

УДК 547.9:582.284.5

СОСТАВ ЛИПОФИЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭФИРНОГО ЭКСТРАКТА РОДОДЕНДРОНА АДАМСА И АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-COV-2

© Т.П. Кукина^{1*}, И.А. Елишин^{1,2}, О.И. Сальникова¹, П.В. Колосов^{3,4}, Ц. Сандаг⁵, Д.А. Каракай¹, М.А. Бондарева¹, А.А. Нефедов¹, В.Ю. Чиркова⁴, Е.А. Шарлаева⁴, С.В. Беленькая^{2,6}, Д.Н. Щербаков^{4,6}

¹ Новосибирский институт органической химии СО РАН им. Н.Н. Ворожцова, пр. Акад. Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090 (Россия), e-mail: kukina@nioch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 (Россия)

³ ООО «ВакБиоЛаб», ул. Технопарковая, 1/26, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 (Россия)

⁴ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия)

⁵ Школа биомедицины, Монгольский государственный университет медицинских наук, ул. С. Зориг, 3, Улаанбаатар 14210 (Монголия)

⁶ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 (Россия)

Изучен состав липофильных компонентов рододендрона Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. Кислые и нейтральные компоненты идентифицировали при помощи газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. В качестве экстрагента сырья использован метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), обладающий всеми достоинствами диэтилового эфира, но лишенный его недостатков. Он не образует перекисей и не создает повышенной загрязненности за счет более высокой температуры кипения. В результате сравнением с базами данных идентифицированы тритерпеновые, фенолкарбоновые и алифатические кислоты с длиной цепи от 8 до 30 атомов углерода, включая насыщенные, ненасыщенные и двухосновные кислоты. Идентифицировано более 150 терпеновых и алифатических компонентов неомыляемого остатка и кислых фракций. Ранее неомыляемые остатки липофильных экстрактов практически не изучались. Подробно исследованы лишь компоненты эфирных масел *Rh.adamsii* и других видов рода рододендрон. Для проведения тестирования биоактивности подготовлены образцы цельного экстракта и продуктов его фракционирования. Некоторые исследованные образцы проявляли ингибирующую активность в отношении основной протеазы SARS-CoV-2.

Ключевые слова: *Rhododendron adamsii* Rehd., рододендрон Адамса, экстрактивные вещества, метил-трет-бутиловый эфир, фенолкарбоновые кислоты, неомыляемый остаток, 3CLpro, SARS-CoV-2.

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка комплексного метода выделения и *in vitro* анализа биологически активных фракций лекарственных растений» РФФИ № 20-54-44016, а также при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355), в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Введение

Лекарственные растения, повышающие умственную и физическую работоспособность, дающие энергию, но с минимумом побочных эффектов и привыкания, все больше и больше пользуются спросом. К одному из таких растений и относится рододендрон Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. [1, 2].

Рододендронов всего около 600 видов, в России в диком виде произрастают 16 видов рододендронов. На территории Сибири и Дальнего Востока произрастают 13 видов-эндемиков и 3 вида на остальной части России. В России ареал рододендрона Адамса проходит по Енисею, к югу по Туве (хр. Танну-Ола, Сангилен, Хайгайга), захватывает Восточный Саян, затем граница проходит вдоль побережья Северного Байкала (м. Шартла) и идет на север Якутии в Олекминский, Томпонский районы до Алданского нагорья. На востоке России рододендрон Адамса заходит на охотское побережье (до с. Аян) и северную часть о. Сахалин. Ареал продолжается в юго-восточной части Азии, многочислен в Монголии, где применяется в народной медицине [1, 2]. Кроме того, распространен в Восточном и Западном Саяне, Хамар-Дабане, на Баргузинском хребте, северо-восточных предгорьях Тибета. Растет в высокогорьях на умеренно влажных и сухих каменистых полузатененных или лишайниковых склонах у верхней границы горных лесов (от 1300 до 2500 м), иногда спускаясь в лесной пояс. Является психрофитом и криофитом, т.е. растением влажных и холодных местообитаний. В природе этот вид кальцефил, т.е. приурочен к выходам известняка [3, 4].

Химический состав рододендрона Адамса довольно подробно изучен [5]. В составе этого растения обнаружены эфирные масла, содержащие, неролидол, гермакрон, селинен, элеменол, гумулен, фарнезен и другие [3, 4]. А.Д. Рогачев с сотрудниками подробно исследовали эфирное масло *Rh. adamsii*, при этом идентифицировано 55 летучих компонентов преимущественно моно- и сесквитерпенового строения [6]. Сравнение с эфирными маслами других распространенных в России видов рододендрона показало сходство качественного состава [7–9]. В сырье *Rh. adamsii* найден дитерпеноидандроомедотоксин [10, 11], алифатические органические кислоты, включая мальваловую и стеркуловую, содержащие циклопропановый фрагмент [12]. Обнаружены тритерпеновые кислоты урсоловая и олеаноловая [5, 13–16]. Авторы работы [16] использовали ВЭЖХ в качестве рабочего инструмента. Помимо тритерпеновых кислот авторы обнаружили фенольные соединения (арбутин), флавоноиды (мирицетин, кверцетин, дигидрокверцетин и рутин), стероиды (β -ситостерин). Авторы публикации [17], исследуя методом ВЭЖХ флавоноиды растения, подтвердили полученные

Кукина Татьяна Петровна – старший научный сотрудник, доцент, e-mail: kukina@nioch.nsc.ru

Елшин Иван Александрович – аспирант, e-mail: populusn@yandex.ru

Сальникова Ольга Иосифовна – ведущий инженер ГМС ЦСИ, e-mail: olga@nioch.nsc.ru

Колосов Петр Владимирович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, e-mail: petro.kolosov@gmail.com

Сандаг Цогтсайхан – MD, PhD, Professor, e-mail: tsogetsaikhan.s@mnum.s.edu.mn

Каракай Дарья Александровна – младший научный сотрудник, e-mail: karakay@nioch.nsc.ru

Бондарева Мария Александровна – инженер 2 категории, e-mail: bondareva@nioch.nsc.ru

Нефедов Андрей Алексеевич – старший научный сотрудник группы масс-спектрометрии Центра спектральных исследований НИОХ СО РАН, e-mail: nefyodov@nioch.nsc.ru

Чиркова Варвара Юрьевна – специалист по УМР кафедры физико-химической биологии и биотехнологии, e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Шарлаева Елена Анатольевна – канд. биол. наук, доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии, e-mail: sharlaeva1@mail.ru

Беленькая Светлана Валерьевна – канд. биол. наук, научный сотрудник, e-mail: Belenkaya.svetla@gmail.com

Щербakov Дмитрий Николаевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, e-mail: scherbakov_dn@vector.nsc.ru

новые результаты и вычислили количественное соотношение компонентов, введя поправки на разницу в поглощении различных флавоноидов на разных длинах волн. Исследуя экстракт, полученный CO₂-экстракцией с добавлением этанола, авторы работы [18] обнаружили и идентифицировали более 50 компонентов, включая некоторые пренилированные компоненты, ранее выделенные количественно и охарактеризованные сотрудниками НИОХ СО РАН [19]. Работа [20] подробно описывает динамику накопления биоактивных метаболитов в *Rh. adamsii* на разных этапах вегетации. Изучив состав более 200 образцов сырья, собранного в течение года, авторы идентифицировали более 170 компонентов экстрактов сырья метанолом, водой и водным метанолом. При этом определен состав гликозидированных терпеноидов, ранее не исследованных для этого растения. Экстракты также протестированы на некоторые виды активности и показали высокие результаты. Мы сосредоточили свое внимание на малополярных метаболитах, изучив состав и активность в тесте ингибирования основной протеазы (3CLpro)SARS-CoV-2.

Экспериментальная часть

Экстракция и анализ экстрактов. Сырье надземной части рододендрон Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. заготовлено в фазу отмирания цветочных побегов в августе 2021 г. в окрестностях села Орлик, Республика Бурятия и высушено при комнатной температуре в помещении без доступа прямых солнечных лучей. Воздушно-сухое сырье размолото на шнековом измельчителе и просеяно через сито с отверстиями размером 2 мм. Экстракты для исследования получали исчерпывающей экстракцией с помощью метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ) как описано ранее [21–24] в насадке Сокслета. в течение 20 ч (3×6–7 ч). Выход экстрактивных липофильных веществ при исчерпывающей экстракции МТБЭ достигает 18.4% от веса сырья. Также в работе были получены этанольный экстракт после исчерпывающей экстракции сырья гексаном и МТБЭ и водный экстракт после исчерпывающей экстракции гексаном, МТБЭ и этанолом. Обработка экстракта и хроматографическая очистка компонентов неомыляемого остатка (НО) проведена аналогично [21–24]. Пробоподготовка для ГХ-МС-анализа включала выделение свободных кислот щелочным экстрагентом (2% водный раствор едкого натра) и гидролиз экстракта, освобожденного от свободных кислот, 15%-ным водно-спиртовым раствором едкого кали. Получены 3 фракции: свободные кислоты (выход 38.7%), связанные кислоты (19.8%) и неомыляемый остаток (НО, 38.5%). Кислые компоненты метилировали диазометаном, нейтральные вещества НО подвергли хроматографическому разделению на колонке с силикагелем, элюент – гексан с повышающимся от 0 до 50% содержанием диэтилового эфира. Фракции отбирали в пробирки по 12–15 мл. Объединение фракций осуществляли в соответствии с результатами тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil и Silufol. Для развития хроматограммы использовали смесь гексана с МТБЭ с содержанием последнего от 10 до 50%. В качестве проявляющего реагента применяли смесь ванилина с серной кислотой и этанолом в соотношении 1 : 10 : 90 с последующим нагреванием. В результате получены концентраты углеводов, кетонов, алифатических и терпеновых спиртов, включая стеринны и диолы, анализ которых осуществляли при помощи ГХ-МС в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН. Компоненты НО анализировали без дериватизации. Хроматомасс-спектры записаны на приборе Hewlett Packard G 1800 A, состоящем из газового хроматографа HP 5890 серии II и масс-селективного детектора HP 5971. Колонка 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм с сорбентом HP-5MS (5% – дифенил, 95% – диметилсилоксан). Газ-носитель – гелий (1 мл/мин). Температура колонки: 2 мин при 50 °С, далее повышение температуры со скоростью 10 °С в мин до 300 °С, 30 мин при 300 °С. Температура испарителя 280 °С, источника ионов 170 °С. Идентификацию МЭЖК осуществляли с использованием библиотеки масс-спектров NIST 08 аналогично [21–24]. Содержание идентифицированных компонентов сведено в таблицы.

Оценка ингибирующей активности экстрактов. Ингибирующую активность экстрактов оценивали по величине IC50, за которую принимали концентрацию тестируемого экстракта (или фракции), снижающую уровень флуоресценции на 50% от наблюдаемого без добавления ингибитора, при деструкции пептидного субстрата рекомбинантной протеазой 3CLpro, как описано ранее [25]. Пептидный субстрат содержал пару, флуорофор (Dabcyl) – тушитель (Edans), обеспечивающие FRET-эффект. Уровень флуоресценции, возникающий вследствие расщепления пептидного субстрата Dabcyl-KTSAVLQ↓SGFRKME(Edans)NH₂ протеазой 3CLpro, регистрировали с помощью прибора CLARIOstar Plus (BMG Labtech) при длинах волн 355 и 460 нм для возбуждения/излучения соответственно. Реакционные смеси, содержащие Tris HCl буфер, флуорогенный субстрат, тестируемый экстракт и 3CLpro, готовили и инкубировали в течение 30 мин в 384 луночном планшете при 30 °С. Калибровку прибора проводили по раствору пептида, подвергнутого полному гидролизу. Измерение проводили в трехкратной повторности в режиме кинетического сканирования. Для расчетов IC50 использовали сопутствующее программное обеспечение MARS DataAnalysis.

Обсуждение результатов

Полученные в ходе хроматографического разделения фракции содержали алифатические, ароматические и терпеновые компоненты. В таблицу 1 сведены результаты анализа нейтральных алифатических компонентов.

Из таблицы 1 следует, что во фракциях алифатических углеводов и кетонов преобладают нечетные компоненты. Исключение составляет сквален, который относят и к терпеновым соединениям. Спирты обнаружены в основном четные нормального строения.

Сравнение масс-спектров алифатических кетонов с базой данных указывает на преобладание во фракции соединений с кетогруппой во втором положении.

Экстрактивные нейтральные компоненты, идентифицированные в ходе анализа, включены в таблицу 2.

Таблица 1. Содержание алифатических нейтральных компонентов в надземной части *R. Adamsii Rehd.*, мг%

Углеводороды		Кетоны и альдегиды		Спирты			
Компонент	мг%	Компонент	мг %	Компонент	мг %		
Генэйкозан	2.2	2-Метилгептакозан	1.5	Гексаналь	5.6	1-Деканол	5.6
2-Метилгенэйкозан	0.4	Октакозан	1.2	Тетракозаналь	3.1	1-Октадеканол	22.4
Докозан	1.2	Нонакозан	197.5	2-Нонадеканон	1.3	Фитол	52.0
Трикозан	30.4	2-Метилнонакозан	3.3	2- Генэйкозанон	2.0	1-Нонадеканол	21.7
2-Метилтрикозан	1.6	Триаконтан	7.2	2-Трикозанон	1.2	1-Эйкозанол	71.2
Тетракозан	2.8	Гентриаконтан	73.3	2-Тетракозанон	0.3	1-Генэйкозанол	27.2
2-Метилтетракозан	1.6	Дотриаконтан	2.4	2-Пентакозанон	11.6	1-Докозанол	140.8
Пентакозан	17.2	Тритриаконтан	10.8	2-Гексакозанон	1.7	1-Тетракозанол	71.6
2-Метилпентакозан	2.4	Сквален	140.4	2-Гептакозанон	18.4	1-Пентакозанол	2.3
Гексакозан	0.4			2-Октакозанон	1.4	1-Гексакозанол	78.8
Гептакозан	10.2			2-Нонакозанон	8.8	1-Гептакозанол	3.7
				2-Гентриаконтанон	5.9	1-Октакозанол	15.3
						1-Триаконтанол	12.3

Таблица 2. Содержание терпеновых компонентов и ароматических соединений в надземной части *Rh. adamsii Rehd.*, мг%

Компонент	Содержание	Компонент	Содержание
1	2	3	4
Борнеол	2.4	α -Эвдесмол	4.6
Фенилэтиловый спирт	200.8	Эвдесма-3,5,11-триен	31.1
2-Бутанон,3-фенил	26.8	Эвдесм-7(11)-ен-4-ол	26.0
4-фенилбутанол	101.5	Гермакрон	20.8
Изоледен	6.0	(1R,7S)-Гермакра-4(15),5,10(14)-триен-1 β -ол	9.2
α -Копаен	2.4	Гермазон	55.1
Сативен	3.1	Гермакрон (изомер)	45.4
Селина-5,11-диен	4.4	Изоспатуленол	4.3
α -Гурьюнен	2.0	Гумуленол II	46.8
β -Гурьюнен	1.4	9,10-дигидро-9-(1-метилпропил)-антрацен	24.3
α -Панасинсен	2.8	Гексагидрофарнезиллацетон	0.8
Алло-аромадендрен	0.2	Куркуменон	1.6
Аромадендрен	47.6	α -Селинен	6.6
Фарнезен	4.5	2-(3,7-Диметил-окта-2,6-диенил-4-метокси)фенол	45.6
Гумулен	5.0	Оноцерол	16.6
(-)-Дегидроаромадендран	8.7	Эпи-горулазол	5.2
γ -Мууролен	4.8	Грифолин	1.2
Гермакрон D	1.6	Сквален*	140.8
β -Селинен	7.4	γ -Токоферол	3.2
(+)Леден	0.1	α -Токоферол (витамин E)	13.2
γ -Кадинен	4.4	Кампестерин	3.7
δ -Кадинен	1.7	Обтусифолиол	7.1
Каламенен	0.6	Стигмастерин	27.2
Селина-4(15),7(11)-диен	10.6	Лупенон	3.7
β -Ветивенен	1.0	β -Ситостерин	438.4
2-н-Бутиладамантан	1.4	β -Амирон	8.4
<i>транс</i> -неролидол	305.0	Стигмастанол	7.1
Эпиглобулол	12.3	Даммара-20,24-диен-3 β -ол	134.8
Дендролазин	2.3	β -Амирин	60.3
Палюстрол	1.2	α -Амирон	8.3
Спатуленол	112.2	Циклоартенол	2.4
Глобулол	15.1	Лупеол	16.6
Кариофилленоксид	1.2	α -Амирин	116.8
Сальвиаль-4(14)-ен-1-он	1.3	Стигма-3,5-диен-7-он	1.6
Изокариофиллен- β -оксид	1.1	Ланоста-8,24-диен-3-он	0.4
β -Элеменон	6.2	24-метиленикклоартанон	0.5
Гумулен-2,3-эпоксид	1.0	24-метиленикклоартанол	0.6
Розифолиол	10.6	Ферненол	1.5
Гумулен-6,7-эпоксид	3.5	Цитростадиенон	0.8
Z- α - <i>транс</i> -бергамотол	0.7	Эпи-пси-тараксастанол	0.6

Окончание таблицы 2

1	2	3	4
Арктиол	3.1	Моретенол	4.4
Муурола-4,10(14)-диен-1β-ол	1.4	Глютинол	82.0
Ди-эпи-1,10-кубенол	0.8	D:A-Фридоолеанан-3α-ол	12.0
7-Эпи-γ эвдесмол	3.0	Фриделин (Фриделан-3-он)	109.1
τ-Кадинол	0.8	Урсоловый альдегид	9.6
7-Гидрокси-6,7-дигидро-5,6Е-де-гидронеролидол	5.8	Эритродиоол	24.5
β-Эвдесмол	2.6	Бетулиновый альдегид	10.7
Поросадиенол	10.4	Уваол	30.8
α-Кадинол	3.2	Бетулин	22.0

Основные обнаруженные компоненты транс-неролидол, β-ситостерин и спатуленол, ранее обнаружены в растении. Часть идентифицированных компонентов ранее обнаружены в составе эфирных масле различных видов рододендрона [5–9].

Как следует из таблицы 3, основными компонентами являются жирные кислоты олеиновая, линолевая и линоленовая, а также пальмитиновая. Во фракции свободных кислот высокое содержание фенолокислот и тритепеновых соединений.

Следующим этапом работы стала оценка антивирусной активности. Для этого была использована модель рекомбинантной основной вирусной протеазы SARS-CoV-2. В работах по поиску ингибиторов ферментов важным этапом является сравнение тестируемых соединений с веществами, для которых подтверждено ингибирующее действие. В данном исследовании в качестве реперного соединения использовали известный ингибитор главной протеазы SARS-CoV-2 – дисульфiram [26]. Полученное нами значение IC₅₀ для данного соединения составило 0.002±0.0007 мг/мл, что согласуется с результатами других авторов [27]. Результаты анализа ингибирующей активности экстрактов в отношении основной протеазы вируса SARS-CoV-2 (табл. 4) показали, что активностью обладает суммарный экстракт *Rhododendron adamsii* Rehd., полученный при помощи МТБЭ, а также этанольный экстракт после исчерпывающей экстракции гексаном и МТБЭ, с близкими значениями IC₅₀, равными 0.03±0.001 мг/мл, активность также проявила сумма веществ неомыляемого остатка (0.05±0.003 мг/мл). Водный экстракт после исчерпывающей экстракции гексаном, МТБЭ и этанолом активности не проявил.

Основываясь на этих результатах, при дальнейшем изучении активности было решено сосредоточить внимание на нейтральных компонентах экстракта. Для этого была исследована активность фракций неомыляемого остатка экстракта, полученного при помощи МТБЭ, после хроматографического разделения на колонке с силикагелем, используя в качестве элюента гексан с повышающимся от 0 до 50% содержанием диэтилового эфира. Большинство полученных фракций не проявило детектируемую ингибирующую активность в отношении главной протеазы SARS-CoV-2. Активность на уровне 0.10±0.005 мг/мл была обнаружена для образцов фракций неомыляемого остатка под шифрами 7-33, 7-37, 7-50, 7-53, 7-54, а для образцов под шифрами 6-15, 7-55 и 7-35 – на уровне 0.05±0.005 мг/мл (табл. 4).

Анализ хроматограмм полученных фракций неомыляемого остатка показал большое разнообразие веществ. Однако детальное сравнение масс-спектров веществ из состава фракций, проявивших активность, показал наличие общего иона m/z 175, соответствующего фрагменту с брутто-формулой C₁₁H₁₁O₂. Ранее подобный ион наблюдали Рогачев с соавторами при анализе липофильных фракций *Rhododendron adamsii* Rehd. Источником этого осколка могут выступать фенольные соединения, в том числе пренилированные [19]. Подобные вещества могут быть потенциальными ингибиторами главной протеазы SARS-CoV-2, обладая вытянутой конформацией, способной, предположительно, имитировать фрагмент полипептидной цепочки. Ранее противовирусная активность была обнаружена для родственной по структуре пренилированным фенолам даурохромениковой кислоты в отношении ВИЧ-1 [28].

Таблица 3. Содержание свободных и связанных кислот в МТБЭ-экстракте *R. Adamsii* L., мг%

Компонент	Кислоты свободные	Кислоты связанные
1	2	3
Изовалериановая	60.4	
Каприловая	32.4	15.0
Гидрокоричная	195.8	9.8

Окончание таблицы 3

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Салициловая	100.8	
9-Оксононановая		31.2
3-Фенилмолочная	1712.4	
Анисовая	62.4	
4-Гидрокси-бензойная	121.2	
Нонандиовая	124.8	
9-Метилундекановая	43.0	
10-Метилундекановая		32.4
Лауриновая	30.2	39.0
Ванилиновая	171.5	
Вератровая	528.4	
11-Метилдодекановая	61.4	
12-Метилтридекановая	31.8	
Тридекановая		56.5
3,5,6-Триметилрезорциловая	54.0	
10-Оксо-8-деценная		24.3
7-Тетрадеценная		40.4
Миристиновая	29.2	34.9
4-(3-Метокси-3-оксо-1-пропенил-бензойная)	58.7	
5-Гидрокси-7-метокси-2-метилхромон	108.4	
Пентадекановая		23.1
Изопентадекановая		9.7
11,14-Эйкозодиеновая		13.0
Пальмитиновая	316.0	484.2
Изо-пальмитиновая		106.9
Пальмитолеиновая		28.6
Цис-10-гептадеценная		35.0
Маргариновая	66.4	49.2
Изогептадекановая		32.8
13-Октадеценная		22.0
16-Метилгептадекановая	90.7	
Олеиновая	373.7	781.3*
Линоленовая	507.6	
Линолевая	139.3	161.7
Стеариновая	108.4	273.6
Нонадеценная	47.4	33.8
Нонадекановая	75.6	324.6
Дигидростеркуловая	63.1	110.4
Стеркуловая		115.5
18-Метилнонадекановая		19.1
Арахидиновая	108.2	214.8
18-Метилэйкозановая		54.0
Генэйкозановая		25.4
Докозановая		11.6
Бегеновая	185.6	349.4
Трикозановая		15.8
Изотрикозановая		31.8
Тетракозановая		10.8
Лигноцеридовая	188.1	341.0
Пентакозановая		22.1
Изопентакозановая		30.2
Церотиновая	112.4	185.4
Монтановая	82.6	69.6
Мелиссовая	11.7	126.8
Олеанононовая	57.0	
Урсоловая	66.4	
Олеаноловая	167.3	
Урсоловая	1391.6	
Ацетилолеаноловая	48.0	
Ацетилурсоловая	57.3	

* пики не разделились.

Таблица 4. Значения IC50 анализируемых экстрактов и фракций неомыляемого остатка *Rh. adamsii* Rehd. в отношении основной протеазы вируса SARS-CoV-2

Экстракт/шифр фракции	IC50, мг/мл	Шифр фракции	IC50, мг/мл
МТБЭ, суммарный	0.03±0.001	7-42	>0.10
Этанольный после гексана и МТБЭ	0.03±0.001	7-43	>0.20
Водный после гексана, МТБЭ и спирта	>0.10	7-44	>0.10
Неомыляемый остаток	0.05±0.003	7-45	>0.10
6-15	0.05±0.003	7-46	>0.10
7-29	>0.10	7-47	>0.10
7-30	>0.10	7-48	>0.10
7-31	>0.10	7-49	>0.10
7-32	>0.10	7-50	0.10±0.005
7-33	0.10±0.005	7-51	>0.10
7-34	>0.10	7-52	>0.10
7-35	0.03±0.001	7-53	0.10±0.005
7-36	>0.10	7-54	0.10±0.005
7-37	0.10±0.005	7-55	0.05±0.003
7-38	>0.10	7-56	>0.10
7-39	>0.10	7-57	>0.10
7-40	>0.10	7-58	>0.10
7-41	>0.10	дисульфiram	0.002±0.0007

Выводы

1. Методом ГХ-МС исследован состав экстрактивных веществ *Rhododendron adamsii* Rehd. Идентифицировано более 150 соединений, часть из которых обнаружена в сырье впервые.

2. В составе нейтральных компонентов обнаружены алифатические и терпеновые соединения: углеводороды, кетоны, спирты, включая стеринны.

3. Повышение температуры анализа кислых компонентов позволило выявить алифатические компоненты с длиной цепи более 16 атомов углерода, а также тритерпеновые кислоты, включая урсоную, олеаноновую, ацетилурсоловую, ацетилолеаноловую, ранее не найденные в этом растении. Связанные и свободные компоненты различаются по качественному и по количественному составу.

4. Ингибирующую активность в отношении основной протеазы вируса SARS-CoV-2 проявили ряд фракций неомыляемого остатка *Rhododendron adamsii* Rehd. Наибольшая активность, с IC50 на уровне 0.05±0.005 мг/мл, наблюдалась для фракций 6-15, 7-55 и 7-35, содержащих предположительно фенольные соединения, в том числе пренилированные, или их производные.

Список литературы

1. Дикорастущие полезные растения флоры Монгольской Народной Республики. Л., 1985. 236 с.
2. Буданцев А.Л., Лесиовская Е.Е. Дикорастущие полезные растения России. СПб., 2001. 663 с.
3. Морозова Ю.А., Суботьялов М.А. Биологическая активность и компонентный состав некоторых видов рода *Rhododendron* флоры России // Растительные ресурсы. 2018. Т. 54. №3. С. 347–360.
4. Губич О.И., Пучкова К.В., Залеская Н.А., Крючкова Н.В. Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на экспериментальных моделях *in vivo* // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018. №1. С. 60–68.
5. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейство Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae / отв. ред. А.Л. Буданцев. СПб, М., 2009. 513 с.
6. Rogachev A.D., Fomenko V.V., Sal'nikova O.I., Pokrovskii L.M., Salakhutdinov N.F. Comparative analysis of essential oil compositions from leaves and stems of *Rhododendron adamsii*, *R. aureum*, and *R. dauricum* // Chemistry of Natural Compounds. 2006. Vol. 42. N4. Pp. 426–430. DOI: 10.1007/s10600-006-0172-9.
7. Белоусов М.В., Басова Е.В., Юсубов М.С., Березовская Т.П., Покровский Л.М., Ткачев А.В. Эфирные масла некоторых видов рода *Rhododendron* L. // Химия растительного сырья. 2000. №3. С. 45–64.
8. Белоусов М.В., Дембицкий А.Д., Березовская Т.П., Тихонов В.Н. Сравнительная характеристика эфирных масел видов рода *Rhododendron* L. подрода *Rhodorastrum* (Maxim.) Drude // Растительные ресурсы. 1995. Т. 31. №4. С. 41–44.
9. Минович В.М., Коненкина Т.А., Федосеева Г.М. Компонентный состав эфирного масла рододендронов Адамса и мелколистного, произрастающих в Восточной Сибири // Сибирский медицинский журнал. 2008. Т. 76. №1. С. 79–82.
10. Belova N.V. Andromedotoxin in rhododendrons // Chemistry of Natural Compounds. 1970. Vol. 6. Pp. 403–401. DOI: 10.1007/BF00567356.

11. Белова Н.В. Андромедотоксин и его получение из *Rhododendron* L. // Растительные ресурсы. 1971. Т. 7. №4. С. 574–576.
12. Рогачев А.Д., Морозов С.В., Вялков А.И., Фоменко В.В., Салахутдинов Н.Ф. Фитохимическое исследование рододендрона Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. Количественное содержание жирных кислот в листьях и стеблях // Химия в интересах устойчивого развития. 2007. Т. 15. №5. С. 575–579.
13. Fokina G.A. Triterpene acids of *Rhododendron* plants of the flora of the USSR // Chemistry of Natural Compounds. 1979. Vol. 15. N5. Pp. 651–652.
14. Рогачев А.Д., Комарова Н.И., Морозов С.В., Фоменко В.В., Салахутдинов Н.Ф. Фитохимическое изучение рододендрона Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. Количественное определение урсоловой и олеаноловой кислоты в некоторых представителях семейства Ericaceae // Химия в интересах устойчивого развития. 2007. Т. 15. №5. С. 571–574.
15. Fokina G.A., Belova N.V. Triterpenoids and steroids of some domestic species of *Rhododendron* // Chemistry of Natural Compounds. 1974. Vol. 10. N6. Pp. 827–828. DOI: 10.1007/BF00564024.
16. Минович В.М., Макаренко С.П., Паисова О.И. Изучение химического состава надземных органов рододендрона Адамса методом ВЭЖХ // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2005. Т. 45. №7. С. 164–166.
17. Komarova N.I., Rogachev A.D., Chernyak E.I., Morozov S.V., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems // Chemistry of Natural Compounds. 2009. Vol. 45. N1. Pp. 27–31. DOI: 10.1007/s10600-009-9215-3.
18. Razgonova M., Zakharenko A., Ercisli S., Grudev V., Golokhvast K. Comparative analysis of Far East Sikhotinsky rhododendron (*Rh. sichotense*) and East Siberian rhododendron (*Rh. adamsii*) using supercritical CO₂-extraction and HPLC-ESI-MS/MS spectrometry // Molecules. 2020. Vol. 25. 3774. DOI: 10.3390/molecules25173774.
19. Рогачев А.Д., Комарова Н.И., Корчагина Д.В., Долгих М.П., Сорокина И.В., Баев Д.С., Толстикова Т.Г., Фоменко В.В., Салахутдинов Н.Ф. Некоторые пренилированные фенолы рододендрона Адамса *Rhododendron adamsii*: выделение, модификация и фармакологические испытания // Химия в интересах устойчивого развития. 2009. Т. 17. №2. С. 191–198.
20. 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. N6. P. 863. DOI: 10.3390/antiox10060863.
21. Kukina T.P., Frolova T.S., Salnikova O.I. Neutral Constituents of *Chamaenerion angustifolium* Leaves // Chemistry of Natural Compounds. 2014. Vol. 50. N2. Pp. 233–236. DOI: 10.1007/s10600-014-0920-1.
22. Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gensh K.V., Tulysheva E.A., Salnikova O.I., Grazhdannikov A.E., Kolosova E.A. Bioactive components of sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L. foliage // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2017. Vol. 43. N7. Pp. 57–61. DOI: 10.1134/S1068162017070093.
23. Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gensh K.V., Panteleeva N.V., Tulysheva E.A., Salnikova O.I., Grazhdannikov A.E., Kolosov P.V., Galitsyn G.Yu. Bioactive Components in Methyl *tert*-Butyl Ether Extract of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Green Waste // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2020. Vol. 46. N7. Pp. 1372–1377. DOI: 10.1134/S1068162020070067.
24. Кукина Т.П., Щербаков Д.Н., Зыбкина А.В., Елшин И.А., Корсаков В.О., Сальникова О.И., Колосов П.В., Сандаг Ц., Каракай Д.А., Мордвинова Е.Д. Влияние экстрагента на состав липофильных компонентов экстрактов корневища *Rhodiola rosea* L. и активность экстрактов // Химия растительного сырья. 2021. №4. С. 307–317.
25. Shcherbakov D., Baev D., Kalinin M., Dalinger A., Chirkova V., Belenkaya S., Vatsadze S. Design and evaluation of bispidine-based SARS-CoV-2 main protease inhibitors // ACS medicinal chemistry letters. 2021. Vol. 13. N1. Pp. 140–147.
26. Jin Z., Du X., Xu Y., Deng Y., Liu M., Zhao Y., Zhang B., Li X., Zhang L., Peng C., Duan Y., Yu J., Wang L., Yang K., Liu F., Jiang R., Yang X., You T., Liu X., Yang X., Bai F., Liu H., Liu X., Guddat L.W., Xu W., Xiao G., Qin C., Shi Z., Jiang H., Rao Z., Yang H. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors // Nature. 2020. Vol. 582. N7811. Pp. 289–293.
27. Ma C., Hu Y., Townsend J.A., Lagarias P.I., Marty M.T., Kolocouris A., Wang J. Ebselen, Disulfiram, Carmofur, PX-12, Tideglusib, and Shikonin Are Nonspecific Promiscuous SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors // ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2020. Vol. 3. N6. Pp. 1265–1277.
28. Kashiwada Y., Yamazaki K., Ikeshiro Y., Yamagishi T., Fujioka T., Mihashi K., Lee K.H. Isolation of rhododaurichromanic acid B and the anti-HIV principles rhododaurichromanic acid A and rhododaurichromenic acid from *Rhododendron dauricum* // Tetrahedron. 2001. Vol. 57. N8. Pp. 1559–1563.

Поступила в редакцию 23 июня 2022 г.

После переработки 12 июля 2022 г.

Принята к публикации 22 августа 2022 г.

Для цитирования: Кукина Т.П., Елшин И.А., Сальникова О.И., Колосов П.В., Сандаг Ц., Каракай Д.А., Бондарева М.А., Нефедов А.А., Чиркова В.Ю., Шарлаева Е.А., Бельнская С.В., Щербаков Д.Н. Состав липофильных компонентов эфирного экстракта рододендрона Адамса и активность против основной протеазы SARS-COV-2 // Химия растительного сырья. 2022. №4. С. 153–162. DOI: 10.14258/jcrpm.20220411584.

Kukina T.P.^{1*}, Yelshin I.A.^{1,2}, Sal'nikova O.I.¹, Kolosov P.V.^{3,4}, Sandag Ts.⁵, Karakay D.A.¹, Bondareva M.A.¹, Nefedov A.A.¹, Chirkova V.Yu.⁴, Sharlayeva Ye.A.⁴, Belen'kaya S.V.^{2,6}, Shcherbakov D.N.^{4,6} COMPOSITION OF LIPOPHILIC COMPONENTS OF RHODODENDRON ADAMSAY ETHER EXTRACT AND ACTIVITY AGAINST SARS-COV-2 MAIN PROTEASE

¹ Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, N.N. Vorozhtsova, pr. Acad. Lavrentieva, 9, Novosibirsk, 630090 (Russia), e-mail: kukina@nioch.nsc.ru

² Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 1, Novosibirsk, 630090 (Russia)

³ VacBioLab LLC, st. Technoparkovaya, 1/26, r.p. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 (Russia)

⁴ Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia)

⁵ School of Biomedicine, Mongolian State University of Medical Sciences, ul. S. Zorig, 3, Ulaanbaatar 14210 (Mongolia)

⁶ FBUN SSC VB "Vector" of Rospotrebnadzor, r.p. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 (Russia)

The composition of the lipophilic components of the Adams rhododendron *Rhododendron adamsii* Rehd. Acid and neutral components were identified using gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection. Methyl tert-butyl ether (MTBE), which has all the advantages of diethyl ether, but is devoid of its disadvantages, was used as the raw material extractant. It does not form peroxides and does not create increased gas contamination due to its higher boiling point. As a result, comparison with databases identified triterpene, phenolcarboxylic and aliphatic acids with a chain length of 8 to 30 carbon atoms, including saturated, unsaturated and dibasic acids. More than 150 triterpene and aliphatic components of the unsaponifiable residue and acid fractions have been identified. Previously, unsaponifiable residues of lipophilic extracts were practically not studied. Only components of *Rh. adamsii* and other species of the genus rhododendron essential oils have been studied in detail. For bioactivity testing, samples of the whole extract and its fractionation products were prepared. Some of the studied samples show inhibitory activity against the main protease of SARS-CoV-2.

Keywords: *Rhododendron adamsii* Rehd. Adams rhododendron, extractive substances, methyl-tert-butyl ether, phenolic acids, unsaponifiable residue, 3CLpro, SARS-CoV-2.

References

1. *Dikorastushchiye poleznyye rasteniya flory Mongol'skoy Narodnoy Respubliki*. [Wild useful plants of the flora of the Mongolian People's Republic]. Leningrad, 1985, 236 p. (in Russ.).
2. Budantsev A.L., Lesiovskaya Ye.Ye. *Dikorastushchiye poleznyye rasteniya Rossii*. [Wild useful plants of Russia]. St. Petersburg, 2001, 663 p. (in Russ.).
3. Morozova Yu.A., Subotyalov M.A. *Rastitel'nyye resursy*, 2018, vol. 54, no. 3, pp. 347–360. (in Russ.).
4. Gubich O.I., Puchkova K.V., Zalesskaya N.A., Kryuchkova N.V. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*, 2018, no. 1, pp. 60–68. (in Russ.).
5. *Rastitel'nyye resursy Rossii: Dikorastushchiye tsvetkovyye rasteniya, ikh komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost'. T. 2. Semystvo Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae* [Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their composition and biological activity. Vol. 2. Family Actinidiaceae - Malvaceae, Euphorbiaceae - Haloragaceae], ed. A.L. Budantsev. St. Petersburg, Moscow, 2009, 513 p. (in Russ.).
6. Rogachev A.D., Fomenko V.V., Sal'nikova O.I., Pokrovskii L.M., Salakhutdinov N.F. *Chemistry of Natural Compounds*, 2006, vol. 42, no. 4, pp. 426–430. DOI: 10.1007/s10600-006-0172-9.
7. Belousov M.V., Basova Ye.V., Yusubov M.S., Berezovskaya T.P., Pokrovskiy L.M., Tkachev A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2000, no. 3, pp. 45–64. (in Russ.).
8. Belousov M.V., Dembitskiy A.D., Berezovskaya T.P., Tikhonov V.N. *Rastitel'nyye resursy*, 1995, vol. 31, no. 4, pp. 41–44. (in Russ.).
9. Mirovich V.M., Konenkina T.A., Fedoseyeva G.M. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, 2008, vol. 76, no. 1, pp. 79–82. (in Russ.).
10. Belova N.V. *Chemistry of Natural Compounds*, 1970, vol. 6, pp. 403–401. DOI: 10.1007/BF00567356.
11. Belova N.V. *Rastitel'nyye resursy*, 1971, vol. 7, no. 4, pp. 574–576. (in Russ.).
12. Rogachev A.D., Morozov S.V., Vyalkov A.I., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2007, vol. 15, no. 5, pp. 575–579. (in Russ.).
13. Fokina G.A. *Chemistry of Natural Compounds*, 1979, vol. 15, no. 5, pp. 651–652.
14. Rogachev A.D., Komarova N.I., Morozov S.V., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2007, vol. 15, no. 5, pp. 571–574. (in Russ.).
15. Fokina G.A., Belova N.V. *Chemistry of Natural Compounds*, 1974, vol. 10, no. 6, pp. 827–828. DOI: 10.1007/BF00564024.
16. Mirovich V.M., Makarenko S.P., Paisova O.I. *Byulleten' VSNTS SO RAMN*, 2005, vol. 45, no. 7, pp. 164–166. (in Russ.).
17. Komarova N.I., Rogachev A.D., Chernyak E.I., Morozov S.V., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F. *Chemistry of Natural Compounds*, 2009, vol. 45, no. 1, pp. 27–31. DOI: 10.1007/s10600-009-9215-3.
18. Razgonova M., Zakharenko A., Ercisli S., Grudev V., Golokhvast K. *Molecules*, 2020, vol. 25, 3774. DOI: 10.3390/molecules25173774.
19. Rogachev A.D., Komarova N.I., Korchagina D.V., Dolgikh M.P., Sorokina I.V., Bayev D.S., Tolstikova T.G., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2009, vol. 17, no. 2, pp. 191–198. (in Russ.).

* Corresponding author.

20. Olennikov D.N., Nikolaev V.M., Chirikova N.K. *Antioxidants*, 2021, vol. 10, no. 6, p. 863. DOI: 10.3390/antiox10060863.
21. Kukina T.P., Frolova T.S., Salnikova O.I. *Chemistry of Natural Compounds*, 2014, vol. 50, no. 2, pp. 233–236. DOI: 10.1007/s10600-014-0920-1.
22. Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gensh K.V., Tulysheva E.A., Salnikova O.I., Grazhdannikov A.E., Kolosova E.A. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2017, vol. 43, no. 7, pp. 57–61. DOI: 10.1134/S1068162017070093.
23. Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gensh K.V., Panteleeva N.V., Tulysheva E.A., Salnikova O.I., Grazhdannikov A.E., Kolosov P.V., Galitsyn G.Yu. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2020, vol. 46, no. 7, pp. 1372–1377. DOI: 10.1134/S1068162020070067.
24. Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Zybina A.V., Yelshin I.A., Korsakov V.O., Sal'nikova O.I., Kolosov P.V., Sandag Ts., Karakay D.A., Mordvinova Ye.D. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, no. 4, pp. 307–317. (in Russ.).
25. Shcherbakov D., Baev D., Kalinin M., Dalinger A., Chirkova V., Belenkaya S., Vatsadze S. *ACS medicinal chemistry letters*, 2021, vol. 13, no. 1, pp. 140–147.
26. Jin Z., Du X., Xu Y., Deng Y., Liu M., Zhao Y., Zhang B., Li X., Zhang L., Peng C., Duan Y., Yu J., Wang L., Yang K., Liu F., Jiang R., Yang X., You T., Liu X., Yang X., Bai F., Liu H., Liu X., Guddat L.W., Xu W., Xiao G., Qin C., Shi Z., Jiang H., Rao Z., Yang H. *Nature*, 2020, vol. 582, no. 7811, pp. 289–293.
27. Ma C., Hu Y., Townsend J.A., Lagarias P.I., Marty M.T., Kolocouris A., Wang J. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 2020, vol. 3, no. 6, pp. 1265–1277.
28. Kashiwada Y., Yamazaki K., Ikeshiro Y., Yamagishi T., Fujioka T., Mihashi K., Lee K.H. *Tetrahedron*, 2001, vol. 57, no. 8, pp. 1559–1563.

Received June 23, 2022

Revised July 12, 2022

Accepted August 22, 2022

For citing: Kukina T.P., Yelshin I.A., Sal'nikova O.I., Kolosov P.V., Sandag Ts., Karakay D.A., Bondareva M.A., Nefedov A.A., Chirkova V.Yu., Sharlayeva Ye.A., Belen'kaya S.V., Shcherbakov D.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 4, pp. 153–162. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20220411584.