате из фракции В были выделены 6-гидроксилитеолин 7-*O*-глюкозид (1.5 г), трахелозид (1.0 г), картамозид (5.5 г), лютеолин (80 мг) и картамогенин (900 мг), а из фракции С – 6"-*O*-ацетил-картамозид (40 мг), 4-*O*-кофеилхинная кислота (80 мг), 5-*O*-кофеилхинная кислота (8.2 г), 3,4-ди-*O*-кофеилхинная кислота (55 мг), 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (4.5 г), 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (45 мг), раунозид В (1.2 г), лютеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид (1.5 г) и изоферулоил-серотонин (820 мг). Идентификацию выделенных соединений осуществляли по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии [4–7, 9].

6"-*O*-Ацетил-картамозид {картамогенин 4-*O*-(6"-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид, 15}. $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$,

УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 324. $[\alpha]_{20}^D$ –5.3 (с 0.7, MeOH). HR-ESI-MS, m/z : 573.421 ($[\text{M}-\text{H}]^-$; расчетное значение 573.557 для $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{O}_{12}$). ESI-MS, m/z : положительная ионизация – 613 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 597 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 575 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 571 $[(\text{M} + \text{K})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$, 555 $[(\text{M} + \text{Na})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$, 551 $\{[(\text{M} + \text{H}) + \text{H}_2\text{O}]-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}\}^+$, 533 $[(\text{M} + \text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$, 371 $[(\text{M} + \text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$, 353 $[(\text{M} + \text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}]^+$, 247, 219; отрицательная ионизация – 619 $[(\text{M}-\text{H}) + \text{НСООН}]^-$, 609 $[(\text{M}-\text{H}) + 2\text{H}_2\text{O}]^-$, 577 $\{[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}] + \text{НСООН}\}^-$, 573 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 567 $\{[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}] + 2\text{H}_2\text{O}\}^-$, 531 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$, 369 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$.

Спектр ЯМР ^1H (500 Гц, 300 К, MeOH- d_4 , δ , м.д.): картамогенин: 7.20 (1H, д, $J = 2.0$, H-2), 6.83 (1H, д, $J = 7.8$, H-5), 7.18 (1H, дд, $J = 7.8, 2.0$, H-6), 7.53 (1H, д, $J = 2.0$, H-7), 6.70 (1H, д, $J = 2.0$, H-2'), 7.26 (1H, д, $J = 8.0$, H-5'), 6.75 (1H, дд, $J = 8.0, 2.0$, H-6'),

3.01 (1H, дд, $J = 14.0, 5.6$, H-7'_A), 3.78 (1H, дд, $J = 14.0, 9.0$, H-7'_B), 4.11 (1H, м, H-8'), 4.41 (1H, дд, $J = 9.0, 7.0$, H-9'_A), 4.27 (1H, дд, $J = 9.0, 2.0$, H-9'_B), 3.85 (3H, с, OCH_3), 3.75 (3H, с, OCH_3), 3.70 (3H, с, OCH_3); 4-*O*-глюкоза: 5.05 (1H, д, $J = 7.5$, H-1"), 3.53 (1H, м, H-2"), 3.50 (1H, м, H-3"), 3.38 (1H, м, H-4"), 3.85 (1H, м, H-5"), 4.50 (1H, дд, $J = 12.0, 2.0$,

H-6"), 4.25 (1H, дд, $J = 12.0, 5.4$, H-6"_B); 6"-*O*-ацетил: 1.61 (3H, с, CH_3CO). Спектр ЯМР ^{13}C (125 Гц,

300 К, MeOH-*d*₄, δ , м.д.): картамогенин: 128.5 (С, С-1), 116.9 (СН, С-2), 150.7 (С, С-3), 149.5 (С, С-4), 113.1 (СН, С-5), 125.4 (СН, С-6), 138.7 (СН, С-7), 129.8 (С, С-8), 174.3 (С, С-9), 132.3 (С, С-1'), 114.3 (СН, С-2'), 149.2 (С, С-3'), 151.2 (С, С-4'), 115.3 (СН, С-5'), 121.8 (СН, С-6'), 38.0 (СН₂, С-7'), 41.5 (СН, С-8'), 71.5 (СН₂, С-9'); 4-*O*-глюкоза: 102.2 (СН, С-1"), 74.5 (СН, С-2"), 77.7 (СН, С-3"), 71.2 (СН, С-4"), 75.0 (СН, С-5"), 64.8 (СН, С-6"); 6"-*O*-ацетил: 19.7 (СН₃, СН₃СО), 170.5 (С, СН₃СО).

Картамозид (картамогенин 4-*O*- β -D-глюкопиранозид, 12). Спектр ЯМР ¹H (500 Гц, 300 К, MeOH-*d*₄, δ , м.д.): 4-*O*-глюкоза: 5.01 (1H, д, J = 7.6, H-1"), 3.50 (1H, м, H-2"), 3.47 (1H, м, H-3"), 3.35 (1H, м, H-4"), 3.43 (1H, м, H-5"), 3.58 (1H, дд, J = 12.1, 1.9, H-6"А), 3.40 (1H, дд, J = 12.1, 5.6, H-6"Б). Спектр ЯМР ¹³C (125 Гц, 300 К, MeOH-*d*₄, δ , м.д.): 4-*O*-глюкоза: 102.4 (СН, С-1"), 74.5 (СН, С-2"), 77.9 (СН, С-3"), 70.8 (СН, С-4"), 76.2 (СН, С-5"), 60.9 (СН, С-6").

Гидролиз. Для осуществления кислотного гидролиза навеску 6"-*O*-ацетил-картамозида (5 мг) нагревали с 2 М ТФУ (4 мл) при 100°C в течение 2 ч, далее гидролизат упаривали в вакууме досуха. Сухой остаток растворяли в 50%-ном этаноле (2 мл) и пропускали раствор через полиамидный картридж (3000 мг, "Capital Analytical", Великобритания), элюируя последовательно водой (50 мл; элюат I) и 70%-ным этанолом (100 мл; элюат II). Для выявления присутствия моносахаридов порцию элюата I дериватизировали 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном и анализировали методом ВЭЖХ, как описано ранее [10]. Для определения принадлежности моносахаридов к D- и L-ряду в элюате I использовали метод восстановительного аминирования с L-триптофаном [11] с последующим анализом методом ВЭЖХ [10]. Гидролиз с 0.5%-ной NaOH проводили как описано ранее [12].

Биологическая активность. Влияние экстрактов, фракций и индивидуальных соединений на активность α -амилазы изучали спектрофотометрическим методом [8] с использованием α -амилазы поджелудочной железы человека (400 ед./мл; "Lee Biosolutions", США), α -амилазы слюнной железы человека (тип IX-A, 3000 ед./мг белка; "Sigma-Aldrich") и α -амилазы поджелудочной железы свиной (тип I-A, 1000 ед./мг белка; "Sigma-Aldrich"). Акарбоза использовалась в качестве положительного контроля. Ингибиторная активность выражалась величиной IC₅₀ (концентрация, вызывающая 50% ингибирование активности фермента) в мкг/мл, которую определяли графически после построения зависимости ингибиторной активности от концентрации.

Для ВЭЖХ-микрофракционирования использовали условия хроматографического анализа,

указанные в работе [7], при которых отдельные фракции собирались каждые 30 с. После этого элюаты концентрировали досуха и растворяли в 50 мкл 50%-ного метанола, добавляли 50 мкл воды, 2.5 мл 2%-ной суспензии крахмала, окрашенного ремазол-бриллиантовым синим R ("Sigma-Aldrich"), 500 мкл α -амилазы поджелудочной железы человека (0.4 ед./мл), инкубировали 50 мин при 37°C. Оптическую плотность пробы определяли при длине волны 620 нм [8]. Элюаты с наиболее выраженным ингибированием фермента предотвращали образование синего комплекса, в противоположность неактивным пробам, которые давали интенсивное окрашивание. Отсутствие активности определялось для фракции со временем удерживания 0.5–1.0 мин.

Тест на летальность. Цисты *Artemia salina* (50 мг; "Арсал", Россия) инкубировали при 25°C в 1 л искусственной морской воды ("Sigma-Aldrich"), в которую через 24 ч вносили 15 мл 0.06%-ной суспензии дрожжей и продолжали инкубацию еще 48 ч. Для анализа на одну пробу отбирали 10 живых личинок *Artemia salina*, которых помещали в 5 мл искусственной морской воды, содержащей исследуемое вещество (20–2000 мкг/мл) или 0.9%-ный раствор NaCl (контроль). Через 24 ч проводили подсчет живых личинок, после чего рассчитывали показатель 50%-ной летальности с применением программы MediCalc ("MedCalc Software Ltd", Бельгия).

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимость различий средних определяли с помощью многогранового теста Дункана. Отличия при $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния водного отвара (ВО) *R. uniflorum* на активность трех α -амилаз млекопитающих показало, что он демонстрировал наибольшее ингибирование α -амилазы поджелудочной железы человека – IC₅₀ 397.11 мкг/мл (табл. 1). После экстракции ВО различными растворителями были получены фракции, из которых наиболее активной оказалась этилацетатная фракция (IC₅₀ 96.25 мкг/мл), для исследования которой было проведено ее разделение с применением хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-ДМД-МС) и колоночной хроматографии.

Согласно данным ВЭЖХ-ДМД-МС в этилацетатной фракции семян *R. uniflorum* было выявлено присутствие 16 соединений (1–16), идентификацию которых осуществляли по результатам определения хроматографической подвижности (рис. 1а), УФ-, масс-спектров (табл. 2) в сравнении с известными соединениями и данными ли-

Таблица 1. Показатели 50%-ного ингибирования активности (IC_{50} , мг/мл) α -амилазы млекопитающих препаратами из *R. uniflorum* (мг/мл \pm SD)

Препарат	α -Амилаза		
	поджелудочная железа человека	поджелудочная железа свиней	слюнные железы человека
Водный отвар (ВО)	397.11 \pm 12.42*	>500	495.63 \pm 15.84*
Гексановая фракция ВО	>500	>500	>500
Этилацетатная фракция ВО	96.25 \pm 2.98*	163.14 \pm 5.05*	126.03 \pm 3.52*
Бутанольная фракция ВО	363.15 \pm 11.25*	>500	402.56 \pm 11.65*
Акарбоза (вещество сравнения)	57.34 \pm 1.61	32.65 \pm 0.97	81.16 \pm 2.59

* Отличия достоверны при $p < 0.05$ в сравнении с группой акарбозы.

температуры, а также после выделения и анализа спектров ЯМР (рис. 2).

Компоненты 1, 2, 5, 6 и 8 обладали близким УФ-профилем, типичным для производных кофейной кислоты [13], а характер масс-спектров указывал на присутствие фрагмента хинной кис-

лоты ацилированного одним (1, 2) или двумя (5, 6, 8) ее остатками [4]. Учитывая хроматографическую подвижность компонентов в сравнении с веществами-референтами, указанные соединения были идентифицированы как 4-*O*-кофеилхинная (1), 5-*O*-кофеилхинная (2), 3,4-ди-*O*-ко-

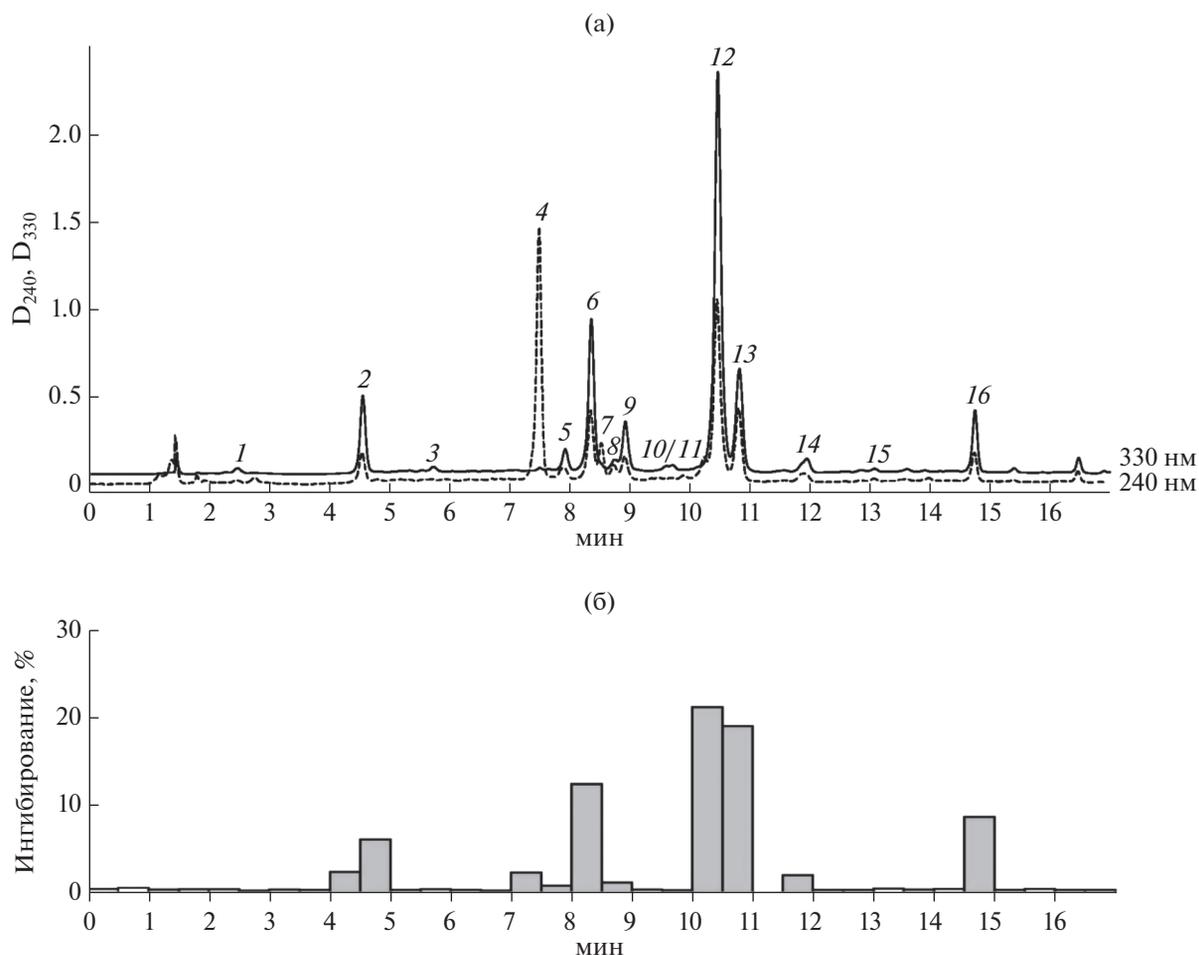


Рис. 1. Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) этилацетатной фракции семян *Rhaponticum uniflorum* при 240 и 330 нм (а) и ингибиторная активность ВЭЖХ-элюатов в отношении панкреатической α -амилазы (б). Номера пиков соединений соответствуют обозначениям в табл. 2.

Таблица 2. Хроматографическая подвижность (t_R), молекулярная формула, данные УФ- (λ_{max}) и масс-спектров соединений 1–14, 16 из семян *R. uniflorum*

№	Соединение	t_R , мин	Формула	УФ, λ_{max} , нм	Данные масс-спектров, m/z			
					положительная ионизация		отрицательная ионизация	
					$[M + H]^+$	дополнительные ионы	$[M - H]^-$	дополнительные ионы
1	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	2.48	$C_{16}H_{18}O_9$	326	—	355	353	191
2	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	4.51	$C_{16}H_{18}O_9$	326	—	355	353	707, 191
3	6-Гидроксилитеолин 7- <i>O</i> -глюкозид	5.79	$C_{21}H_{20}O_{12}$	271, 345	—	465	463	301
4	20-Гидроксиэклизон	7.47	$C_{27}H_{44}O_7$	241	—	481	479	525, 515
5	3,4-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	7.92	$C_{25}H_{24}O_{12}$	325	—	517	515	563, 353, 191
6	3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	8.39	$C_{25}H_{24}O_{12}$	325	—	517	515	563, 353, 191
7	2-Дезокси-20-гидроксиэклизон	8.52	$C_{27}H_{44}O_6$	243	—	465	463	509, 499
8	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	8.72	$C_{25}H_{24}O_{12}$	325	—	517	515	563, 353, 191
9	Трахелозид	8.90	$C_{27}H_{34}O_{12}$	280	—	551	549	595, 387
10	Раунозид В	9.58	$C_{30}H_{26}O_{13}$	253, 283, 347	—	595	593	463, 301
11	Лютеолин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -кофеил)-глюкозид	9.67	$C_{30}H_{26}O_{14}$	270, 295, 336	—	611	609	447, 285
12	Картамозид	10.45	$C_{27}H_{32}O_{11}$	325	—	533	531	577, 567, 369
13	Изоферулоил-серотонин	10.86	$C_{20}H_{20}N_2O_4$	292, 314	—	353	351	397, 175
14	Лютеолин	11.93	$C_{15}H_{10}O_6$	266, 345	—	287	285	—
16	Картамогенин	14.79	$C_{21}H_{22}O_6$	331	—	371	369	—

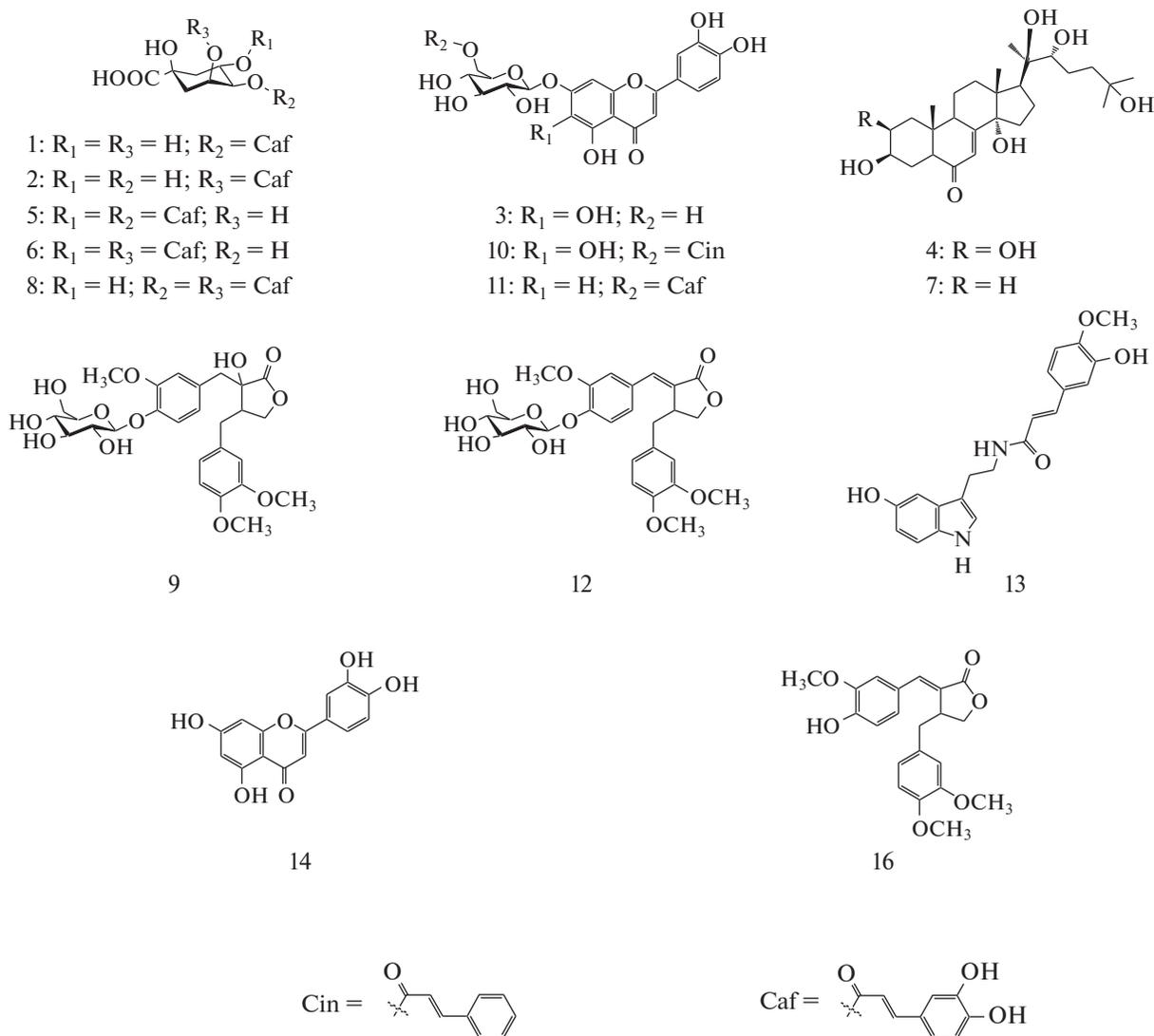


Рис. 2. Структурные формулы соединений, обнаруженных в семенах *R. uniflorum*: 1 – 4-*O*-кофеилхинная кислота, 2 – 5-*O*-кофеилхинная кислота, 3 – 6-гидроксилютеолин 7-*O*-глюкозид, 4 – 20-гидроксиэктодизон, 5 – 3,4-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 6 – 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 7 – 2-дезоксидеко-20-гидроксиэктодизон, 8 – 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 9 – трахелозид, 10 – раунозид В, 11 – лютеолин 7-*O*-(6''-*O*-кофеил)-глюкозид, 12 – картамозид, 13 – изоферулоил-серотонин, 14 – лютеолин, 16 – картамогенин.

феилхинная (5), 3,5-ди-*O*-кофеилхинная (6) и 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислоты (8).

Близким к кофеилхинным кислотам УФ-профилем обладали компоненты 12 и 16. В масс-спектре отрицательной ионизации соединения 12 присутствовали сигналы депротонированной частицы (m/z 531) и ее фрагмента, обусловленного удалением гексозильного остатка (m/z 369). В спектре положительной ионизации были отмечены сигналы частиц с m/z 247 и 219, характерных для лигнановых производных типа 7,8-дидегидроарктигенина [9]. После выделения и анализа спектров ЯМР соединение 12 было идентифицировано как картамозид (картамогенин-4-*O*-глюкозид), ранее выделенный из семян *Rhaponticum*

carthamoides [9] и впервые обнаруженный у *R. uniflorum*. Соединение 16 было определено как агликон картамозида – картамогенин. Близким к 12 масс-спектральным профилем обладал компонент 9, молекулярная масса которого была на 18 а.е.м. больше, что характерно для производных гидроксиарктигенина [9]. Хроматографические и спектральные параметры 9 и лигнанового гликозида трахелозид (трахелогенин-4-*O*-глюкозид) были идентичны, что позволило впервые выявить его присутствие в *R. uniflorum*. Данное соединение часто встречается в семенах различных видов *Compositae*, в том числе и *R. carthamoides* [9].

Соединение 13 обладало типичным для производных изоферуловой кислоты спектром поглоще-

нием с λ_{\max} у 292 и 314 нм, а также масс-спектральным профилем, отмеченным ранее для эфиров *N*-цинамоил-серотонина [9]. После выделения и дополнительной ЯМР спектральной характеристики 13 было идентифицировано как *N*-транс-изоферулоил-серотонин, впервые обнаруженный в *R. carthamoides* [9]. Ранее в *R. uniflorum* данное соединение выявлено не было.

Два соединения 4 и 7 были идентифицированы как экидистероиды по характерному для данной группы соединений УФ- и масс-спектрометрическому профилю. Компоненты содержали в масс-спектрах положительной ионизации набор сигналов, отнесенных к протонированной частице и частицам аддуктов с ионами Na^+ и K^+ , а также набор сигналов, вызванных постепенным удалением воды боковой группы и др. После сравнения с данными известных веществ 4 и 7 были идентифицированы как 20-гидроксиэкизон и 2-дезоксидеоксиэкизон, соответственно. Оба соединения ранее были обнаружены в траве и корнях *R. uniflorum* [7].

Соединения 3, 10, 11 и 14 были определены как флавоноиды ввиду характерного для производных флавоноидов типа поглощения в УФ-области спектра [13]. После анализа полученных данных с таковыми известными соединениями компоненты были определены как 6-гидроксилютеолин 7-*O*-глюкозид (3), раунозид В (10), лютеолин 7-*O*-(6''-*O*-кофеил)-глюкозид (11) и лютеолин (14), которые ранее были выявлены в листьях и цветках *R. uniflorum* [4], но обнаружены в семенах этого вида впервые.

Соединению 15 соответствовала молекулярная формула $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$ по данным масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР ^{13}C . В масс-спектре положительной ионизации присутствовали сигналы протонированного иона (m/z 575) и частиц, образованных последовательным удалением фрагмента ацетильной группы (m/z 575 \rightarrow 533) и остатка гексозы (m/z 533 \rightarrow 371), что так же наблюдалось в спектре отрицательной ионизации (рис. 3а, 3б). Спектр поглощения был близок к спектрам лигнановых гликозидов (рис. 3в). После гидролиза с 0.5%-ным NaOH наблюдалось образование картамозида, а гидролиз с 2 М ТФУ привел к образованию картамогенина и D-глюкозы. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были близки к таковым картамозида (картамогенин 4-*O*- β -D-глюкопиранозид) за исключением присутствия дополнительных сигналов ацетильной группы в спектре ^1H (δ_{H} 1.61) и ^{13}C (δ_{C} 19.7, 170.5) м.д. Сдвиг в слабое поле сигналов H-6'' (δ_{H} 3.40, 3.58 \rightarrow 4.25, 4.50) и C-6'' (δ_{C} 60.9 \rightarrow 64.8) в сравнении с картамозидом указывал на присутствие заместителя по положению C-6'' глюкопиранозы, которым оказалась ацетильная группа, на что указывали корреляции в спектре

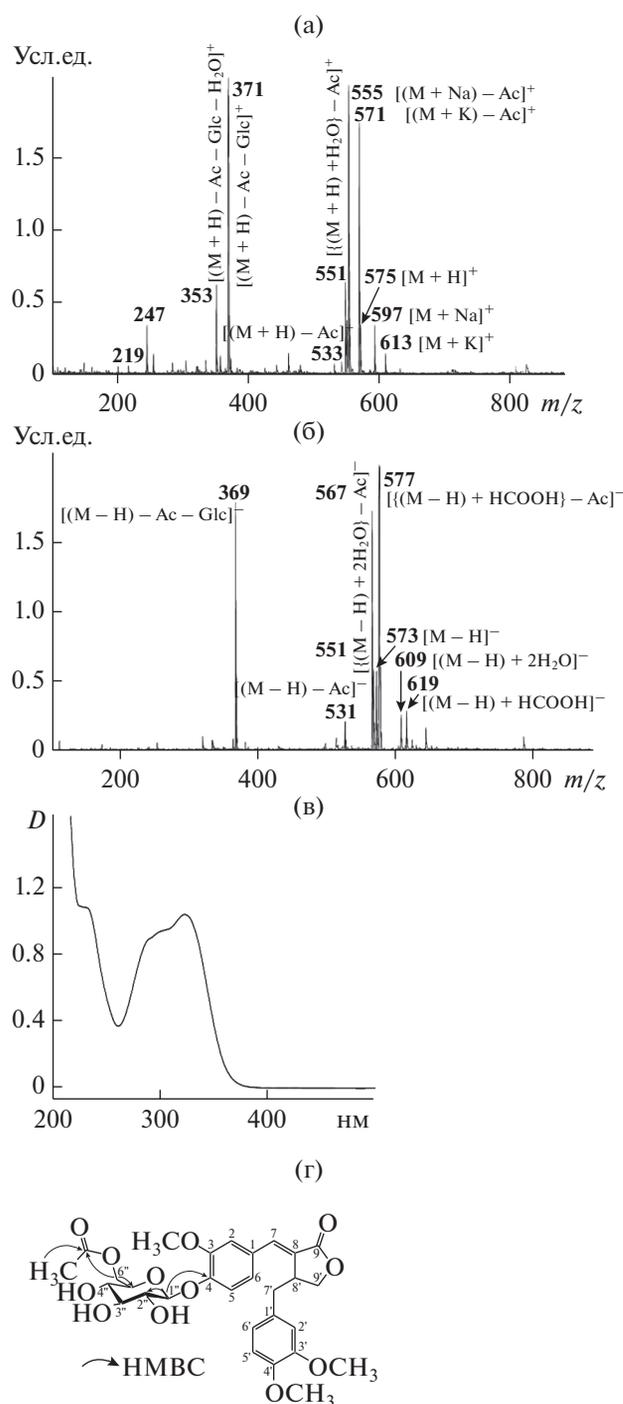


Рис. 3. Масс-спектры (а – положительная ионизация, б – отрицательная ионизация; Ас – ацетил, Glc – глюкоза), спектр поглощения (в) и структура (г) 6''-*O*-ацетил-картамозида (соединение 15).

гетероядерной многосвязной корреляционной спектроскопии НМВС ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3.40, 3.58/170.5). Таким образом, соединение 15 представляло собой картамогенин 4-*O*-(6''-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид или 6''-*O*-ацетил-картамозид (рис. 3г), являющийся новым природным соединением.

Таблица 3. Концентрация индивидуальных соединений в эндосперме и коже семян *R. uniflorum* и показатель ингибирования панкреатической α -амилазы человека (IC_{50})

Соединение	Концентрация, мг/г сухой массы		IC_{50} , мкг/мл
	в эндосперме	в коже	
Кофеилхинные кислоты			
4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	0.46 ± 0.01	<0.10	125.32 ± 3.70*
5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	1.48 ± 0.03	0.77 ± 0.02	67.11 ± 2.01*
3,4-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	0.57 ± 0.01	<0.10	61.02 ± 1.89*
3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	6.12 ± 0.12	4.01 ± 0.08	41.27 ± 1.19*
4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	0.26 ± 0.00	<0.10	26.84 ± 0.75*
Флавоноиды			
6-Гидроксилитеолин 7- <i>O</i> -глюкозид	3.05 ± 0.06	3.19 ± 0.07	28.14 ± 0.84*
Раунозид В	0.63 ± 0.01	2.39 ± 0.04	10.50 ± 0.30*
Литеолин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -кофеил)-глюкозид	0.71 ± 0.02	2.57 ± 0.05	14.83 ± 0.45*
Литеолин	< 0.10	1.07 ± 0.02	25.67 ± 0.77*
Лигнаны			
Трахелозид	5.48 ± 0.09	2.32 ± 0.04	>500
Картамозид	28.62 ± 0.65	3.41 ± 0.07	85.63 ± 2.09*
6"- <i>O</i> -Ацетил-картамозид	<0.10	<0.10	159.16 ± 4.77*
Картамогенин	0.75 ± 0.02	2.27 ± 0.04	30.32 ± 0.46*
Производные серотонина			
Изоферулоил-серотонин	<0.10	2.03 ± 0.03	50.02 ± 1.45*
Экдистероиды			
20-Гидроксиэкдизон	26.95 ± 0.56	6.12 ± 0.14	>500
2-Дезокси-20-гидроксиэкдизон	0.25 ± 0.00	<0.10	>500

* Отличия достоверны при $p < 0.05$ в сравнении с группой акарбозы ($IC_{50} = 57.34 \pm 1.61$ мкг/мл).

Сведения о количественном распределении отдельных соединений в частях семени *R. uniflorum* указывали на то, что для эндосперма характерно накопление кофеилхинных кислот (8.89 мг/г), лигнанов (34.85 мг/г) и экдистероидов (27.20 мг/г), в то время как в коже наблюдалось аккумуляция флавоноидов (9.78 мг/г) и производных серотонина (2.03 мг/г) (табл. 3). Ранее сходный характер распределения был выявлен в семенах *R. carthamoides*, для которых наибольшее содержание лигнанов трахелозида и картамозида было установлено в эндосперме, а ферулоил-серотонина – в коже семян [14].

Проведенные исследования биологической активности индивидуальных соединений из семян *R. uniflorum* показали, что наиболее эффективными ингибиторами панкреатической α -амилазы человека были раунозид В (IC_{50} 10.50 мкг/мл) и литеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид (IC_{50} 14.83 мкг/мл), активность которых была выше таковой акарбозы (табл. 3). Оба флавоноида содержали свободную орто-дигидрокси-группировку в кольце В агликона и кофеильном фрагменте, что является структурным фактором, повышающим ингиби-

торное влияние соединений на α -амилазу [15]. Среди кофеилхинных кислот и лигнанов наибольшая эффективность была выявлена для 4,5-ди-*O*-кофеилхинной кислоты (IC_{50} 26.84 мкг/мл) и картамогенина (IC_{50} 30.32 мкг/мл).

Активность изоферулоил-серотонина была близка к таковой акарбозы, а экдистероиды и трахелозид слабо ингибировали активность α -амилазы поджелудочной железы человека ($IC_{50} > 500$ мкг/мл). Применение ВЭЖХ-микрофракционирования с последующим анализом активности полученных элюатов показало, что наибольший вклад в суммарную активность отвара семян *R. uniflorum* вносило присутствие картамозида, изоферулоил-серотонина, 3,5-ди-*O*-кофеилхинной кислоты, картамогенина и 5-*O*-кофеилхинной кислоты (до 86% от суммарной активности пробы), что обусловлено высоким содержанием указанных соединений в препарате (рис. 16).

С использованием теста на летальность с *Artemia salina* была определена токсичность выделенных соединений, составившая >1000 мкг/мл для всех веществ, что позволило предположить относительную безопасность при их применении.

Научные сведения, касающиеся эффективности ингибирования α -амилазы фенольными соединениями растений, в большей своей части получены в результате использования ферментов бактериального (*Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*), грибного (*Aspergillus oryzae*) происхождения, а также α -амилазы поджелудочной железы свиньи и слюнной железы человека [2]. Эксперименты, проведенные с применением α -амилазы поджелудочной железы человека немногочисленны, однако известно, что бисдеметоксикуркумин [16], дегидродиэвгенол В [17] и ругозин D [8] характеризуются наибольшей эффективностью ингибирования фермента со значениями IC_{50} 7.70, 9.68 и 30.84 мкг/мл соответственно. Однако, следует отметить, что токсичность куркуминоидов, производных эвгенола и эллаготаннинов группы ругозина, определенная методом с *Artemia salina*, составляла <1000 [18], <1 [19] и <100 мкг/мл [20] соответственно, что характеризовало эти соединения как более токсичные в сравнении с метаболитами семян *R. uniflorum*.

Проведенные исследования впервые показали, что водный отвар семян *R. uniflorum* является эффективным ингибитором панкреатической α -амилазы человека, что обусловлено высоким содержанием фенольных соединений различных структурных типов. Наибольшим ингибиторным действием обладали раунозид В, лютеолин 7-*O*-(6''-*O*-кофеил)-глюкозид, лютеолин, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 6-гидроксилутоолин 7-*O*-глюкозид и картамогенин, активность которых установлена впервые. Эти соединения могут быть использованы для создания новых потенциальных антидиабетических средств, получаемых из растений.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № 121030100227-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alam S., Sarker M.M.R., Sultana T.N., Chowdhury M.N.R., Rashid M.A., Chaity N.I. et al. // Front. Endocrinol. 2022. V. 13. № 800714. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.800714>
2. Sales P.M., Souza P.M., Simeoni L.A., Magalhães P.O., Silveira D. // J. Pharm. Pharm. Sci. 2009. V. 15. P. 141–183. <https://doi.org/10.18433/j35s3k>
3. Баторова С.М., Яковлев Г.П., Асеева Т.А. Справочник лекарственных растений традиционной тибетской медицины. Новосибирск: Наука, 2003. 291 с.
4. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Chem. Nat. Comp. 2019. V. 55. P. 256–264. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02662-2>
5. Olennikov D.N. // Chem. Nat. Comp. 2018. V. 54. P. 751–754. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2462-4>
6. Olennikov D.N. // Chem. Nat. Comp. 2019. V. 55. P. 157–159. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02642-6>
7. Shantanova L.N., Olennikov D.N., Matkhanov I.E., Gulyaev S.M., Toropova A.A., Nikolaeva I.G., Nikolaev S.M. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. № 1186. <https://doi.org/10.3390/ph14111186>
8. Olennikov D.N., Chemposov V.V., Chirikova N.K. // Plants. 2021. V. 10. № 2525. <https://doi.org/10.3390/plants10112525>
9. Harmatha J., Buděšínský M., Vokáč K., Pavlík M., Grüner K., Laudová V. // Collect. Czech. Chem. Commun. 2007. V. 72. P. 334–346. <https://doi.org/10.1135/cccc20070334>
10. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kashchenko N.I., Gornostai T.G., Selyutina I.Y., Zilfikarov I.N. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 2579. <https://doi.org/10.3390/ijms18122579>
11. Akabane M., Yamamoto A., Aizawa S., Taga A., Kodama S. // Analyt. Sci. 2014. V. 30. P. 739–743. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.739>
12. Olennikov D.N., Chirikova N.K. // Chem. Nat. Comp. 2019. V. 55. P. 1032–1038. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02887-1>
13. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kashchenko N.I., Nikolaev V.M., Kim S.-W., Vennos C. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. № 756. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00756>
14. Solyomváry A., Mervai Z., Molnár-Perl I., Boldizsár I. // Nat. Prod. Res. 2014. V. 28. P. 732–739. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.879473>
15. Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2006. V. 52. P. 149–153. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>
16. Dandekar P.D., Kotmale A.S., Chavan S.R., Kadlag P.P., Sawant S.V., Dhavale D.D., Kumar A.R. // ACS Omega. 2021. V. 6. P. 1780–1786. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00617>
17. Ponnusamy S., Zinjarde S., Bhargava S., Rajamohan P.R., Ravikumar A. // Food Chem. 2012. V. 135. P. 2638–2642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.110>
18. García A.L.L., Olaya M.Q.J.H., Sierra A.J.I. // Rev. Cubana Plant. Med. 2017. V. 22. P. 1–14.
19. Cansian R.L., Vanin A.B., Orlando T., Piazza S.P., Puton B.M.S., Cardoso R.I. et al. // Braz. J. Biol. 2017. V. 77. P. 155–161. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.12215>
20. Yamasaki T., Sato M., Mori T., Mohamed A.S.A., Fujii K., Tsukioka J. // J. Nat. Toxins. 2002. V. 11. P. 165–171.

New Inhibitors of Pancreatic α -amylase from *Rhaponticum uniflorum***D. N. Olennikov^{a,*} and N. I. Kashchenko^a**^a *Institute of General and Experimental Biology SD RAS, Ulan-Ude, 670047 Russia*^{*}*e-mail: olennikovdn@mail.ru*

The basic strategy for the treatment of diabetes mellitus is the control of postprandial glucose levels, and therefore pancreatic α -amylase that hydrolyzes complex carbohydrates is an important enzymatic target for the scientific research. In the present study, an aqueous extract and its ethyl acetate fraction (EAF) from the seeds of *Rhaponticum uniflorum* had a pronounced inhibitory effect on the activity of human pancreatic α -amylase. Sixteen metabolites were isolated after the chromatographic separation of EAF and characterized as 4-*O*-, 5-*O*-, 3,4-di-*O*-, 3,5-di-*O*-, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside, rhaunoside B, luteolin 7-*O*-(6"-*O*-caffeoyl)-glucoside, luteolin, carthamoside, carthamogenin, tracheloside, isoferuloyl-serotonin, 20-hydroxyecdysone, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone and a new natural compound, which was carthamogenin 4-*O*-(6"-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranoside (6"-*O*-acetyl-cartamoside). Quantitative HPLC data indicated a different distribution of the individual components between the endosperm and the seed coat. The study of the compounds effect on the activity of human pancreatic α -amylase showed that some flavonoids, caffeoylquinic acids, lignans and serotonin derivatives had a pronounced inhibitory effect. These results support the conclusion that *Rhaponticum uniflorum* seeds may be a useful natural source for the development of α -amylase inhibitory agents.

Keywords: *Rhaponticum uniflorum*, human pancreatic α -amylase inhibitors, phenolic compounds