

## Низкомолекулярные соединения

УДК 582.949.27+547.9+543.544.5.068.7

### ФЛАВОНОИДЫ И ЛИГНАНЫ ЛИСТЬЕВ *NEPETA MULTIFIDA* (LAMIACEAE) И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© Н.И. Кащенко, Д.Н. Оленников\*

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,  
ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047 (Россия), e-mail: olennikovdn@mail.ru

Многолетнее растение *Nepeta multifida* L. (син. *Schizonepeta multifida* (L.) Briq.) является одним из наиболее распространенных видов семейства Lamiaceae, произрастающих на территории Восточной Сибири и применяющихся в традиционной восточной медицине, химический состав которого изучен недостаточно. Хроматографическое разделение фенольных соединений листьев *N. multifida* с использованием колоночной хроматографии и препаративной ВЭЖХ позволило выделить 16 соединений, в том числе новый флавоноид, идентифицированный согласно данным УФ, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии как лютеолин-7-О-(3'',6''-ди-О-ацетил)-β-D-глюкопиранозид. Известные соединения были O-гликозидами лютеолина и апигенина, розмариновая кислота, сальвианоловые кислоты А и В и схизотенуин А. Анализ количественного содержания отдельных соединений с применением метода ВЭЖХ-УФ в листьях *N. multifida* в различные фазы развития растения показал, что доминирующими компонентами являются розмариновая кислота (8.36–35.71 мг/г), лютеолин-7-О-глюкуронид (2.03–14.18 мг/г) и схизотенуин А (5.29–9.56 мг/г), и наибольшая концентрация фенольных соединений характерна для фазы цветения и плодоношения. С применением спектрофотометрического метода Элмана установлено, что экстракт листьев *N. multifida* и некоторые соединения обладали антиацетилхолинэстеразной активностью, причем наиболее активными были гликозиды лютеолина, концентрация полумаксимального ингибирования фермента (IC<sub>50</sub>) для которых составила 29.03–58.36 мкг/мл. Таким образом, в результате настоящего исследования было установлено, что листья *N. multifida* содержат различные группы фенольных соединений, обладающих способностью ингибировать активность ацетилхолинэстеразы.

**Ключевые слова:** *Nepeta multifida*, *Schizonepeta*, Lamiaceae, флавоноиды, лютеолин, розмариновая кислота, ВЭЖХ, ацетилхолинэстераза.

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

#### Введение

Заболевания центральной нервной системы широко распространены в современном мире и относятся к числу патологических факторов, приводящих к инвалидизации широкого круга населения. Для лечения и профилактики данных заболеваний применяются как синтетические лекарства, так и фитотерапевтические процедуры. Среди множества растительных средств особенно эффективны лекарственные препараты из семейства Lamiaceae, которые оказывают положительный терапевтический эффект при церебральной гипоксии и аноксии [1] и при церебральной ишемии и нейрональных повреждениях, вызванных эксцитотоксичностью [2], а также демонстрируют нейропротекторное и антихолинэстеразное действие при болезни Альцгеймера [3, 4]. К числу наиболее часто применяемых относятся более 50 видов, среди которых особенно следует выделить виды *Nepeta*, обладающие антихолинэстеразным, антиноцицептивным и антиконвульсантным эффектом [5].

---

Кащенко Нина Игоревна – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, e-mail: ninkk@mail.ru  
Оленников Даниил Николаевич – доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией медико-биологических исследований, e-mail: olennikovdn@mail.ru

Род *Nepeta* L. в Сибири представлен шестью видами, два из которых – *N. multifida* L. и *N. annua* Pall., относятся к подсекции *Schizonepeta* Benth. и ранее были выделены в отдельный род *Schizonepeta* (Benth.) Briq. [6]. В Восточной Си-

\* Автор, с которым следует вести переписку.

бири произрастает только *N. multifida*, занимающий значительные территории остепненных склонов и суходольных лугов [7]. Известные сведения литературы о химическом составе *N. multifida* относятся, прежде всего, к эфирному маслу, основными компонентами которого являются  $\beta$ -оцимен, 1,8-цинеол, лимонен, пулегон, фелландрен и ментон [8]. В составе нелетучих соединений *N. multifida* были идентифицированы докозановая, тетракозановая, янтарная, дезоксиолеаноловая кислоты [9] и 3-имино-*N*-( $\alpha$ -иминоэтиламино)бутиролактан [10]. Исследование фенольных соединений цветков *N. multifida* из Байкальского региона выявило присутствие гликозидов лютеолина и апигенина, а также розмариновой кислоты и других бензофурановых лигнанов [10, 11]; фенольные соединения листьев данного вида ранее не изучались.

В тибетской медицине трава *N. multifida* применялась для лечения кожных заболеваний в качестве антибактериального и ранозаживляющего средства, а также при желудочно-кишечных болезнях как аппетитное, противоопухолевое и антигельминтное лекарство [12]. Настойку из высушенных растений использовали при коклюше и различных видах кашля. Особый интерес вызывает употребление травы *N. multifida* для лечения «планетных» болезней, описание которых напоминает клиническую картину инсульта. Исследования биологической активности экстрактов *N. multifida* немногочисленны, однако известно, что они оказывают нейропротекторное, стресс-протективное, антиоксидантное [13] и антигипоксическое действие [14]. В настоящей работе представлены сведения о химическом составе и количественном содержании отдельных соединений в листьях *N. multifida*, а также результаты изучения антихолинэстеразной активности некоторых фенольных компонентов.

### Экспериментальная часть

**Растительное сырье.** Растения *N. multifida* были собраны в 2020 г. в Республике Бурятия (Мухоршибирский район, 51°02'46.4" N, 107°46'52.7"E, 830 м в.у.м.) в начале вегетации (2–5 июня; 30 образцов), фазы вегетации (28–30 июня, 28 образцов), цветения (15–18 июля, 45 образцов), плодоношения (10–14 августа, 38 образцов) и отмирания (28–31 августа, 22 образца). Образец представлял собой листья, собранные с одного растения. Видовая принадлежность определена д.фарм.н. Н.К. Чириковой (Северо-Восточный федеральный университет, Якутск). Образец сырья хранится в гербарии ИОЭБ СО РАН (№BU/LAM-0720/36-114). Листья были отделены и высушены в конвекционном шкафу при 45 °С до влажности 4–5%.

**Общие экспериментальные условия.** Для колоночной хроматографии (КХ) использовали полиамид, нормально- ( $\text{SiO}_2$ ) и обращено-фазовый силикагель (ОФ- $\text{SiO}_2$ ) и Сефадекс LH-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Санкт-Петербург, Россия). Масс-спектры регистрировали на ТQ-масс-спектрометре LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA) [15], спектры ЯМР – на спектрометре VXR 500S (Varian, Palo Alto, CA, USA). 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); v 1.0 мл/мин, температура колонки 20 °С.

**Экстракция и выделение соединений 1–16 из листьев *N. multifida*.** Измельченное сырье *N. multifida* (850 г) экстрагировали 70% этанолом (1 : 12, 70 °С, трижды; УЗ-ванна), после чего спиртовой экстракт концентрировали в вакууме досуха (выход 272 г). Сухой экстракт обрабатывали в аппарате Сокслета гексаном и хлороформом до истощения для удаления липофильных компонентов. Обезжиренный экстракт распределяли в двухфазной системе этилацетат-вода (1 : 1) и далее водную фазу экстрагировали *n*-бутанолом. Органические экстракты концентрировали (выход экстрактов: этилацетатный 66 г, *n*-бутанольный 98 г) и наносили на полиамид для КХ (1 : 20), который элюировали водой (элюат 1), 50% этанолом (элюат 2) и 0.5%  $\text{NH}_3$  в 90% этаноле (элюат 3). Хроматографическому разделению подвергались элюаты 2 (Э2) и 3 (Э3) этилацетатной фракции и элюат 2 *n*-бутанольной фракции (Б2). Элюат Э2 (9 г) разделяли с применением флеш-хроматографии на  $\text{SiO}_2$  (2×40 см, EtOAc– $\text{Me}_2\text{CO}$  100:0→60:40), ОФ- $\text{SiO}_2$  (1×30 см,  $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{MeCN}$  95 : 5→60 : 40) и Сефадексе LH-20 (1×60 см,  $\text{MeOH}$ – $\text{H}_2\text{O}$  80 : 20→30 : 70), что позволило выделить лютеолин-7-*O*-глюкозид (19 мг, **2**) [16] и апигенин-7-*O*-глюкозид (8 мг, **3**) [16]. Для разделения фракции Э3 (11 г) применяли флеш-хроматографию на  $\text{SiO}_2$  (2×60 см, EtOAc– $\text{Me}_2\text{CO}$  100 : 0 : 0→70 : 30), ОФ- $\text{SiO}_2$  (1×20 см,  $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{MeCN}$  100 : 0→20 : 80), Сефадексе LH-20 (1×60 см,  $\text{MeOH}$ – $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{AcOH}$  90 : 5 : 5→20 : 75 : 5) и преп. ВЭЖХ (элюент А –  $\text{MeOH}$ , элюент В –  $\text{H}_2\text{O}$ ; градиентный режим, % В: 0–30 мин, 5–15%, 30–45 мин, 15–38%, 45–90 мин, 38–58%, 90–120 мин, 58–85%). В результате разделения были выделены **1** (33 мг), лютеолин-7-*O*-глюкуронид (7.5 г, **4**) [16], апигенин-7-*O*-глюкуронид (10 мг, **5**) [16], лютеолин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-

глюкозид (1.4 г, **6**) [17], апигенин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-глюкозид (5 мг, **7**) [17], розмариновая кислота (9.1 г, **8**) [18], сальвианоловая кислота А (24 мг, **9**) [18], сальвианоловая кислота В (33 мг, **10**) [18], схизотенуин А (820 мг, **11**) [18] и непетамултин А (8 мг, **12**) [11]. Элюат Б2 разделяли способом аналогичным таковому для Э2, что привело к получению лютеолин-7-*O*-неогесперидозида (7 мг, **13**) [16], лютеолин-7-*O*-рутинозида (28 мг, **14**) [16], апигенин-7-*O*-неогесперидозида (6 мг, **15**) [16] и апигенин-7-*O*-рутинозида (5 мг, **16**) [16].

**Лютеолин-7-*O*-(3'',6''-ди-*O*-ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозид (1).** C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>13</sub>. УФ-спектр (MeOH,  $\lambda_{\max}$ , нм): 254, 269, 347. HR-ESI-MS, *m/z*: 531.4273 (расч. 531.4064 для C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>13</sub> [M-H]<sup>-</sup>). ESI-MS, *m/z* (%): 531 [M-H]<sup>-</sup>. ESI-MS<sup>2</sup> [531]: 489 [(M-H)-42]<sup>-</sup> (9), 447 [(M-H)-42×2]<sup>-</sup> (12), 285 [(M-H)-42×2-162]<sup>-</sup> (100). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (500 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 К,  $\delta_{\text{H}}$ , м.д.) (табл. 1). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C (125 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 К,  $\delta_{\text{C}}$ , м.д.) (табл. 1).

*Микроколоночная ВЭЖХ-УФ.* Количественный анализ фенольных соединений проводили с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа Милихром А-02 (Эконова, Новосибирск, Россия) на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм, Ø5 мкм; MetrohmAG, Herisau, Switzerland); подвижная фаза: 0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.006 М HClO<sub>4</sub> (А), MeCN (В). Условия градиента (%В): 0–15 мин 5–100%;  $v$  150 мкл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор,  $\lambda$  330 нм. Расчет содержания фенольных соединений проводили с применением веществ сравнения фирм ChemFaces (Wuhan, Hubei, PRC) – лютеолин-7-*O*-глюкуронид (кат. № CFN98512, ≥98%), лютеолин-7-*O*-рутинозид (кат. № CFN93556, ≥98%), апигенин-7-*O*-глюкуронид (кат. № CFN98500, ≥98%); и Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) – лютеолин-7-*O*-глюкозид (кат. № 74284, ≥98%), апигенин-7-*O*-глюкозид (кат. № 44692, ≥97%), розмариновая кислота (кат. № R4033, ≥98%), сальвианоловая кислота А (кат. № 97599, ≥95%), сальвианоловая кислота В (кат. № PHL89783, ≥90%). Для количественного анализа некоторых соединений применяли внешние вещества сравнения: лютеолин-7-*O*-глюкозид для лютеолин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-глюкозида и лютеолин-7-*O*-(3'',6''-ди-*O*-ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозида, апигенин-7-*O*-глюкозид для апигенин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-глюкозида, розмариновая кислота для схизотенуина А. Для приготовления раствора стандартного вещества 5 мг соединения растворяли в мерной колбе (5 мл) в 70% ацетонитриле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Далее готовили серию разбавлений с концентрацией 5–500 мкг/мл и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Результаты использовали для построения градуировочных графиков в координатах «концентрация, мкг/мл – площадь хроматографического пика», которые применяли для дальнейшего расчета. Данные представлены в виде среднего значения из трех параллельных определений ( $\pm$  стандартное отклонение, S.D.).

*Пробоподготовка растительных образцов.* Для осуществления количественного анализа фенольных соединений в листьях *N. multifida* точную навеску измельченного растительного сырья (200 мг) помещали в емкость для экстракции (5 мл) с завинчивающейся крышкой, приливали 2 мл 70% этанола и экстрагировали в ультразвуковой ванне (100 Вт, 35 кГц) при 50 °С в течение 20 мин. Полученную пробу центрифугировали (3000 g, 15 мин) и супернатант переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл. Экстракцию повторяли в тех же условиях еще раз. Объем объединенного экстракта доводили до метки 70% этанолом. Перед процедурой ВЭЖХ исследуемый раствор фильтровали через PTFE фильтр (0.22 мкм) и использовали для анализа без предварительного разбавления. Экстракт для исследования биологической активности получали аналогичным способом, после чего удаляли экстрагент в вакууме и измельчали сухой остаток.

*Биологическая активность.* Ингибиторное действие экстракта *N. multifida* и чистых соединений на ацетилхолинэстеразу из *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich, кат. № C3389, тип VI-S, 1000 ед./мг) изучали с использованием метода Элмана, в котором тиохалин, образующийся из фермента, реагирует с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) образуя окрашенный комплекс, регистрирующийся спектрофотометрическим методом при длине волны 412 нм. Для анализа применяли набор Acetylcholinesterase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, кат. № МАК119). Исследование состава метаболитов экстракта *N. multifida* до и после инкубации с ацетилхолинэстеразой проводили в описанных выше условиях ВЭЖХ-УФ. Навеску экстракта (10 мг) растворяли в 20 mM трис-HCl буфере (pH 7.5; 5 мл), центрифугировали (6000 g, 10 мин), супернатант (50 мкл) смешивали с 50 мкл раствора ацетилхолинэстеразы в 20 mM трис-HCl буфере (1 мг/мл) и инкубировали при 37 °С (30 мин). После этого в кпробе приливали 100 мкл ацетонитрила, центрифугировали (6000 g, 5 мин) и анализировали супернатант методом ВЭЖХ-УФ.

*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.

### Обсуждение результатов

В результате хроматографического разделения метанольного экстракта из листьев *N. multifida* с применением КХ на полиамиде, нормально- и обращено-фазовом силикагеле, Сефадексе LH-20 и препаративной ВЭЖХ были выделены известные соединения **2–16** и новый флавоноид **1**.

Соединению **1** была определена формула  $C_{25}H_{24}O_{13}$  по данным масс-спектрометрии (HR-ESI-MS,  $m/z$ : 531.4273; расч. 531.4064 для иона  $C_{25}H_{23}O_{13} [M-H]^+$ ) и спектроскопии ЯМР  $^{13}C$ . Данные УФ-спектроскопии указывали на то, что **1** является флавоноидом группы лютеолина (рис. 1а), а в масс-спектре  $MS^2$  выявлены ионы, обусловленные удалением двух ацетильных групп ( $m/z$  531→489, 447) и фрагмента гексозы ( $m/z$  447→285) (рис. 1б) [19].

В продуктах кислотного гидролиза соединения **1** с ТФУ были обнаружены лютеолин и D-глюкоза. Сигнал аномерного протона углеводного фрагмента находился в области 5,10 м.д. ( $\delta_H$ , д,  $J = 8,1$  Гц), что характерно для  $\beta$ -аномера глюкозы [20]. Спектры ЯМР были близки к таковым лютеолин-7-O- $\beta$ -D-глюкопиранозида (**2**) [16] за исключением дополнительных сигналов ацетильных групп в спектрах  $^1H$  ( $\delta_H$  1.95/2.07) и  $^{13}C$  ( $\delta_C$  20.5/21.4 м.д., 170.0/172.5 м.д.) (табл. 1). Сигналы протонов H-3'' и H-6'' глюкопиранозы у **1** были сдвинуты в слабое поле в сравнении с таковыми **2** ( $\delta_H$  3.40→4.98 для H-3''; 3.57/3.79→4.22/4.59 для H-6''), что также наблюдалось для сигналов углерода C-3'' ( $\delta_C$  77.0→78.2) и C-6'' ( $\delta_C$  60.8→63.9) при одновременном сильнополюном сдвиге сигналов соседних атомов углерода ( $\delta_C$  C-2'' 74.5→72.8; C-4'' 70.9→69.5; C-5'' 78.0→75.6). Указанные особенности спектров ЯМР свидетельствовали о наличии замещения у C-3'' и C-6'' глюкопиранозы [20], что подтвердили существующие корреляции в спектре НМВС между сигналами протона H-3'' с  $\delta_H$  4.98 м.д. и H-6'' с  $\delta_H$  4.22/4.59 м.д. и углеродов ацетильных карбониллов с  $\delta_C$  172.5 и 170.0 м.д., соответственно (рис. 1в).

Таким образом, соединение **1** представляло собой диацетилированный аналог **2**, которому было определено строение лютеолин-7-O-(3'',6''-ди-O-ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозида, являющегося новым природным флавоноидом (рис. 1г).

Известен один природный ацетат лютеолин-7-O-глюкозида – лютеолин-7-O-(6''-O-ацетил)-глюкозид, выделенный из *Salix gilgiana* Seemen (Salicaceae) [17]. Присутствие фрагмента уксусной кислоты у гликозидов лютеолина было также выявлено в лютеолин-3'-O-глюкуронидах (3''- и 4''-O-моноацетаты), лютеолин-7-O-(2''-O-апиозил)-ксилозиде (3'''-O-ацетат), лютеолин-7-O-(2''-O-аллозил)-глюкозиде (6'''-O-ацетат) и лютеолин-7-O-софорозиде (6'''-O-ацетат) [21].

Среди известных соединений в листьях *N. multifida* были идентифицированы лютеолин-7-O-глюкозид (**2**), апигенин-7-O-глюкозид (**3**), лютеолин-7-O-глюкуронид (**4**), апигенин-7-O-глюкуронид (**5**), лютеолин-7-O-(6''-O-ацетил)-глюкозид (**6**), апигенин-7-O-(6''-O-ацетил)-глюкозид (**7**), розмариновая кислота (**8**), сальвианоловая кислота А (**9**), сальвианоловая кислота В (**10**), схизотенуин А (**11**), непетамултин А (**12**), лютеолин-7-O-неогеспериозид (**13**), лютеолин-7-O-рутинозид (**14**), апигенин-7-O-неогеспериозид (**15**) и апигенин-7-O-рутинозид (**16**) (рис. 2). Присутствие соединений **2–12** было показано ранее в цветках *N. multifida* [10, 11], а **13–16** обнаружены впервые для вида. Изучаемый вид относится к подсекции *Schizonereta* Benth. рода *Nepeta*, в которую кроме *N. multifida* входят *N. annua* Pall. и *N. tenuifolia* Benth. В составе фенольных соединений *N. tenuifolia* были обнаружены **2, 3, 4, 8, 11** и **14**, а в *N. annua* – **2** [5], что указывает на широкое распространение производных лютеолина, апигенина и розмариновой кислоты в видах данной подсекции.

Исследование количественного профиля фенольных соединений листьев *N. multifida* было проведено с применением ВЭЖХ-УФ на образцах сырья, собранных в различные фазы вегетации (рис. 3).

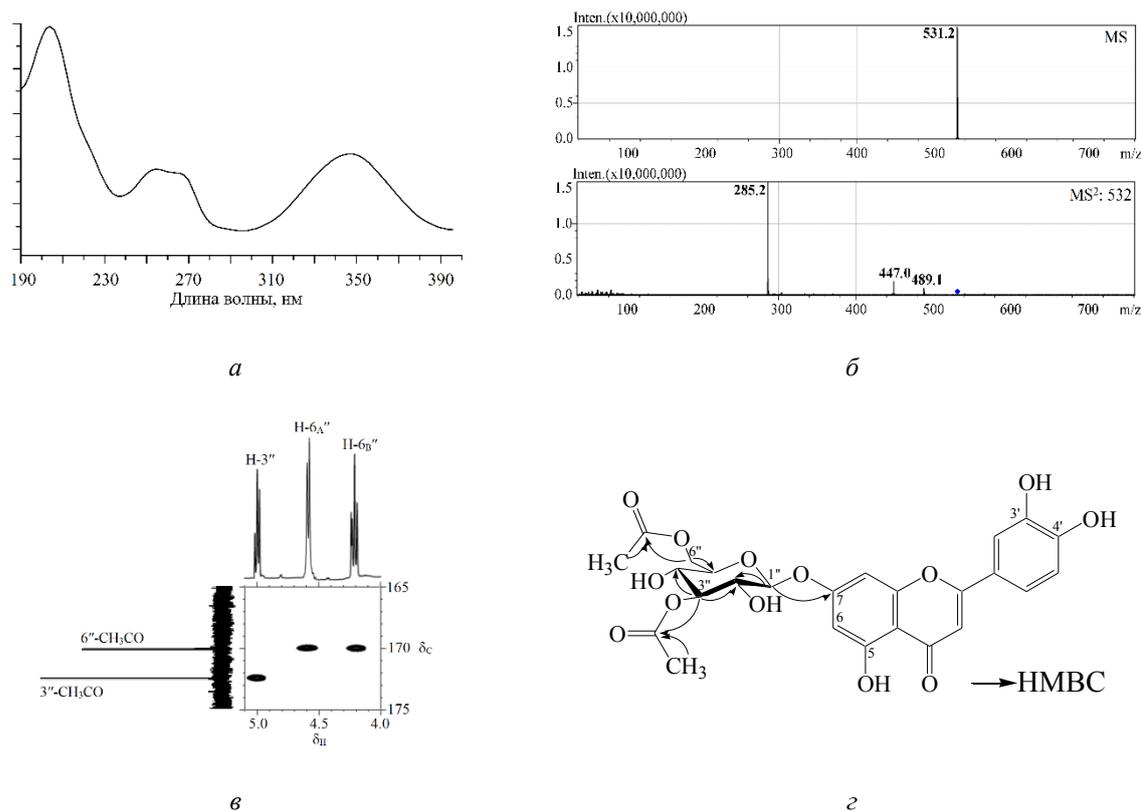


Рис. 1. Спектр поглощения (а), масс-спектры (MS и MS<sup>2</sup>, отрицательная ионизация; б), фрагмент спектра HMBC (в) и структурная формула (г; стрелками указаны некоторые корреляции в спектре HMBC) соединения **1** {лютеолин-7-*O*-(3'',6''-ди-*O*-ацетил)-β-D-глюкопиранозид}

Таблица 1. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 298 К, δ<sub>H</sub>, м.д., J/Гц) и <sup>13</sup>C (125 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 298 К, δ<sub>C</sub>, м.д.) соединения **1**

C-атом	δ <sub>H</sub> *	δ <sub>C</sub> *
2		165.5
3	6.75 (1H, c)	103.5
4		181.9
5		161.3
6	6.44 (1H, д, J = 2.0 Гц)	99.5
7		162.9
8	6.79 (1H, д, J = 2.0 Гц)	94.9
9		157.3
10		105.8
1'		121.5
2'	7.46 (1H, д, J = 2.1 Гц)	114.0
3'		146.2
4'		146.9
5'	6.92 (1H, д, J = 8.1 Гц)	116.2
6'	7.51 (1H, дд, J = 8.1/2.1 Гц)	119.5
1''	5.10 (1H, д, J = 8.1 Гц)	102.3
2''	3.69 (1H, дд, J = 9.0/8.1 Гц)	72.8
3''	4.98 (1H, дд, J = 9.5/9.0 Гц)	78.2
4''	3.40 (1H, дд, J = 9.5/9.6 Гц)	69.5
5''	3.72–3.73 (1H, м)	75.6
6''	4.22 (1H, дд, J = 12.0/5.1 Гц); 4.59 (1H, д, J = 12.0 Гц)	63.9
3''-CH <sub>3</sub> CO	2.07 (3H, c)	172.5; 20.5
6''-CH <sub>3</sub> CO	1.95 (3H, c)	170.0; 21.4

\*Лютеолин-7-*O*-β-D-глюкопиранозид: сигналы 7-*O*-β-D-глюкопиранозы – δ<sub>H</sub> 5.12 (1H, д, J = 8.1 Гц; H-1''), 3.35–3.36 (1H, м; H-2''), 3.40–3.42 (1H, м; H-3''), 3.20–3.21 (1H, м; H-4''), 3.48–3.52 (1H, м; H-5''), 3.57 (1H, дд, J = 12.0/5.1 Гц; H-6B''), 3.79 (1H, д, J = 12.0 Гц; H-6A''); 102.8 (C-1''), 74.5 (C-2''), 77.0 (C-3''), 70.9 (C-4''), 78.0 (C-5''), 60.8 (C-6'').

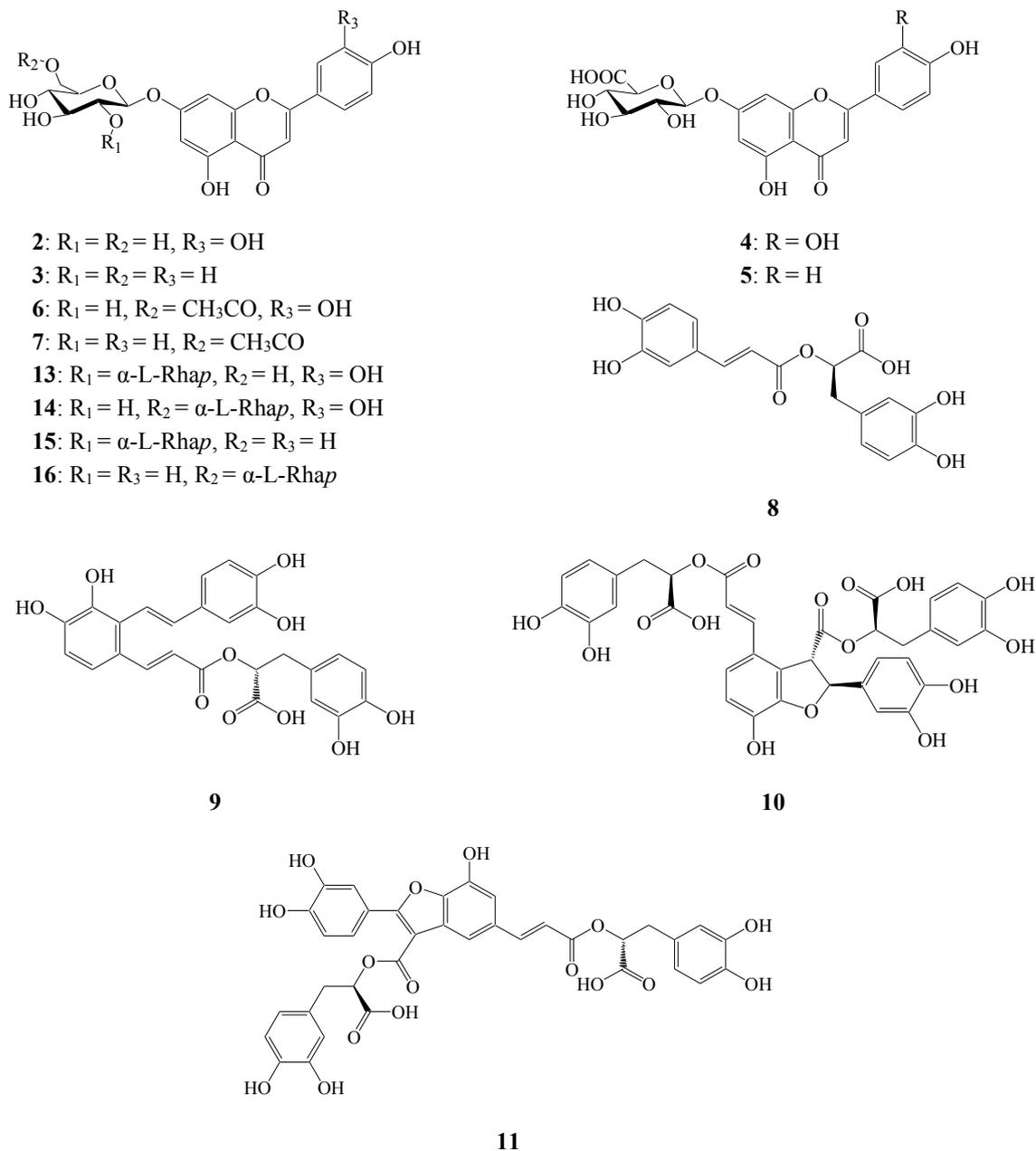


Рис. 2. Структурные формулы соединений 2–16, выделенных из листьев *N. multifida*.  $\alpha\text{-L-Rhap}$  –  $\alpha\text{-L}$ -рамнопираноза

Анализ содержания двенадцати соединений выявил изменение суммарной концентраций фенольных соединений в течение сезонного роста растения от 16.21 до 69.69 мг/г (табл. 2). Доминирующим соединением листьев *N. multifida* была розмариновая кислота, содержание которой варьировало от 8.36 мг/г в начале вегетации до наибольшего показателя в фазы цветения и плодоношения (32.68–35.71 мг/г), снижаясь к концу вегетации до 14.01 мг/г. Содержание других гидроксикиннамов, включая схизотенуин А, сальвианоловые кислоты А и В, составило 5.29–9.56, 0.59–2.35 и 0.53–1.40 мг/г соответственно, а наибольшая концентрация данной группы фенолов была выявлена в фазу цветения (46.38 мг/г). Основной группой флавоноидных соединений были гликозиды лютеолина, причем лютеолин-7-*O*-гликуронид и его 6''-*O*-ацетильное производное были главными флавонами листьев *N. multifida*. Характер накопления соединений был сходным: наблюдалось повышение от начала вегетации до фазы цветения и плодоношения и снижения к концу вегетации. Варьирование концентраций лютеолин-7-*O*-гликуронид и лютеолин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-гликозид составило 2.03–14.18 и 0.53–6.93 мг/г, соответственно. Содержание гликозидов апигенина в листьях *N. multifida* не превышало 2.16 мг/г. Полученные результаты свидетельствовали о том, что оптимальными сроком сбора листьев *N. multifida* являются период цветения и плодоношения растения.

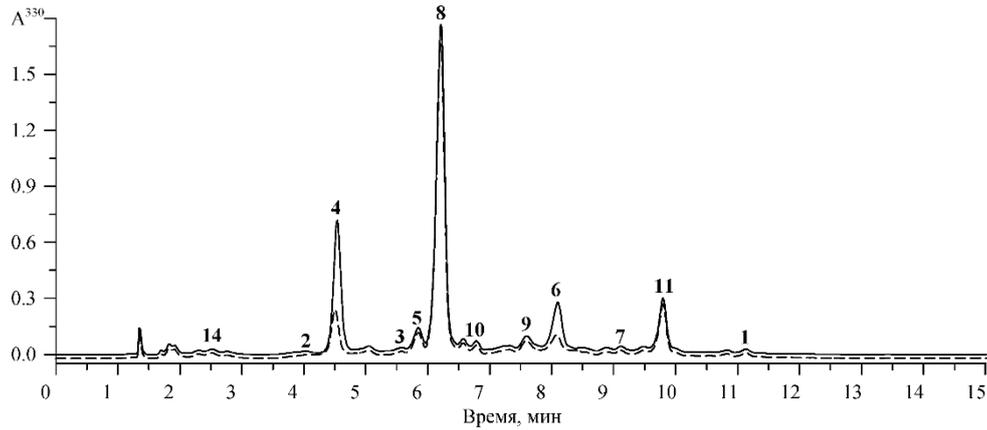


Рис. 3. Хроматограмма (ВЭЖХ-УФ) экстракта листьев *N. multifida* ( $\lambda$  330 нм; образец сырья собран в фазу цветения) до (прямая линия) и после инкубации с ацетилхолинэстеразой из *Electrophorus electricus* (пунктирная линия). Числами обозначено положение соединений: **1** – лютеолин-7-*O*-(3'',6''-ди-*O*-ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозид, **2** – лютеолин-7-*O*-глюкозид, **3** – апигенин-7-*O*-глюкозид, **4** – лютеолин-7-*O*-глюкуронид, **5** – апигенин-7-*O*-глюкуронид, **6** – лютеолин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-глюкозид, **7** – апигенин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-глюкозид, **8** – розмариновая кислота, **9** – сальвианоловая кислота А, **10** – сальвианоловая кислота В, **11** – схизотенуин А, **14** – лютеолин-7-*O*-рутинозид

Таблица 2. Содержание некоторых соединений в листьях *N. multifida*, мг/г воздушно-сухого сырья (S.D.)

Соединение	Фаза вегетации (срок сбора, количество растений)*				
	Начало вегетации (2–5 июня, n=30)	Вегетация (28–30 июня, n=28)	Цветение (15–18 июля, n=45)	Плодоношение (10–14 августа, n=38)	Отмирание (28–31 августа, n=22)
Лютеолин-7- <i>O</i> -глюкуронид	2.03 (0.28)	10.37 (0.93)	14.10 (1.55)	14.18 (1.63)	8.22 (0.98)
Лютеолин-7- <i>O</i> -глюкозид	<0.01	<0.01	0.28 (0.02)	0.38 (0.04)	3.67 (0.44)
Лютеолин-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	0.53 (0.07)	2.88 (0.25)	6.55 (0.78)	6.93 (0.62)	3.76 (0.45)
Лютеолин-7- <i>O</i> -(3'',6''-ди- <i>O</i> -ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозид	н.о.	н.о.	0.22 (0.02)	<0.01	н.о.
Лютеолин-7- <i>O</i> -рутинозид	н.о.	н.о.	<0.01	<0.01	н.о.
Апигенин-7- <i>O</i> -глюкуронид	<0.01	0.82 (0.07)	2.14 (0.25)	1.85 (0.16)	0.53 (0.04)
Апигенин-7- <i>O</i> -глюкозид	н.о.	<0.01	0.02 (0.00)	<0.01	н.о.
Апигенин-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	н.о.	н.о.	<0.01	<0.01	н.о.
Розмариновая кислота	8.36 (0.92)	22.14 (1.99)	35.71 (5.36)	32.68 (3.92)	14.01 (1.96)
Сальвианоловая кислота А	<0.01	0.59 (0.43)	1.78 (0.16)	2.35 (0.19)	2.06 (0.23)
Сальвианоловая кислота В	<0.01	<0.01	0.53 (0.05)	1.40 (0.15)	0.99 (0.11)
Схизотенуин А	5.29 (0.47)	7.53 (0.92)	8.36 (1.17)	9.56 (1.05)	9.24 (0.83)
Суммарное содержание фенольных соединений, в том числе	16.21	44.33	69.69	69.33	42.48
гликозидов лютеолина	2.56	13.25	21.15	21.49	15.65
гликозидов апигенина	<0.01	0.82	2.16	1.85	0.53
флавои- <i>O</i> -гликозидов	2.56	14.07	23.31	23.34	16.18
гидроксидинаматов	13.65	30.26	46.38	45.99	26.30

\*н.о. – не обнаружено.

Исследование биологической активности экстракта листьев *N. multifida* показало наличие ингибиторного действия на ацетилхолинэстеразу с концентрацией полумаксимального ингибирования фермента (IC<sub>50</sub>) 105.33±4.73 мкг/мл. Хроматографический анализ экстракта до и после инкубации с ацетилхолинэстеразой из *Electrophorus electricus* выявил значительное снижение площади пиков двух соединений – лютеолин-7-*O*-глюкуронида (**4**) и лютеолин-7-*O*-(6''-*O*-ацетил)-глюкозида (**6**), что свидетельствовало об образовании нерастворимых комплексов между ферментом и флавоноидами (рис. 3). Показатели IC<sub>50</sub> для чистых соединений **4** и **6**

составили  $32.10 \pm 1.61$  и  $35.14 \pm 1.65$  мкг/мл, соответственно. Минорные гликозиды лютеолина также демонстрировали выраженное ингибирование фермента – лютеолин-7-*O*-(3'',6''-ди-*O*-ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозид (**1**; IC<sub>50</sub>  $43.69 \pm 1.74$  мкг/мл), лютеолин-7-*O*-глюкозид (**2**; IC<sub>50</sub>  $29.03 \pm 1.39$  мкг/мл), лютеолин-7-*O*-неогеспериозид (**13**; IC<sub>50</sub>  $57.45 \pm 2.98$  мкг/мл) и лютеолин-7-*O*-рутинозид (**14**; IC<sub>50</sub>  $58.36 \pm 2.80$  мкг/мл). Производные апигенина (**3**, **5**, **7**) и гидроксидинаматы были менее активными (**8–11**), показывая эффективность с IC<sub>50</sub> > 200 мкг/мл. Таким образом, гликозиды лютеолина являются компонентами, ответственными за проявление антиацетилхолинэстеразного эффекта экстракта листьев *N. multifida*. Ранее было показано, что ингибиторным действием на холинэстеразы обладают лютеолин [22], лютеолин-7-*O*-глюкозид [23] и лютеолин-7-*O*-рутинозид [24], что обусловлено влиянием орто-ди-гидрокси-замещенного кольца В в структуре этих флавоноидов. Присутствие гликозидов лютеолина характерно для многих видов *Nepeta*, а также представителей подтрибы Nepetinae семейства Lamiaceae [5], что, вероятно, является химическим признаком наличия у данных видов антихолинэстеразной активности.

### Выводы

1. Листья *Nepeta multifida* содержат бензофурановые лигнаны из группы розмариновой кислоты, а также *O*-гликозиды лютеолина и апигенина, включая новый флавоноид лютеолин-7-*O*-(3'',6''-ди-*O*-ацетил)- $\beta$ -D-глюкопиранозид.
2. Накопление фенольных соединений в листьях *N. multifida* зависит от фазы развития растения, причем наибольшее содержание выявлено в периоды цветения и плодоношения.
3. Гликозиды лютеолина, обнаруженные в листьях *N. multifida*, обладают ингибиторным влиянием на ацетилхолинэстеразу.

### Список литературы

1. Amirzargar N., Heidari-Soureshjani S., Yang Q., Abbaszadeh S., Khaksarian M. Neuroprotective effects of medicinal plants in cerebral hypoxia and anoxia: A systematic review // Nat. Prod. J. 2020. Vol. 10. Pp. 550–565. DOI: 10.2174/2210315509666190820103658.
2. Pineda-Ramírez N., Calzada F., Alquisiras-Burgos I., Medina-Campos O.N., Pedraza-Chaverri J., Ortiz-Plata A., Pinzón Estrada E., Torres I., Aguilera P. Antioxidant properties and protective effects of some species of the Annonaceae, Lamiaceae, and Geraniaceae families against neuronal damage induced by excitotoxicity and cerebral ischemia // Antioxidants. 2020. Vol. 9. 253. DOI: 10.3390/antiox9030253.
3. Hanafy D.M., Prenzler P.D., Burrows G.E., Gurusinghe S., Thejer B.M., Obied H.K., Hill R.A. Neuroprotective activity of *Mentha* species on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells // Nutrients. 2020. Vol. 12. 1366. DOI: 10.3390/nu12051366.
4. Topcu G., Kusman T. Lamiaceae family plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease // Bezmialem Sci. 2014. Vol. 1. Pp. 1–25. DOI: 10.14235/bs.2014.233.
5. Sharma A., Cooper R., Bhardwaj G., Cannoo D.S. The genus *Nepeta*: Traditional uses, phytochemicals and pharmacological properties // J. Ethnopharmacol. 2021. Vol. 268. 113679. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113679.
6. Flora of Siberia. Vol. 11. Pyrolaceae-Lamiaceae / ed. L.I. Malyshev. CRC Press: Boca-Raton, USA, 2006. 310 p.
7. Флора Центральной Сибири / ред. З.Д. Малышев, Г.А. Пешкова. Новосибирск, 1979. 536 с.
8. Liu Z.L., Chu S.S., Jiang G.H. Toxicity of *Schizonpeta multifida* essential oil and its constituent compounds towards two grain storage insects // J. Sci. Food Agricult. 2011. Vol. 91. Pp. 905–909. DOI: 10.1002/jsfa.4263.
9. Liu J.-T., Yu J.-C., Jiang H.-M., Zhao X.-J., Fan S.-D. Crystal structure and properties of the carboxylic acid derivatives of *Schizonpeta multifida* (L.) Briq. // Chin. J. Chem. 2008. Vol. 26. Pp. 1129–1132. DOI: 10.1002/cjoc.200890201.
10. Olennikov D.N. New benzofuran lignans from *Nepeta multifida* // Chem. Nat. Comp. 2021. Vol. 57. Pp. 818–822. DOI: 10.1007/s10600-021-03488-7.
11. Kashchenko N.I., Olennikov D.N. Glycosides of rosmarinic acid from *Nepeta multifida* // Chem. Nat. Comp. 2022. Vol. 58. Pp. 274–278. DOI: 10.1007/s10600-022-03658-1.
12. Баторова С.М., Яковлев Г.П., Асеева Т.А. Справочник лекарственных растений традиционной тибетской медицины. Новосибирск: Наука, 2013. 293 с.
13. Разуваева Я.Г., Харжеев Д.В., Торопова А.А., Оленников Д.Н. Стресс-протективное и антиоксидантное действие экстракта сухого *Schizonpeta multifida* (L.) Briq. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018. Т. 21. С. 5–10. DOI: 10.29296/25877313-2018-07-02.
14. Razuvaeva Y.G., Toropova A.A., Olennikov D.N., Kharzheev D.V. Antihypoxic activity of the dry extract from *Nepeta multifida* L. // Nat. Prod. Rep. 2021. DOI:10.1080/14786419.2021.1935932.
15. Olennikov D.N., Nikolaev V.M., Chirikova N.K. Sagan Dalya tea, a new “old” probable adaptogenic drug: Metabolic characterization and bioactivity potentials of *Rhododendron adamsii* leaves // Antioxidants. 2021. Vol. 10. 863. DOI: 10.3390/antiox10060863.

16. Malikov V.M., Yuldashev M.P. Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. genus. Distribution, structure, and properties // Chem. Nat. Comp. 2002. Vol. 38. Pp. 358–406. DOI: 10.1023/A:1021638411150.
17. Mizuno M., Kato M., Iinuma M., Tanaka T., Kimura A., Ohashi H., Sakai H. Acylated luteolin glucosides from *Salix gilgiana* // Phytochemistry. 1987. Vol. 26. Pp. 2418–2420. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)84739-1.
18. Matsuta M., Kanita R., Saito Y., Yamashita A. The 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitory active flavonoids and phenylpropanoids from *Schizonepeta* spikes // Nat. Med. 1996. Vol. 50. Pp. 204–211.
19. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kashchenko N.I., Nikolaev V.M., Kim S.-W., Vennos C. Bioactive phenolics of the genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the Siberian species and their inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9. 756. DOI: 10.3389/fphar.2018.00756.
20. Bock K., Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. Vol. 41 (C). Pp. 27–66. DOI: 10.1016/S0065-2318(08)60055-4.
21. Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications / eds. Ø.M. Andersen, K.R. Markham. CRC Press, Boca Raton, USA, 2006. 1197 p.
22. Tundis R., Bonesi M., Menichini F., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., Menichini F. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents // Nat. Prod. Commun. 2012. Vol. 7. Pp. 1015–1020. DOI:10.1177/1934578x1200700814.
23. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Vennos C. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of *Gentianella azurea* from Russian Federation // Nat. Prod. Commun. 2017. Vol. 12. Pp. 55–56. DOI: 10.1177/1934578x1701200115.
24. Orhan I., Kartal M., Tosun F., Şener B. Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anti-cholinesterase potential // Z. Naturforsch. C. 2007. Vol. 62. Pp. 829–832. DOI: 10.1515/znc-2007-11-1210.

Поступила в редакцию 14 ноября 2021 г.

После переработки 6 декабря 2021 г.

Принята к публикации 9 декабря 2021 г.

**Для цитирования:** Кашченко Н.И., Оленников Д.Н. Флавоноиды и лигнаны листьев *Nepeta multifida* (Lamiaceae) и их биологическая активность // Химия растительного сырья. 2022. №2. С. 85–94. DOI: 10.14258/jcrpm.20220210569.

*Kashchenko N.I., Olennikov D.N.\** FLAVONOIDS AND LIGNANS FROM THE LEAVES OF *NEPETA MULTIFIDA* (LAMIACEAE) AND THEIR BIOACTIVITY

*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, ul. Sakh'yanovoy, 6, Ulan-Ude, 670047 (Russia), e-mail: olennikovdn@mail.ru*

A perennial plant *Nepeta multifida* L. (syn. *Schizonepeta multifida* (L.) Briq.) is one of the most common species of the Lamiaceae family growing in Eastern Siberia and used in traditional oriental medicine. The chemical composition of *N. multifida* has not been sufficiently studied. Chromatographic separation of phenolic compounds of *N. multifida* leaves using column chromatography and preparative HPLC resulted in the isolation of sixteen compounds, including a new flavonoid identified as luteolin-7-*O*-(3'',6''-di-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside. Known compounds were *O*-glycosides of luteolin and apigenin, rosmarinic acid, salvianolic acids A and B, and schizotenuin A. Quantitative analysis of *N. multifida* leaves by HPLC-UV assay showed the high content of rosmarinic acid (8.36–35.71 mg/g), luteolin-7-*O*-glucuronide (2.03–14.18 mg/g) and schizotenuin A (5.29–9.56 mg/g). The highest level of phenolic compounds was found in the flowering and fruiting phases. Using Ellman's spectrophotometric method, it was found that *N. multifida* leaf extract and some compounds had antiacetylcholinesterase activity, and luteolin glycosides being the most active showed the level of concentration of half-maximal enzyme inhibition (IC<sub>50</sub>) 29.03–58.36  $\mu$ g/mL. Thus, as a result of the present study, it was found that the leaves of *N. multifida* contain various groups of phenolic compounds capable of inhibiting the activity of acetylcholinesterase.

**Keywords:** *Nepeta multifida*, *Schizonepeta*, Lamiaceae, flavonoids, luteolin, rosmarinic acid, HPLC-UV, acetylcholinesterase.

---

\* Corresponding author.

**References**

1. Amirzargar N., Heidari-Soureshjani S., Yang Q., Abbaszadeh S., Khaksarian M. *Nat. Prod. J.*, 2020, vol. 10, pp. 550–565. DOI: 10.2174/2210315509666190820103658.
2. Pineda-Ramírez N., Calzada F., Alquisiras-Burgos I., Medina-Campos O.N., Pedraza-Chaverri J., Ortiz-Plata A., Pinzón Estrada E., Torres I., Aguilera P. *Antioxidants*, 2020, vol. 9, 253. DOI: 10.3390/antiox9030253.
3. Hanafy D.M., Prenzler P.D., Burrows G.E., Gurusinge S., Thejer B.M., Obied H.K., Hill R.A. *Nutrients*, 2020, vol. 12, 1366. DOI: 10.3390/nu12051366.
4. Topcu G., Kusman T. *Bezmialem Sci.*, 2014, vol. 1, pp. 1–25. DOI: 10.14235/bs.2014.233.
5. Sharma A., Cooper R., Bhardwaj G., Cannoo D.S. *J. Ethnopharmacol.*, 2021, vol. 268, 113679. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113679.
6. *Flora of Siberia. Vol. 11. Pyrolaceae-Lamiaceae*, ed. L.I. Malyshev. CRC Press: Boca-Raton, USA, 2006, 310 p.
7. *Flora Tsentral'noy Sibiri [Flora of Central Siberia]*, ed. Z.D. Malyshev, G.A. Peshkova. Novosibirsk, 1979, 536 p. (in Russ.).
8. Liu Z.L., Chu S.S., Jiang G.H. *J. Sci. Food Agric.*, 2011, vol. 91, pp. 905–909. DOI: 10.1002/jsfa.4263.
9. Liu J.-T., Yu J.-C., Jiang H.-M., Zhao X.-J., Fan S.-D. *Chin. J. Chem.*, 2008, vol. 26, pp. 1129–1132. DOI: 10.1002/cjoc.200890201.
10. Olennikov D.N. *Chem. Nat. Comp.*, 2021, vol. 57, pp. 818–822. DOI: 10.1007/s10600-021-03488-7.
11. Kashchenko N.I., Olennikov D.N. *Chem. Nat. Comp.*, 2022, vol. 58, pp. 274–278. DOI: 10.1007/s10600-022-03658-1.
12. Batorova S.M., Yakovlev G.P., Aseyeva T.A. *Spravochnik lekarstvennykh rasteniy traditsionnoy tibetskoy me-ditsiny*. [Reference book of medicinal plants of traditional Tibetan medicine]. Novosibirsk, 2013, 293 p. (in Russ.).
13. Razuvayeva Ya.G., Kharzheyev D.V., Toropova A.A., Olennikov D.N. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2018, vol. 21, pp. 5–10. DOI: 10.29296/25877313-2018-07-02. (in Russ.).
14. Razuvaeva Y.G., Toropova A.A., Olennikov D.N., Kharzheev D.V. *Nat. Prod. Rep.*, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1935932.
15. Olennikov D.N., Nikolaev V.M., Chirikova N.K. *Antioxidants*, 2021, vol. 10, 863. DOI: 10.3390/antiox10060863.
16. Malikov V.M., Yuldashev M.P. *Chem. Nat. Comp.*, 2002, vol. 38, pp. 358–406. DOI: 10.1023/A:1021638411150.
17. Mizuno M., Kato M., Iinuma M., Tanaka T., Kimura A., Ohashi H., Sakai H. *Phytochemistry*, 1987, vol. 26, pp. 2418–2420. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)84739-1.
18. Matsuta M., Kanita R., Saito Y., Yamashita A. *Nat. Med.*, 1996, vol. 50, pp. 204–211.
19. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kashchenko N.I., Nikolaev V.M., Kim S.-W., Vennos C. *Front. Pharmacol.*, 2018, vol. 9, 756. DOI: 10.3389/fphar.2018.00756.
20. Bock K., Pedersen C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1983, vol. 41 (C), pp. 27–66. DOI: 10.1016/S0065-2318(08)60055-4.
21. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications*, eds. Ø.M. Andersen, K.R. Markham. CRC Press, Boca Raton, USA, 2006, 1197 p.
22. Tundis R., Bonesi M., Menichini F., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., Menichini F. *Nat. Prod. Commun.*, 2012, vol. 7, pp. 1015–1020. DOI:10.1177/1934578x1200700814.
23. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Vennos C. *Nat. Prod. Commun.*, 2017, vol. 12, pp. 55–56. DOI: 10.1177/1934578x1701200115.
24. Orhan I., Kartal M., Tosun F., Şener B. *Z. Naturforsch. C*, 2007, vol. 62, pp. 829–832. DOI: 10.1515/znc-2007-11-1210.

Received November 14, 2021

Revised December 6, 2021

Accepted December 9, 2021

**For citing:** Kashchenko N.I., Olennikov D.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 2, pp. 85–94. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprn.20220210569.