

УДК 582.982+547.814.5+612.344

АЦИЛИРОВАННЫЕ ФЛАВОНОИДЫ ИЗ *Cucumis sativus* ИНГИБИРУЮТ АКТИВНОСТЬ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Д. Н. Оленников¹, *, Н. И. Кашенко¹

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

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Нарушения липидного обмена представляют собой большую группу заболеваний, для лечения которых применяются различные стратегии, в том числе использование ингибиторов панкреатической липазы, что позволяет снизить поступление и адсорбцию липидов. В настоящем исследовании впервые показано, что отходы сельскохозяйственного культивирования *Cucumis sativus* (огурец посевной) могут быть источником для получения эффективных ингибиторов липазы. В результате хроматографического разделения из листьев *C. sativus* были выделены семь ацилированных флавоноидов, в том числе три новых производных изовитексина, охарактеризованных по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как изовитексин-2"-*O*-глюкозид-6"-*O*-ферулат (1), изовитексин-2"-*O*-глюкозид-6"-*O*-*n*-кумарат (2) и изовитексин-2"-*O*-(6"-*O*-ферулоил)-глюкозид-6"-*O*-ферулат (3). Результаты количественной ВЭЖХ показали, что суммарное содержание ацилированных флавоноидов в листьях российских сортов *C. sativus* составило 3.78–7.44 мг/г. Выделенные соединения продемонстрировали способность к ингибированию панкреатической липазы человека, причем эффективность флавоноида 3 оказалась наибольшей и превышала активность препарата сравнения (орлистата). Проведенные исследования показали, что листья *C. sativus* можно использовать для выделения биологически активных фитокомпонентов, обладающих гиполипидемической активностью.

Ключевые слова: *Cucumis sativus*, панкреатическая липаза человека, ингибиторы, ацилированные флавоноиды, изовитексин

DOI: 10.31857/S0555109923040104, EDN: QZMGOJ

В России в последние пять лет было введено в эксплуатацию 1.5 тыс. гектаров тепличных комплексов, причем в 2021 г. общая площадь подобных хозяйств увеличилась на 10% [1]. Растущее количество подобных предприятий стремительно увеличивает массу растительных отходов — непродуктового вторичного сырья (стебли, листья, корни), образующегося в результате вегетации растений и неиспользуемого в коммерческих целях. Основным путем утилизации зеленых отходов является компостирование, хотя биомасса растений может быть источником для получения хозяйственно-ценных продуктов, обладающих добавочной коммерческой ценностью [2].

Основной сельскохозяйственной культурой, включенной в тепличный севооборот, является огурец посевной (*Cucumis sativus* L., семейство Тыквенные) [3]. Биологической особенностью данной культуры является образование удлиненных побегов (стебли, листья). Масса побегов может достигать до 50–60% от массы плодов, что, по предварительной оценке, может составлять до

1 млн т в год [4]. Несмотря на широкую включенность плодов *C. sativus* в хозяйственную деятельность человека в качестве продукта питания, научные исследования зеленых побегов данного вида ограничены лишь общей информацией о химическом составе [5], в то время как сведения о детальном составе метаболитов и потенциальной биологической активности отсутствуют [6]. Ранее было установлено, что экстракты листьев *C. sativus* и некоторые фенольные соединения в их составе обладают способностью ингибировать активность панкреатической липазы человека [7]. Данный пищеварительный фермент участвует в гидролизе эфирных связей триглицеридов и образовании свободных жирных кислот [8], при избыточном поступлении которых развивается ряд гиперлипидемических патологических состояний, приводящих к формированию атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [9]. Применение ингибиторов липазы нормализует метаболизм липидов и снижает негативные последствия гиперлипидемии. К числу эффективных ингибито-

ров липазы относятся различные соединения [10], в том числе природного происхождения, среди которых особого внимания заслуживают флавоноиды, инактивирующие липазу и оказывающие эффект снижения концентрации липидов [11]. Учитывая объемы производства *C. sativus*, данная культура может стать перспективным сырьем для фармацевтической промышленности, в частности для получения фитопрепаратов с гиполипидемической активностью.

Цель работы — исследование состава флавоноидов листьев *C. sativus*, выделение основных соединений и определение их ингибиторного влияния на активность панкреатической липазы человека.

МЕТОДИКА

Условия эксперимента. Листья *C. sativus* (сорта Алфавит F1, Амур F1, Дачный F1, Динамит F1, Кураж F1, Нежинский, Сибирская гирлянда F1, Сибирский экспресс F1, Стрелец F1, Торнадо F1) были собраны в экспериментальном тепличном хозяйстве Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (Республика Бурятия, Россия) и высушены при 45°C до влажности ≤5% в конвекционном сушильном шкафу ПРО ШСП-У 35/150-120 (ООО “Новые технологии”, Россия).

Для колоночной хроматографии использовали полиамид, нормально- (SiO_2) и обращено-фазовый силикагель (ОФ- SiO_2), сефадекс LH-20 (“Sigma-Aldrich”, США). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (“ОКБ Спектр”, Россия). Масс-спектры регистрировали на ТQ-масс-спектрометре LCMS-8050 (“Shimadzu”, Япония) [12], 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 мм × 250 мм × 15 мкм) и фотодиодным детектором SPD-M30A (“Shimadzu”), при скорости — 1.0 мл/мин и температуре колонки 20°C.

Экстракция и выделение соединений из листьев *C. sativus*. Измельченное сырье (сорт Сибирский экспресс F1; 5 кг) экстрагировали 70%-ным изопропанолом (1 : 25, 70°C) дважды, после чего экстракт фильтровали через целлюлозный фильтр и концентрировали в вакууме досуха (1.4 кг). Далее экстракт разделяли с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) на полиамиде (10 кг), который промывали водой (ТФЭ-1, 420 г), 70%-ным этанолом (ТФЭ-2, 150 г) и 0.5%-ным раствором аммиака в 90%-ном этаноле (ТФЭ-3, 170 г).

Проверка способности ингибировать активность панкреатической липазы человека спектрофотометрическим методом, как описано в работе [13] показала, что фракция ТФЭ-3 более активная (IC_{50} 63.22 мкг/мл), чем ТФЭ-1 (IC_{50} > 500 мкг/мл)

и ТФЭ-2 (IC_{50} 158.63 мкг/мл), поэтому дальнейшие исследования были проведены с ТФЭ-3. Для выделения индивидуальных соединений ТФЭ-3 (160 г) хроматографировали методом флэш-хроматографии на Сефадексе LH-20 (колонка 2 × 90 см, элюент этанол—вода 80 : 20 — фракция А, 70 : 30 — фракция В, 40 : 60 — фракция С), далее фракции В и С разделяли на ОФ- SiO_2 (колонка 2 × 40 см, элюент вода—ацетонитрил 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50) и SiO_2 (3 × 40 см, этилацетат—этанол 100 : 0, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40).

Для разделения близко элюируемых соединений применяли препаративную ВЭЖХ, используя воду (I) и ацетонитрил (II) в качестве элюентов. Программа элюирования (время элюирования, мин; % ацетонитрила в воде) — 0–50 мин 5–27%, 50–100 мин 27–40%, 100–150 мин 40–52%. В результате были выделены изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-ферулат (630 мг), изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-*n*-кумарат (160 мг), изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-глюкозид-6"-О-ферулат (340 мг), и известные соединения изовитексин-4'-О-глюкозид-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-глюкозид (1.6 г), изовитексин-4'-О-глюкозид-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-глюкозид (8.3 г), изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-глюкозид (810 мг) и изовитексин-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-глюкозид (430 мг), идентифицированные по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии [14, 15].

Изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-ферулат (1). Общая формула — $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 273, 292, 322. HR-ESI-MS, m/z : 769.5211 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (расч. 769.6776 для $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{O}_{18} [\text{M}-\text{H}]^-$). ESI-MS, m/z (%): 769 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (18), 607 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ (31), 593 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$ (63), 431 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$ (100), 341 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3-90]^-$ (15), 311 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3-120]^-$ (8). Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 330 К, δ_{H} , м.д.): табл. 1. Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 330 К, δ_{C} , м.д.): табл. 1.

Изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-*n*-кумарат (2). Общая формула — $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 270, 290, 319. HR-ESI-MS, m/z : 739.3731 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (расч. 739.6520 для $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{O}_{17} [\text{M}-\text{H}]^-$). ESI-MS, m/z (%): 739 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (12), 593 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2]^-$ (58), 577 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ (17), 431 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2]^-$ (100), 341 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2-90]^-$ (19), 311 $[(\text{M}-\text{H})-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2-120]^-$ (15). Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 330 К, δ_{H} , м.д.): табл. 1. Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 330 К, δ_{C} , м.д.): табл. 1.

Изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-глюкозид-6"-О-ферулат (3). Общая формула — $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{O}_{21}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 272, 292, 321. HR-ESI-MS, m/z : 945.7209 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (расч. 945.8470 для

Таблица 1. Сигналы спектров ЯМР ^1H (500 МГц, ДМСО- d_6 , 330 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 МГц, ДМСО- d_6 , 330 К, δ_{C} , м.д.) соединений **1–3**

Фрагмент*	С-атом	1		2		3	
		δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
Апигенин	2	—	164.0	—	164.2	—	164.1
	3	6.58 (1H, c)	103.2	6.56 (1H, c)	103.0	6.54 (1H, c)	103.1
	4	—	182.3	—	182.1	—	182.2
	5	—	160.4	—	160.2	—	160.0
	6	—	110.5	—	110.4	—	110.7
	7	—	161.5	—	161.6	—	161.4
	8	6.41 (1H, c)	104.7	6.42 (1H, c)	104.5	6.40 (1H, c)	104.6
	9	—	154.2	—	154.3	—	154.6
	10	—	105.1	—	105.3	—	105.5
	1'	—	122.3	—	122.0	—	122.5
	2',6'	7.88 (2H, д, $J = 9.0$)	129.4	7.85 (2H, д, $J = 9.1$)	129.2	7.83 (2H, д, $J = 9.0$)	129.5
	3',5'	6.92 (2H, д, $J = 9.0$)	115.4	6.90 (2H, д, $J = 9.1$)	115.2	6.91 (2H, д, $J = 9.0$)	115.6
	4'	—	161.2	—	161.0	—	161.1
6-C-Glcp***	1''	4.89 (1H, д, $J = 9.2$)	72.1	4.87 (1H, д, $J = 9.0$)	72.3	4.82 (1H, д, $J = 9.5$)	72.0
	2''	4.48 (1H, м)	80.4	4.45 (1H, м)	80.2	4.49 (1H, м)	80.5
	3''	3.58 (1H, м)	76.8	3.57 (1H, м)	76.6	3.50 (1H, м)	76.7
	4''	3.25–3.29 (2H, м)	70.5	3.22–3.25 (2H, м)	70.7	3.20–3.23 (2H, м)	70.4
	5''	—	72.4	—	72.0	—	72.5
	6''	4.10 (1H, м) 4.38 (1H, м)	63.8	4.08 (1H, м) 4.35 (1H, м)	63.5	4.12 (1H, м) 4.32 (1H, м)	63.9
	2''-O-Glcp***	4.32 (1H, д, $J = 7.0$)	104.9	4.33 (1H, д, $J = 7.1$)	104.5	4.30 (1H, д, $J = 7.3$)	105.2
2''-O-Glcp***	2'''	3.18–3.24 (4H, м)	74.2	3.11–3.20 (4H, м)	74.0	2.98–3.18 (4H, м)	74.2
	3'''	—	78.1	—	78.4	—	78.0
	4'''	—	70.2	—	70.2	—	69.5
	5'''	—	77.2	—	77.0	—	73.4
	6'''	3.30 (1H, м) 3.72 (1H, м)	61.2	3.28 (1H, м) 3.74 (1H, м)	61.5	4.10 (1H, м) 4.38 (1H, м)	64.7
	6''-O-Fer**	—	125.0	—	—	—	125.2 ^ж
	2'''	7.05 (1H, д, $J = 2.0$)	110.0	—	—	7.02 (1H, д, $J = 2.0$) ^а	109.8 ^з
6''-O-Fer**	3'''	—	147.5	—	—	—	147.2 ^и
	4'''	—	149.1	—	—	—	149.3 ^к
	5'''	6.67 (1H, д, $J = 8.0$)	115.0	—	—	6.65 (1H, д, $J = 8.1$) ^б	115.2 ^п
	6'''	6.79 (1H, дд, $J = 2.0, 8.0$)	123.6	—	—	6.80 (1H, дд, $J = 2.1, 8.1$) ^в	123.2 ^м
	7'''	7.20 (1H, д, $J = 16.0$)	144.2	—	—	7.18 (1H, д, $J = 16.0$) ^г	144.0 ^и
	8'''	6.02 (1H, д, $J = 16.0$)	114.0	—	—	6.00 (1H, д, $J = 16.0$) ^д	114.1 ^о
	9'''	—	166.0	—	—	—	165.9
6''-O-pCou*	3'''-OCH ₃	3.85 (3H, c)	55.2	—	—	3.83 (3H, c) ^е	55.0 ^п
	1'''	—	—	—	125.2	—	—
	2''', 6'''	—	—	7.30 (2H, д, $J = 8.5$)	130.2	—	—
	3''', 5'''	—	—	6.70 (2H, д, $J = 8.5$)	115.4	—	—
	4'''	—	—	—	159.6	—	—
	7'''	—	—	7.18 (1H, д, $J = 15.9$)	144.0	—	—

Таблица 1. Окончание

Фрагмент*	С-атом	1		2		3	
		δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
6'''-O-Fer**	8'''			6.05 (1H, д, $J = 15.9$)	114.1		
	9'''			—	166.2		
	1'''					—	125.4 ^ж
	2'''					7.04 (1H, д, $J = 1.9$) ^а	110.1 ^з
	3'''					—	147.4 ^и
	4'''					—	149.5 ^к
	5'''					6.68 (1H, д, $J = 8.0$) ^б	115.4 ^п
	6'''					6.82 (1H, дд, $J = 1.9, 8.0$) ^в	123.4 ^м
	7'''					7.22 (1H, д, $J = 15.9$) ^г	144.3 ^и
	8'''					6.04 (1H, д, $J = 15.9$) ^д	114.2 ^о
	9'''					—	166.1
	3'''-OCH ₃					3.84 (3H, с) ^е	55.3 ^п

* pCoi — *n*-кумарил, ** Fer — ферулоил, *** Glcp — глюкопираноза. Сигналы, отмеченные одинаковыми символами (^{а–п}) могут считаться взаимозаменяемыми.

C₄₇H₄₅O₂₁ [M–H][–]. ESI-MS, m/z (%): 945 [M–H][–] (28), 679 [(M–H)–C₁₀H₈O₃][–] (21), 607 [(M–H)–C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅][–] (11), 593 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃][–] (42), 431 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅][–] (100), 341 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅–90][–] (9), 311 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅–120][–] (6). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, DMSO-*d*₆, 330 К, δ_H , м.д.): табл. 1. Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, DMSO-*d*₆, 330 К, δ_C , м.д.): табл. 1.

Гидролиз. Кислотный гидролиз проводили в 2 М ТФУ (5 мл на 5 мг соединения) при 100°C 2 ч, после чего кислоту удаляли в вакууме в присутствии метанола и разделяли сухой остаток на полиамиде (3 г, картриджи “Capital Analytical”, Великобритания), который промывали водой (100 мл, элюат I), метанолом (150 мл, элюат II) и 0.5%-ным аммиаком в метаноле (150 мл, элюат III). В элюате I определяли присутствие моносахаридов после реакции с 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном методом ВЭЖХ, а также после восстановительного аминирования с L-триптофаном для определения принадлежности к D/L-ряду [16]. Инкубацию с 0.3%-ным NaOH проводили, как описано ранее, а для ферментативного гидролиза применяли β -глюкозидазу (3.2.1.21, 30 ед./мг, “Sigma-Aldrich”; 2 ед. в 500 мкл 100 мМ фосфатного буфера, pH 5.0), с которой инкубировали соединения, используя метод [17].

Биологическая активность. Влияние фракций и индивидуальных соединений на активность липазы изучали спектрофотометрическим методом [13] с использованием панкреатической липазы человека (3.1.1.3, 50 ед./мг; “Lee Biosolutions”, США),

используя в качестве субстратов *n*-нитрофенил-бутират, *n*-нитрофенил-лаурат и *n*-нитрофенил-стеарат (все “Sigma-Aldrich”). Орлистат (тетрагидролипостатин, “Sigma-Aldrich”) использовали в качестве положительного контроля. Ингибиторная активность выражалась величиной IC₅₀ (концентрация, вызывающая 50%-ное ингибирование активности фермента) в мкг/мл, которую определяли графически после построения зависимости ингибиторной активности от концентрации.

Тест на летальность. В тесте применяли цисты *Artemia salina* (“Арсал”, Россия), которые инкубировали в искусственной морской воде (“Sigma-Aldrich”) с исследуемым веществом (20–2000 мкг/мл) или 0.9%-ным раствором NaCl (контроль), как описано ранее [18].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракт листьев *C. sativus* фракционировали с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) на полиамиде, в результате чего получены фракции ТФЭ-1–ТФЭ-3, из которых ТФЭ-3 оказывала наибольшее ингибиторное влияние на активность панкреатической липазы человека. Далее ТФЭ-3 разделяли методом флэш-хроматографии на Сефадексе LH-20, обращено- и нормально-фазовом силикагеле и препаративной ВЭЖХ, что привело

к выделению соединений **1–7**, строение которых было изучено с использованием данных УФ, ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии и химических превращений (рис. 1). Четыре соединения оказались известными природными флавоноидами и производными С-гликозида изовитексина (апигенин-С-гликозида), включая изовитексин-4'-О-гликозид-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид (**4**), изовитексин-4'-О-гликозид-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-гликозид (**5**), изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид (**6**) и изовитексин-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-гликозид (**7**) (рис. 2). Ранее эти соединения были обнаружены в листьях *C. sativus*, инфицированных *Podospaera fuliginea* — патогеном, вызывающим мучнистую росу у видов *Cucurbitaceae* [15], и впервые описаны в тканях здоровых растений.

Соединение **1** после гидролиза с 2 М ТФУ распадалось на изовитексин, феруловую кислоту и D-глюкозу и обладало УФ-спектром, типичным для С,О-гликозил-апигенинов, ацилированных гидроксикоричными кислотами [14]. Инкубация с 0.3%-ным NaOH приводила к образованию изовитексин-2"-О-гликозида, что возможно при ацилировании углеводной части молекулы. Фрагментация в масс-спектре отрицательной ионизации у **1** была близка к таковой изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозида (**6**) [15], однако для **1** наблюдалось образование фрагмента с m/z 607, вызванного удалением из депротонированного иона гексозы, что возможно при терминальном расположении последней. Данный факт был подтвержден результатами ферментативного гидролиза **1** с β -гликозидазой, приводившего к формированию изовитексин-6"-О-ферулата [15], в то время как обработка **6** данным ферментом не приводила к изменению структуры. Сравнительный анализ спектров ЯМР **1** и изовитексин-2"-О-гликозида показал их сходство, кроме присутствия дополнительных сигналов, принадлежащих фрагменту *транс*-феруловой кислоты (табл. 1). Расположение ферулоильного фрагмента у атома С-6" 6-С-связанной глюкозы было подтверждено данными спектра НМВС, в котором отмечены корреляции между сигналами протонов Н-6" (δ_H 4.10, 4.38) и углерода карбонильной группы С-9''' (δ_C 166.0). Таким образом, строение соединения **1** было определено как апигенин-6-С-(2"-О- β -D-глюкопиранозил-6"-О-ферулоил)- β -D-глюкопиранозид (изовитексин-2"-О-гликозид-6"-О-ферулат), изомером которого является изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид, выделенный ранее из *C. sativus* [15]. Соединение **2** было близко по строению к **1**, но содержало фрагмент *n*-кумаровой кислоты, о чем свидетельствовали результаты кислотного и щелочного гидролиза, УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. Это позволило установить, что **2** является апигенин-6-С-(2"-О- β -D-глюкопиранозил-6"-О-*n*-кумароил)- β -

D-глюкопиранозидом (изовитексин-2"-О-гликозид-6"-О-*n*-кумарат). Близким по строению к **2** является изовитексин-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-гликозид так же найденный в *C. sativus* [15].

Данные масс-спектрометрии указывали, что молекулярная масса соединения **3** была на 176 а.е.м. больше ($C_{47}H_{46}O_{21}$), чем у **1** ($C_{37}H_{38}O_{18}$). Причем, как и в случае с **1** после кислотного гидролиза **3** наблюдалось образование изовитексина, феруловой кислоты и D-глюкозы, но в масс-спектре соединения обнаружены ионы с m/z 769 и 593, которые свидетельствовали об удалении двух ферулоильных фрагментов. В спектре ЯМР ^{13}C отмечены слабopольные сдвиги сигналов С-6" (δ_C 61.2 $\rightarrow$ 63.9) и С-6''' (δ_C 60.9 $\rightarrow$ 64.7) глюкозных фрагментов относительно таковых у изовитексин-2"-О-гликозида [19], а в спектре НМВС выявлены корреляции между сигналами протонов Н-6" (δ_H 4.12, 4.32) и Н-6''' (δ_H 4.10, 4.38) и углеродов карбонильных групп С-9''' (δ_C 165.9) и С-9'''' (δ_C 166.1) соответственно. Выявленные особенности указывали на то, что соединение **3** представляло собой изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид-6"-О-ферулат или апигенин-6-С-{2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)- β -D-глюкопиранозил-6"-О-*n*-кумароил}- β -D-глюкопиранозид.

Результаты количественного анализа листьев 10 российских сортов *C. sativus* возрастом 14–16 недель показали, что суммарное содержание соединений **1–7** может варьировать от 3.78 мг/г (сорт Амур F1) до 7.44 мг/г (сорт Дачный F1) (табл. 2). Различные сорта демонстрировали разную способность к накоплению отдельных соединений, а концентрация доминирующих соединений составила 0.30–5.34 мг/г для **3**, 0.75–2.53 мг/г для **4** и 1.73–4.19 мг/г для **5**. Литературные данные о содержании отдельных соединений в листьях *C. sativus* отсутствуют, но известно, что суммарная концентрация данной группы соединений в сортах, выращиваемых в других странах, ниже и составляет до 1 мг/г в Китае [20], до 1.46 мг/г в Индонезии [21] и до 2 мг/г в США [22].

Исследование биологической активности выделенных соединений показало, что соединения **1–7** оказывали ингибиторное действие на активность панкреатической липазы человека (табл. 3). В качестве субстратов были использованы эфиры *n*-нитробензола с различной длиной жирной цепи, в том числе бутират, лаурат и стеарат. Вещество сравнения орлистат вызывало наибольшее ингибирование гидролиза короткоцепочечного субстрата *n*-нитрофенил бутирата (IC_{50} = 0.012 мкг/мл). В данных условиях максимальную активность проявлял флавоноид **3** (IC_{50} = 5.69 мкг/мл), в то время как другие соединения были менее эффективными (IC_{50} 11.28–90.83 мкг/мл). При применении длинноцепочечного *n*-нитрофенил стеарата в качестве субстрата ингибиторная активность орли-

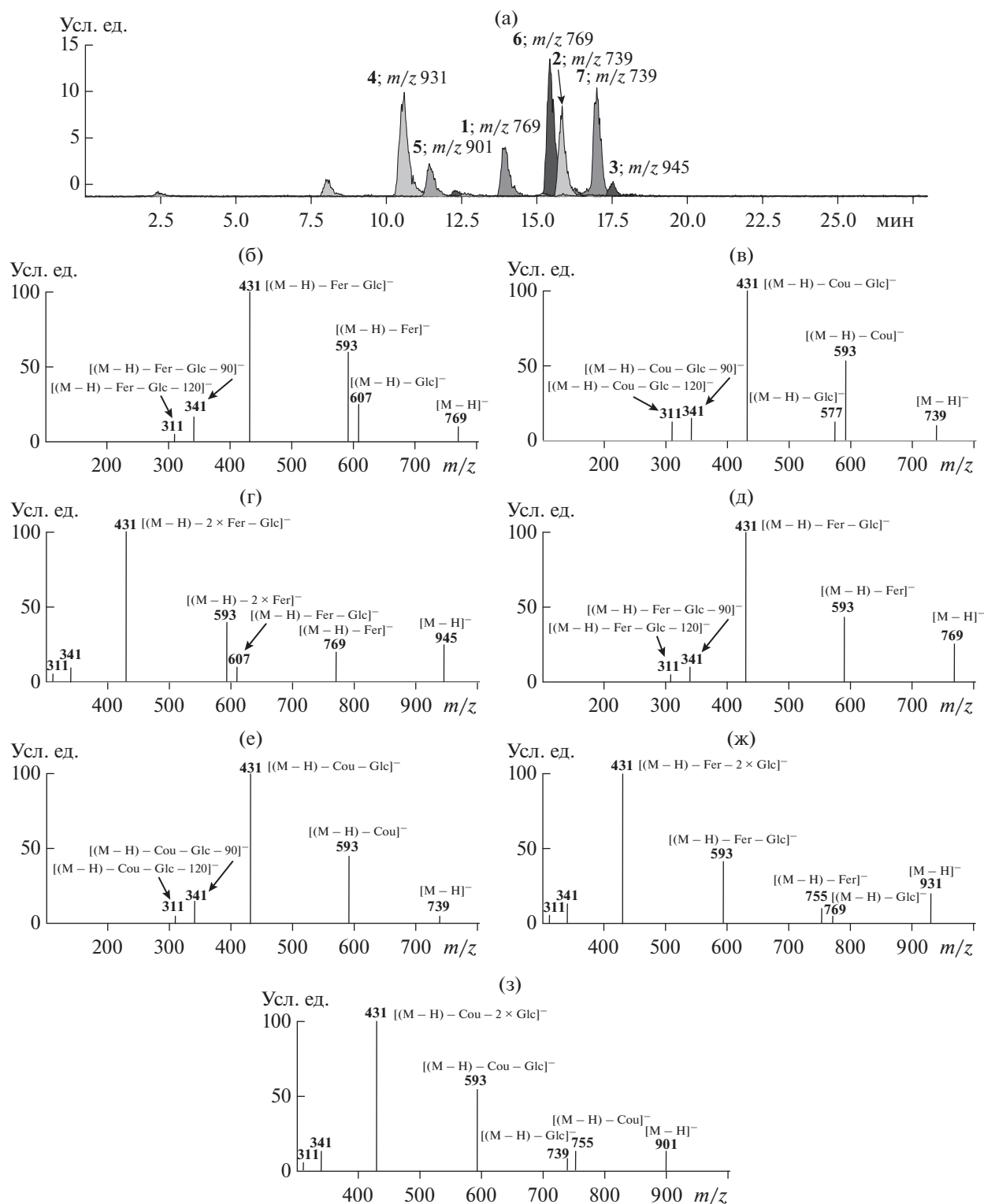
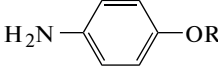


Рис. 1. Хромотограмма (ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, отрицательная ионизация, режим регистрации выделенных ионов с m/z 739, 769, 901, 931, 945) фракции ТФЭ-3 листьев *Cucumis sativus* (а) и масс-спектры соединений **1** (б), **2** (в), **3** (г), **4** (д), **5** (е), **6** (ж) и **7** (з). Числами над пиками указан номер соединения и величина m/z депротонированного иона.

Таблица 3. Ингибирование активности панкреатической липазы человека соединениями **1–7** и орлистатом в присутствии трех субстратов, IC₅₀, мкг/мл ± S.D.

Соединение	IC ₅₀ , мкг/мл		
	<i>n</i> -Нитрофенил бутират, CH ₃ (CH ₂) ₂ CO	<i>n</i> -Нитрофенил лаурат, CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO	<i>n</i> -Нитрофенил стеарат, CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO
1	11.28 ± 0.46 ^c	4.37 ± 0.17 ^c	2.94 ± 0.12 ^b
2	14.06 ± 0.57 ^d	7.52 ± 0.30 ^d	3.18 ± 0.14 ^{bc}
3	5.69 ± 0.23 ^b	2.83 ± 0.11 ^b	1.62 ± 0.06 ^a
4	>100	>100	>100
5	>100	>100	>100
6	12.86 ± 0.51 ^c	4.35 ± 0.17 ^c	2.72 ± 0.10 ^b
7	14.83 ± 0.59 ^d	7.43 ± 0.29 ^d	3.26 ± 0.14 ^c
Орлистат	0.012 ± 0.001 ^a	0.53 ± 0.02 ^a	3.14 ± 0.12 ^{bc}

Примечание. Общая структура субстрата . Значения с разными надстрочными символами (^{a–d}) указывают на статистически значимые различия между группами при $p < 0.05$ по данным однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

концентрация флавоноидов **1–7**, вызывающих такой же процент гибели, была выше — 1000 мкг/мл, что указывало на их большую безопасность по сравнению с веществом сравнения.

Ранее эффективность флавоноидов в качестве ингибиторов панкреатической липазы была показана для некоторых гликозидов апигенина, близких по строению к изученным соединениям [24], однако данный вид активности впервые установлен для ацилированных производных изовитексина. Рассматривая взаимосвязь химического строения и биологической активности флавоноидов *C. sativus*, можно отметить, что наиболее активное соединение **3** содержало два ферулоильных фрагмента и свободную гидроксильную группу у С-4'. У моно-ацилированных гликозидов **1**, **2**, **6** и **7** активность была несколько ниже, а при замещении гидроксильной у С-4' остатком глюкозы соединения **4** и **5** теряли способность к ингибированию активности липазы. Таким образом, наличие фрагментов феруловой или *n*-кумаровой кислот в структуре флавоноидов, а также свободного гидроксильной у С-4' в кольце В оказывало влияние на проявление ингибиторного действия на панкреатическую липазу, что ранее было показано для других флавоноидов, обнаруженных в *Camellia sinensis*, *Eretmochloa ophiuroides* и *Litchi chinensis* [25]. Известные ингибиторы липазы из группы природных апигенинов — изовитексин и сапонарин (изовитексин-7-*O*-глюкозид), демонстрировали меньшую эффективность (IC₅₀ > 100 мкг/мл) [24], по сравнению с наиболее активным флавоноидом **3**, что позволило рассматривать данное соединение в качестве перспективного биоактивного агента.

Проведенные исследования показали, что зеленые отходы, образующиеся при культивирова-

нии *C. sativus*, представляют собой растительный источник для получения ацилированных флавоноидов, которые обладают способностью к ингибированию активности панкреатической липазы человека. Эти соединения могут быть использованы для создания новых лекарственных средств для лечения и профилактики нарушений метаболических расстройств обмена липидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00063, (<https://rscf.ru/project/23-26-00063>).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Volkova I.N. // Geograph. Environ. Living Syst. 2021. V. 1. P. 93–109. <https://doi.org/10.18384/2712-7621-2021-1-93-109>
2. Sharipov Sh.I., Ibragimova B.Sh. // Econ. Anal. Theory Pract. 2018. V. 17. P. 1340–1355. <https://doi.org/10.24891/ea.17.12.1340>
3. Седых Т.В., Погребняк С.В. // Вестник ОмГАУ. 2016. № 3. С. 53–58.
4. Korotseva I.B., Belov S.N. // Veget. Crops Russ. 2022. V. 6. P. 29–34. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-6-29-34>
5. Khan A., Mishra A., Hasan S.M., Usmani A., Ubaid M., Khan N., Saidurrahman M. // J. Complement. Integr. Med. 2022. V. 19. P. 843–854. <https://doi.org/10.1515/jcim-2020-0240>
6. Mukherjee P.K., Nema N.K., Maity N., Sarkar B.K. // Fitoterapia. 2013. V. 84. P. 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.10.003>

7. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Chem. Nat. Compd. 2023. V. 58. P. 324–329.
https://doi.org/10.1007/s10600-022-03858-9
8. Lowe M.E. // Ann. Rev. Nutr. 1997. V. 17. P. 141–158.
https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.141
9. Zhu G., Fang Q., Zhu F., Huang D., Yang C. // Front. Genet. 2021. V. 12. 693538.
https://doi.org/10.3389/fgene.2021.693538
10. Liu T.-T., Liu X.-T., Chen Q.-X., Shi Y. // Biomed. Pharmacother. 2020. V. 128. 110314.
https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110314
11. Li M., Chen Y., Ruan J., Wang W., Chen J., Zhang Q. // Curr. Res. Food. Sci. 2023. V. 6. 100424.
https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100424
12. Olennikov D.N., Khandy M.T., Chirikova N.K. // Horticulturae. 2022. V. 8. 975.
https://doi.org/10.3390/horticulturae8100975
13. Olennikov D.N., Chemposov V.V., Chirikova N.K. // Foods. 2022. V. 11. 2801.
https://doi.org/10.3390/foods11182801
14. McNally D.J., Wurms K.V., Labbé C., Quideau S., Bélanger R.R. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 1280–1283.
https://doi.org/10.1021/np030150y
15. Abou-Zaid M.M., Lombardo D.A., Kite G.C., Grayer R.J., Veitch N.C. // Phytochemistry. 2001. V. 58. P. 167–172.
https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00156-x
16. Kashchenko N.I., Jafarova G.S., Isaev J.I., Olennikov D.N., Chirikova N.K. // Plants. 2022. V. 11. 2126.
https://doi.org/10.3390/plants11162126
17. Olennikov D.N., Chirikova N.K. // Chem. Nat. Compd. 2019. V. 55. P. 1032–1038.
https://doi.org/10.1007/s10600-019-02887-1
18. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. P. 59–67.
https://doi.org/10.1134/S0003683823010064
19. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Chem. Nat. Compd. 2020. V. 56. P. 1026–1034.
https://doi.org/10.1007/s10600-020-03220-x
20. An L., Wang J., Liu Y., Chen T., Xu S., Feng H., Wang X. // Proc. SPIE. 2003. V. 4896. P. 223–231.
https://doi.org/10.1117/12.468231
21. Insanu M., Zahra A.A., Sabila N., Silviani V., Haniffadli A., Rizaldy D., Fidrianny I. // Maced. J. Med. Sci. 2022. V. 10. P. 616–622.
https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.8337
22. Zhao L., Huang Y., Paglia K., Vaniya A., Wanciewicz B., Keller A.A. // Environ. Sci. Technol. 2018. V. 52. P. 7092–7100.
https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00742
23. Custers E.M.E., Kiliaan J.A. // Progr. Lipid Res. 2022. V. 85. 101144.
https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101144
24. Rahim A.T.M.A., Takahashi Y., Yamaki K. // Food Res. Int. 2015. V. 75. P. 289–294.
https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.017
25. Buchholz T., Melzig M. // Planta Med. 2015. V. 81. P. 771–783.
https://doi.org/10.1055/s-0035-1546173

Acylated Flavonoids from *Cucumis sativus* Inhibit Activity of Human Pancreatic Lipase

D. N. Olennikov^{a,*} and N. I. Kashchenko^a

^aInstitute of General and Experimental Biology SD RAS, Ulan-Ude, 670047 Russia

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Lipid metabolism disorders are a large group of diseases for the treatment of which various strategies are used including the use of pancreatic lipase inhibitors reduced the intake and adsorption of lipids. This study was the first shown that agricultural wastes of cucumber (*Cucumis sativus*) can be a source of the effective lipase inhibitors. As a result of the chromatographic separation of *C. sativus* leaves metabolites, seven acylated flavonoids were identified, including three new derivatives of isovitexin characterized by UV, NMR spectroscopy and mass spectrometry data as isovitexin-2"-O-glucoside-6'''-O-ferulate (**1**), isovitexin-2"-O-glucoside-6'''-O-*p*-coumarate (**2**), and isovitexin-2"-O-(6'''-O-feruloyl)-glucoside-6'''-O-ferulate (**3**). The quantitative HPLC data showed that the total content of the acylated flavonoids in the leaves of Russian varieties *C. sativus* amounted to 3.78–7.44 mg/g of dry plant weight. Isolated compounds demonstrated the ability to inhibit the human pancreatic lipase and the effectiveness of compound **3** was the greatest and exceeded the activity of the reference compound Orlistat. This study has shown that *C. sativus* leaves can be the useful source of biologically active phytochemicals with hypolipidemic activity.

Keywords: *Cucumis sativus*, human pancreatic lipase, inhibitors, acylated flavonoids, isovitexin