

УДК 582.734.2:547.814.5

АЦИЛИРОВАННЫЕ ФЛАВОНОИДЫ РОДА *SPIRAEA* КАК ИНГИБИТОРЫ α -АМИЛАЗЫ

© Н.И. Кащенко¹, Н.К. Чирикова², Д.Н. Оленников^{1*}

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,
ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047 (Россия), e-mail: olennikovdn@mail.ru

² Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова,
ул. Белинского, 58, Якутск, 677000 (Россия)

Spiraea L. представляет собой род листопадных кустарников семейства Rosaceae, широко распространенный на территории Восточной Сибири. В результате исследования шести видов *Spiraea*, произрастающих в Прибайкалье, было показано, что они характеризовались высоким содержанием фенольных соединений, а экстракты обладали ингибиторным действием на α -амилазу. Применение корреляционного анализа позволило выявить лидирующую роль флавоноидов, как носителей биологического эффекта экстрактов. Наибольшей активностью обладал экстракт листьев *S. salicifolia* с величиной IC_{50} 69,30 мкг/мл. После фракционирования и хроматографического разделения экстрактивных веществ из этилацетатной фракции *S. salicifolia* было выделено 18 соединений, в том числе 15 – впервые для вида, включая трифоллин, 6''-*O*-кофеил-гиперозид, 6''-*O*-кофеил-изокверцитрин, 6''-*O*-кофеил-астрагалин, 1-*O*-*n*-гидроксибензоил-6-*O*-*n*-кумароил- β -D-глюкопиранозу, 3,4,5-три-*O*-кофеилхинную кислоту, изорамнетин-3-*O*- β -D-глюкопиранозид, тилирозид, изорамнетин-3-*O*- α -L-рамнопиранозид, 1-*O*-*цис*-циннамоил-6-*O*-(2'-метилен-4'-гидроксибутироил)- β -D-глюкопиранозу, 1-*O*-(4''-гидрокси-3''-метилфуран-2''-он)-6-*O*-*транс*-циннамоил- β -D-глюкопиранозу, 1-*O*-(4''-гидрокси-3''-метилфуран-2''-он)-6-*O*-*цис*-циннамоил- β -D-глюкопиранозу, 6-тюлопозид А и тюлопалин А. Наиболее активными ингибиторами α -амилазы были флавоноидные кофеилгликозиды, причем 6''-*O*-кофеил-гиперозид с максимальным показателем IC_{50} 46,18 мкг/мл, определял общий анти- α -амилазный эффект извлечений *S. salicifolia*. Суммарное содержание 6''-*O*-кофеил-гиперозида в листьях *S. salicifolia* составило 0,60–10,53 мг/г, флавоноидов – 12,02–23,17 мг/г. Проведенные исследования показали, что ацилированные флавоноиды *Spiraea* являются эффективными ингибиторами α -амилазы.

Ключевые слова: *Spiraea*, Rosaceae, *Spiraea salicifolia*, флавоноиды, 6''-*O*-кофеил-гиперозид, ВЭЖХ, ингибирование α -амилазы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Бурятия в рамках научного проекта № 16-43-030857 и проекта ФАНО России № 0337-2016-0006.

Введение

Сахарный диабет (СД) – известное метаболическое заболевание, характеризующееся аномальным постпрандиальным (возникающим после еды) повышением уровня глюкозы в крови [1]. По оценкам ВОЗ, в 2014 г. СД в мире страдали 422 млн человек, и распространенность этой болезни растет. В 2012 г. это заболевание стало непосредственной причиной около 1,5 млн случаев смерти, а к 2030 г. СД станет седьмой ведущей причиной смерти [2]. В этой связи контроль постпрандиальной гипергликемии является важным звеном терапии СД [3].

Кащенко Нина Игоревна – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, e-mail: ninkk@mail.ru
Чирикова Надежда Константиновна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биохимии и биотехнологии, e-mail: hofnung@mail.ru
Оленников Даниил Николаевич – доктор фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, e-mail: olennikovdn@mail.ru

α -Амилаза слюнных и поджелудочной желез является важным ферментом, участвующими в деградации углеводов. Ингибиторы α -амилазы способствуют снижению процесса расщепления и абсорбции углеводов в кишечнике, в связи с чем с середины 1980-х гг. данные соединения стали рассматриваться в качестве нового класса антидиабетических лекарственных средств [4].

* Автор, с которым следует вести переписку.

В ходе медикаментозного лечения СД применяют различные химические агенты синтетического или природного происхождения. Коммерчески доступными препаратами являются углевод-содержащие акарбоза и воглибоза, получаемыми из природных источников и снижающих постпрандиальный уровень глюкозы в крови [5]. Процесс получения препаратов долгий и многоэтапный, что приводит к высокой стоимости целевых продуктов. Более того, клинически показано, что длительное применение данных соединений приводит к комплексу серьезных желудочно-кишечных расстройств. В этой связи необходимым является поиск альтернативных соединений, обладающих высокой эффективностью в терапии СД без побочных эффектов.

В последнее время, исследовательским проектам, направленным на поиск потенциальных неуглеводных ингибиторов α -амилазы из природных источников, уделяется особое внимание. К настоящему времени накоплен определенный объем научной информации об ингибиторах α -амилазы. Анализируя сведения обзорных работ по данному направлению, можно отметить, что интерес вызывают соединения фенольной природы, применение которых связано с их способностью снижать постпрандиальный уровень глюкозы в крови [6].

Ранее было показано, что некоторые виды семейства Rosaceae обладают антиамилазной активностью. В частности, эффективность ингибирования α -амилазы (IC_{50}) для растительных экстрактов в условиях *in vitro* может быть и высокой и составлять 4,5–140 мкг/мл для *Rosa gallica* L. [7], для *Sorbus aucuparia* L. [8] и *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach [9]. Исследование отечественных видов *Filipendula* и *Comarum* показало, что они также обладают выраженным ингибиторным действием на пищеварительные ферменты [10, 11]. Продолжая поиски растительных анти- α -амилазных компонентов в семействе Rosaceae, мы осуществили изучение химического состава и биологической активности видов рода *Spiraea*, произрастающих в Восточной Сибири.

Экспериментальная часть

Растительное сырье. Образцы видов *Spiraea* были собраны в различных районах республики Бурятия и Иркутской области в 2014–2016 гг. (табл. 1). Видовая принадлежность определена докт. фарм. наук Т.А. Асеевой (ИОЭБ СО РАН). Сырье высушивали в конвекционной печи (50 °С) до значений влажности $\leq 5\%$.

Общие экспериментальные условия. Для колоночной хроматографии (КХ) применяли полиамид, Сефадекс LH-20 и силикагель (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Преп. ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Summit (Dionex, Sunnyvale, CA, USA); колонка LiChrospher PR-18 (250×10 мм, Ø 10 мкм; Supelco, Bellefonte, PA, USA); v 1 мл/мин; температура колонки 35 °С. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Санкт-Петербург, Россия); МС-анализ – на ТQ-масс-спектрометре LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA). Спектры ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (Varian, Palo Alto, CA, USA). Экстракты из листьев и цветков шести видов *Spiraea* получали с использованием 60% этанола как описано ранее [11]. Количественное содержание флавоноидов в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом в присутствии хлорида алюминия (вещество сравнения – гиперозид) [12], катехинов – спектрофотометрическим ванилин-серноокислотным методом (вещество сравнения – (+)-катехин) [13], процианидинов – спектрофотометрическим методом по Porter (вещество сравнения – процианидин В1) [13], фенилпропаноидов – спектрофотометрическим методом по Agnow (вещество сравнения – 3-О-кофеилхинная кислота) [14]. Ингибиторную активность экстрактов, фракций и соединений в отношении α -амилазы определяли спектрофотометрическим микропланшетным методом [15].

Экстракция и фракционирование *S. salicifolia*. Измельченное растительное сырье (образец Sa01; 5 кг) экстрагировали 60% EtOH (1 : 15) в УЗ-ванне (100 Вт, частота 35 кГц) при 40 °С в течение 2 ч дважды. Спиртовое извлечение отфильтровывали, концентрировали до водного остатка, который подвергали жидкофазной экстракции гексаном (фракция S-1; 55 г), дихлорэтаном (S-2; 15 г), этилацетатом (S-3; 175 г), ацетоном (S-4; 185 г), 90% этанолом (S-5; 960 г), 50% этанолом (S-6; 1010 г) и водой (70 г). Водную фракцию растворяли в воде (1 : 5) и к полученному раствору приливали 90% этанол (1 : 4). Супернатант и выпавший осадок водорастворимых полисахаридов (ВРПС) разделяли центрифугированием и высушивали, что привело к получению фракций S-7 (45 г) и S-8 (25 г), соответственно. Фракцию S-3 (140 г) наносили на полиамид (1,5 кг), преколондированный водой и элюировали последовательной водой, 50% этанолом и раствором 0,25% NH₃ в 90% этаноле, в результате чего были получены фракции S-3/1 (32 г), S-3/2 (86 г) и S-3/3 (14 г). Фракцию S-3/1 (30 г) хроматографировали на силикагеле (КХ, 4×50 см), элюируя системой растворителей гексан–EtOAc

(100 : 0 → 70 : 30) и далее на Сефадекс LH-20 (КХ, 2×80 см, элюент этанол–H₂O 90 : 10 → 0 : 100) и преп. ВЭЖХ [подвижная фаза H₂O (А), MeCN (В); градиентный режим (% В): 0–60 мин 5–14%, 60–70 мин 14–50%, 70–90 мин 50–58%; v 1 мл/мин; температура колонки 30 °С; УФ-детектор, λ 260 нм]. В результате были выделены **13** (52 мг), **14** (25 мг), **15** (29 мг), смесь **16/17** (36 мг) и **18** (12 мг). Фракцию S-3/2 (80 г) разделяли на силикагеле (КХ, 4×60 см, элюент гексан–EtOAc 100 : 0 → 70 : 30) и далее на Сефадексе LH-20 (КХ, 2×80 см, элюент этанол–H₂O 90 : 10 → 0 : 100), что привело к получению **2** (25 мг), **3** (30 мг), **4** (32 мг), **5** (161 мг), **6** (24 мг), **10** (31 мг) и **12** (11 мг). Для хроматографирования фракции S-3/3 (12 г) применяли Сефадекс LH-20 (КХ, 2×80 см, элюент этанол–H₂O 90 : 10 → 0 : 100), что позволило выделить **1** (92 мг), **7** (14 мг), **8** (37 мг), **9** (22 мг) и **11** (28 мг). Для идентификации выделенных соединений использовали данные УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии в сравнении с таковыми литературы.

Таблица 1. Описание растительного сырья рода *Spiraea*, использованного в работе

Место сбора, координаты*	Дата сбора
Подрод Protospiraea	
<i>S. salicifolia</i> L.:	
Sa01 – ИО, Слюдянский район, пос. Култук, 51°44'1" N, 103°38'18" E	20.VII.2016
Sa02 – РБ, Кабанский район, пос. Селенгинск, 51°44'1" N, 103°38'18" E	22.VII.2016
Sa03 – РБ, Прибайкальский район, пос. Татаурово, 52°7'3" N, 107°19'54" E	6.VII.2016
Sa04 – РБ, Прибайкальский район, пос. Горячинск, 52°59'9" N, 107°18'34" E	22.VII.2015
Sa05 – РБ, Баргузинский район, полуостров Святой Нос, 53°24'58" N, 109°2'2" E	15.VII.2015
Sa06 – РБ, Курумканский район, пос. Курумкан, 54°19'36" N, 110°19'32" E	16.VII.2015
Sa07 – РБ, Кижингинский район, пос. Хуртэй, 51°34'28" N, 110°30'24" E	12.VII.2014
Sa08 – коммерческий образец, ООО Оргилия (г. Иркутск)	2014
Подрод Metaspiraea	
<i>S. alpina</i> Pall. – РБ, Тункинский район, Нилова Пустынь, 51°51'15" N, 101°43'3" E	21.VII.2016
<i>S. aquilegifolia</i> Pall. (син. <i>S. hypericifolia</i> L.) – РБ, Мухоршибирский район, Меркитская крепость, 51°9'6" N, 107°6'30" E	19.VI.2016
<i>S. dahurica</i> (Rupr.) Maxim. – РБ, Баунтовский район, пос. Маловский, 54°23'34" N, 113°33'15" E	20.VII.2014
<i>S. flexuosa</i> Fisch. ex Cambess. (син. <i>S. chamaedryfolia</i> L.) – РБ, Кабанский район, с. Боярск, 51°50'57" N, 106°4'12" E	12.VI.2015
<i>S. media</i> Schmidt – РБ, Кабанский район, Сухой Ручей, 51°48'33" N, 106°1'22" E	18.VI.2015

* ИО – Иркутская область, РБ – республика Бурятия.

ВЭЖХ-ДМД-ИЭР/МС. Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA), соединенном с диодно-матричным детектором (ДМД) и 3Q детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС; electrospray ionization, ESI), используя колонку GLC Mastro C18 (150×2,1 мм, Ø 3 мкм; Shimadzu, Kyoto, Japan). Условия ВЭЖХ: подвижная фаза, элюент А – вода, элюент В – ацетонитрил; программа градиента – 0–5 мин 5–11% В, 5–15 мин 11–18% В, 15–30 мин 18–52% В; инжектируемый объем – 1 мкл; скорость потока – 200 мкл/мин, температура колонки – 30 °С; диапазон сканирования спектров поглощения – 200–600 нм. Условия ИЭР/МС: режим ионизации – электрораспыление; температура ионтерфейса ИЭР – 300 °С; температура линии десольватации – 250 °С; температура нагревательного блока – 400 °С; скорость газа-распылителя (N₂) – 3 л/мин; скорость газа-нагревателя (воздух) – 10 л/мин; давление газа, используемого для диссоциации, индуцируемой соударением (CID gas, Ar) – 270 кПа; скорость Ar – 0,3 мл/мин; напряжение на капилляре – 3 кВ; диапазон сканирования масс (m/z) 100–1900.

Микроколоночная ВЭЖХ-УФ. Количественный анализ соединений в листьях *S. salicifolia* выполняли с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа Милюхром А-02 (Эконова, Новосибирск, Россия) на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2 × 75 мм, Ø 5 мкм; Metrohm AG, Herisau, Switzerland); подвижная фаза: 0,2 М LiClO₄ в 0,006 М HClO₄ (А), MeCN (В). Условия градиента (% В): 0–15 мин 5–76; v 150 мкл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор, λ 330 нм. Расчет содержания проводили, используя вещества сравнения – 3-О-кофеилхинная кислота (Sigma-Aldrich), изорамнетин-3-О-β-D-глюкопиранозид и тилрозид (Extrasynthese, Lyone, France), а также внешние образцы веществ сравнения – гиперозид, изокверцитрин, астрагалин и изорамнетин-3-О-β-D-глюкопиранозид (Extrasynthese) для 6"-О-кофеил-гиперозида, 6"-О-кофеил-изокверцитрина, 6"-О-кофеил-астрагалина и изорамнетин-3-О-α-L-рамнопиранозид с учетом разницы в молекулярных массах соединений. Результаты представлены в виде среднего значения из трех параллельных определений (± стандартное отклонение, SD). Для получения извлечения 40 мг сырья переносили в пробирку Эппендорфа (2 мл), приливали 1 мл 60% этанола и подвергали ультразвуковой обработке (50 кГц,

30 мин, 40 °С), после чего центрифугировали (6000 g, 20 мин). Полученное извлечение фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и использовали для анализа (1 мкл).

Регрессионный анализ (линейная регрессия) осуществляли с использованием пакета программа Statistica 10 (StatSoft). *Статистический анализ* проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимость различий средних определяли с помощью многогранового теста Дункана. Отличия при $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Результаты представлены в виде средних значений \pm SD (стандартное отклонение).

Обсуждение результатов

Фенольные соединения экстрактов шести видов Spiraea и их влияние на амилазу. Экстракты из листьев и цветков шести видов *Spiraea*, полученные с применением 60% этанола, были изучены для определения группового состава фенольных соединений в них. В результате было установлено количественное содержание флавоноидов, катехинов, процианидинов и фенилпропаноидов. Галловая и эллаговая кислоты не были выявлены в свободном или связанном состоянии ни в одном из изученных экстрактов, что указывало на отсутствие галло- и эллаготанинов, поэтому их концентрации не определялись.

Проведенные исследования показали, что содержание изучаемых групп фенольных соединений варьировало в широких пределах (табл. 2). Концентрация флавоноидов в экстрактах составила от 53,02 мг/г (цветки *S. flexuosa*) до 120,07 мг/г (листья *S. salicifolia*), катехинов – от 16,65 мг/г (листья *S. flexuosa*) до 142,02 мг/г (цветки *S. salicifolia*), процианидинов – от 4,47 мг/г (листья *S. flexuosa*) до 141,33 мг/г (цветки *S. salicifolia*), фенилпропаноидов – от 84,28 мг/г (листья *S. flexuosa*) до 348,20 мг/г (листья *S. salicifolia*).

Распределение групп фенольных соединений между листьями и цветками носило случайный характер, что отражалось на химическом профиле производных экстрактов. Концентрация флавоноидов была максимальной в экстрактах листьев *S. flexuosa*, *S. media*, *S. dahurica* и *S. aquilegifolia*, а для *S. salicifolia* и *S. alpina* – напротив, в экстрактах цветков. Высокие показатели содержания катехинов отмечены в экстрактах цветков всех видов, кроме *S. media* и *S. dahurica*, в то время как экстракт листьев *S. media* отличался большим содержанием процианидинов, чем экстракт цветков. Сравнительный анализ уровня фенилпропаноидов показал, что, как правило, экстракты цветков содержали больше данных соединений, за исключением *S. aquilegifolia*, *S. media* и *S. salicifolia*. В целом следует отметить, что экстракционные формы из шести изученных видов *Spiraea* характеризовались высокими показателями содержания фенольных соединений, что указывало на перспективность изучения их биологической активности.

Таблица 2. Содержание групп фенольных соединений в экстрактах *Spiraea* и их анти- α -амилазная активность

Вид	Часть растения ^a	Фенольные соединения ^b , мг/г ^b \pm SD ^c				Ингибирование α -амилазы, % ^d		IC ₅₀ ^e \pm SD ^{ж,з} , мкг/мл
		I	II	III	IV	5,0 мкг/мл	50,0 мкг/мл	
<i>S. alpina</i>	Л	78,26 \pm 1,56	51,15 \pm 1,02	40,25 \pm 0,80	257,34 \pm 5,14	19,71	22,67	103,63 \pm 3,10 ^н
	Ц	99,25 \pm 1,98	120,22 \pm 2,76	78,46 \pm 1,64	283,80 \pm 5,10	13,72	36,88	97,19 \pm 3,01 ^н
<i>S. aquilegifolia</i>	Л	97,55 \pm 1,95	44,45 \pm 0,89	58,82 \pm 1,29	285,18 \pm 6,84	21,08	26,57	241,67 \pm 8,21 ^н
	Ц	84,14 \pm 1,67	52,11 \pm 1,19	61,14 \pm 1,22	178,10 \pm 4,27	12,35	25,19	204,25 \pm 5,31 ^н
<i>S. dahurica</i>	Л	72,23 \pm 1,51	79,00 \pm 1,65	93,81 \pm 1,87	231,64 \pm 6,02	23,65	33,41	226,17 \pm 5,42 ^н
	Ц	68,56 \pm 1,37	72,74 \pm 1,52	102,79 \pm 2,05	247,05 \pm 5,18	22,20	31,05	212,10 \pm 5,51 ^н
<i>S. flexuosa</i>	Л	96,54 \pm 1,93	16,65 \pm 0,38	4,47 \pm 0,10	84,28 \pm 2,19	3,70	23,43	109,36 \pm 2,84 ^н
	Ц	53,02 \pm 1,06	19,74 \pm 0,39	19,42 \pm 0,38	145,96 \pm 3,35	6,61	20,85	247,66 \pm 6,93 ^н
<i>S. media</i>	Л	89,17 \pm 1,78	62,05 \pm 1,24	84,29 \pm 1,93	259,12 \pm 6,21	12,72	26,46	117,98 \pm 2,94 ^н
	Ц	75,43 \pm 1,51	25,39 \pm 0,50	41,93 \pm 0,83	131,54 \pm 3,28	13,23	23,35	152,49 \pm 3,96 ^н
<i>S. salicifolia</i> ^к	Л	120,07 \pm 2,52	74,42 \pm 1,41	59,79 \pm 1,19	348,20 \pm 9,05	18,16	39,95	69,30 \pm 1,80 ^н
	Ц	86,62 \pm 1,73	142,02 \pm 2,98	141,33 \pm 2,82	279,57 \pm 6,43	20,08	22,31	114,30 \pm 2,97 ^н

^a Часть растения: Л – листья, Ц – цветки. ^b Фенольные соединения: I – флавоноиды, II – катехины, III – процианидины, IV – фенилпропаноиды. ^c От массы воздушно-сухого сырья. ^d Среднее из пяти определений. ^e В сравнении с контрольной группой (0,9% NaCl). ^ж 50% ингибирование активности амилазы. ^з Среднее из трех определений. ^н Вещество сравнения – кверцетин (IC₅₀ 76,11 \pm 1,52 мкг/мл). ^о Разница статистически достоверна по сравнению с показателями группы вещества сравнения ($p < 0,05$). ^к Образец Sa01.

Исследование ингибиторной активности экстрактов *Spiraea* в отношении пищеварительных ферментов показали, что степень инактивации α -амилазы была максимальной в дозе 50 мкг/мл для экстракта листьев *S. salicifolia* (39,95%; IC_{50} 69,30 мкг/мл) и экстракта цветков *S. alpina* (36,88% в сравнении с контролем; IC_{50} 97,19 мкг/мл) и экстракта (табл. 2). Корреляционный анализ зависимостей «химический состав – биологическая активность» показал, что наибольшее влияние на анти- α -амилазную активность оказывало присутствие в экстрактах флавоноидов ($r = 0,6494$), а наименьшее – процианидинов ($r = 0,0100$) (рис. 1).

Ранее было установлено, что катехины, процианидины и фенилпропаноиды обладают слабым ингибиторным действием на α -амилазу [3, 6], в отличие от флавоноидов и их производных, оказывающих выраженное влияние на данный пищеварительный фермент [4]. Дальнейшие исследования были направлены на исследование химического профиля и биологической активности экстракта листьев *S. salicifolia*, оказавшего наибольшее ингибиторное влияние на α -амилазу.

Фенольные соединения листьев *S. salicifolia* и их биологическая активность. Разделение экстрактивных веществ листьев *S. salicifolia* были использованы с различными растворителями, в результате чего было получено восемь фракций. Наибольшее ингибиторное влияние на активность α -амилазы оказывала фракция, выделенная с использованием этилацетата (фракция S-3; IC_{50} 53,41 мкг/мл) (табл. 3).

Хроматографическое разделение фракции S-3 с использованием колоночной хроматографии на полиамиде, силикагеле, Сефадексе LH-20 и препаративной ВЭЖХ на обращено-фазовом силикагеле привело к получению 18 соединений, идентифицированных на основании данных УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии как 3-*O*-кофеилхинная кислота (**1**) [16], гиперозид (**2**), трифолин (**3**), изокверцитрин (**4**) [17], 6''-*O*-кофеил-гиперозид (**5**), 6''-*O*-кофеил-изокверцитрин (**6**), 6''-*O*-кофеил-астрагалин (**7**) [18], 1-*O*-*n*-гидроксibenзоил-6-*O*-*n*-кумароил- β -D-глюкопиранозид (**8**) [19], 3,4,5-три-*O*-кофеилхинная кислота (**9**) [16], изорамнетин-3-*O*- β -D-глюкопиранозид (**10**), тилирозид (**11**), изорамнетин-3-*O*- α -L-рамнопиранозид (**12**) [17], 1-*O*-*цис*-циннамоил-6-*O*-(2'-метилен-4'-гидрокси-бутироил)- β -D-глюкопираноза (**13**), 1-*O*-(4''-гидрокси-3''-метилфуран-2''-он)-6-*O*-*транс*-циннамоил- β -D-глюкопираноза (**14**), 1-*O*-(4''-гидрокси-3''-метилфуран-2''-он)-6-*O*-*цис*-циннамоил- β -D-глюкопираноза (**15**) [20], 6-тилопозид А [6-*O*-(2'-метилен-4'-гидрокси-бутироил)- α / β -D-глюкопираноза; **16/17**] и тиопалин А (α -метилен- γ -бутиролактон; **18**) [21] (рис. 2). Ранее в *S. salicifolia* были обнаружены **1**, **2** и **4** [22, 23]; присутствие **3**, **5–18** установлено в данном виде впервые.

Хроматографическое исследование фракции S-3 методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР/МС показало, что ее доминирующими соединениями были 6''-*O*-кофеил-гиперозид (**5**), а также кофеил-гликозиды **6** и **7**, отличающиеся характерным масс-спектрометрическим профилем и легко детектирующиеся в режиме мониторинга выделенных ионов (SIM) (рис. 3). На долю остальных компонентов (**1–4**, **8–18**) приходилось не более 20% от массы фракции.

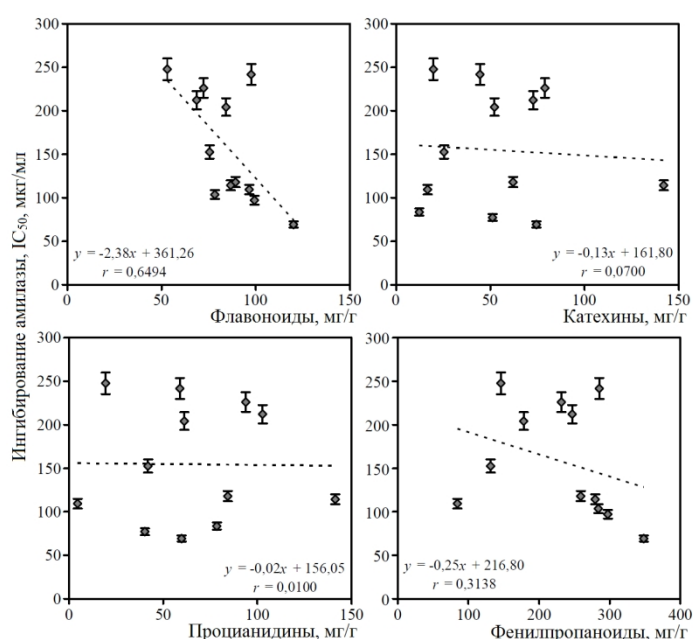


Рис. 1. Корреляционные зависимости между содержанием фенольных соединений в экстрактах *Spiraea* (мг/г) и анти- α -амилазной активностью (IC_{50} , мкг/мл). Приведены уравнения линейных зависимостей « y - x », где x – содержание фенольных соединений, y – IC_{50} , мкг/мл, а также коэффициент корреляции (r)

Таблица 3. Выход и анти- α -амилазная активность фракций из *S. salicifolia*

Фракция ^а	Выход, % ^б	IC ₅₀ ± SD ^{в,г} , мкг/мл
S-1 (гексан)	1,1	>100
S-2 (дихлорэтан)	0,3	>100
S-3 (этилацетат)	3,5	53,41 ± 1,62 ^д
S-4 (ацетон)	3,7	78,94 ± 2,37 ^д
S-5 (90% этанол)	19,2	~ 100
S-6 (50% этанол)	20,2	>100
S-7 (вода)	0,9	>100
S-8 (ВРПС)	0,5	>100

^а Номер фракции (растворитель); ^б От массы воздушно-сухого сырья; ^в Среднее из трех определений. ^г Вещество сравнения – акарбоза (IC₅₀ 154,35 ± 3,08 мкг/мл). ^д Разница статистически достоверна по сравнению с показателями группы вещества сравнения (p < 0,05).

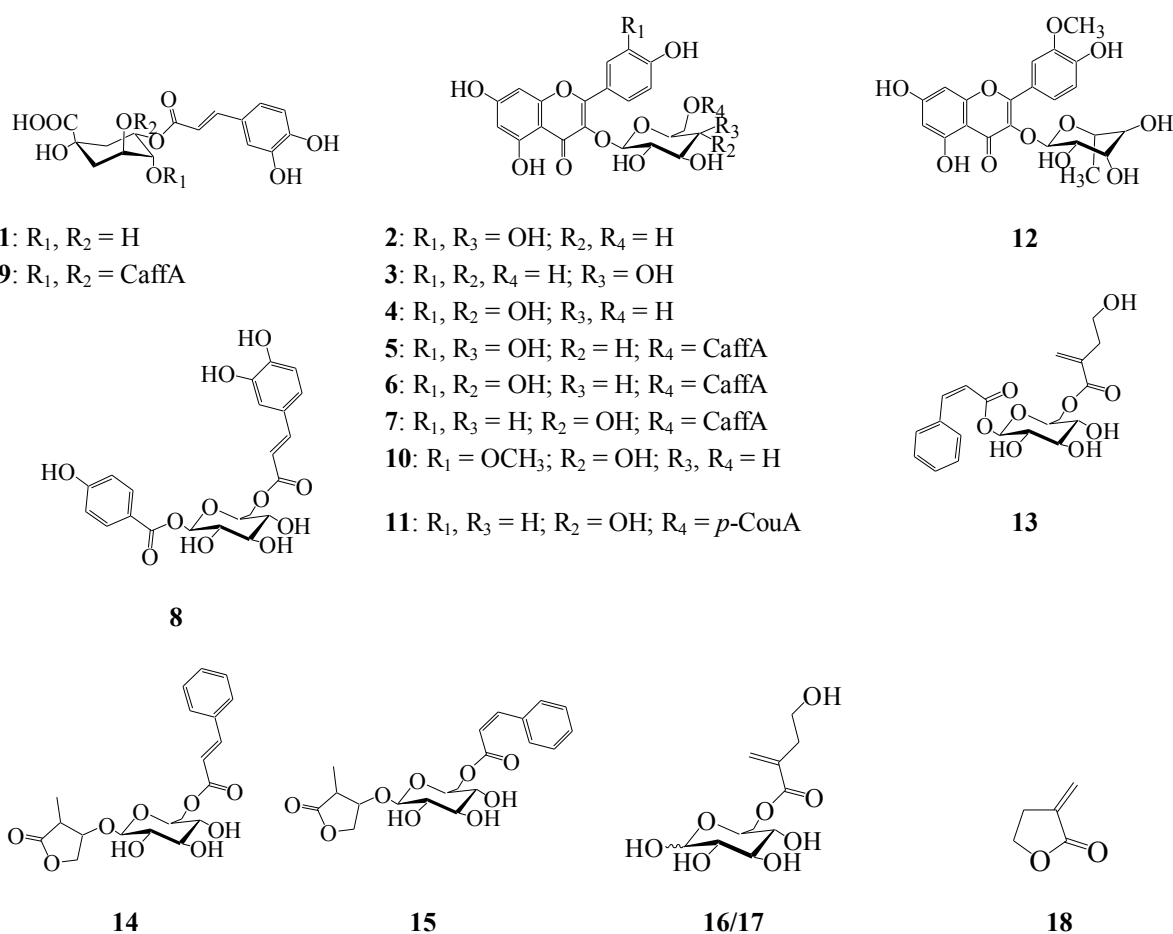


Рис. 2. Структуры соединений, выделенных из фракции S-3. Сокращения: CaffA – кофеил, *p*-CouA – *p*-кумароил

Для определения роли отдельных соединений в проявлении биологической активности фракции S-3 была изучена анти- α -амилазная активность соединений **1–18** и показано, что для фенолпропаноидов **1** и **9**, флавоноидов **3**, **10–12**, циннамоил гликозидов **8**, **13–15**, 6-тилопозид А (**16/17**) и тюлипалина А (**18**) показатели IC₅₀ не превышали 200 мкг/мл. Наиболее эффективными ингибиторами оказались флавоноидные кофеил-гликозиды **5** (IC₅₀ 46,18 мкг/мл) и **6** (IC₅₀ 51,06 мкг/мл) (табл. 4).

Сравнительный анализ анти- α -амилазной активности в ряду производных кемпферола и кверцетина продемонстрировал большую эффективность последних. Причем введение углеводного заместителя по положению С-3 флавоноидного скелета приводило к значительному снижению ингибиторной активности. Присутствие остатка кофейной кислоты у С-6'' углеводного фрагмента (глюкопираноза, галактопираноза) оказывало обратный эффект, приводя к увеличению биологической активности соединения. Таким образом, можно утверждать, что ацилированные флавоноидные гликозиды являются основными компонентами *S. salicifolia*, оказывающими ингибиторное влияние на активность α -амилазы.

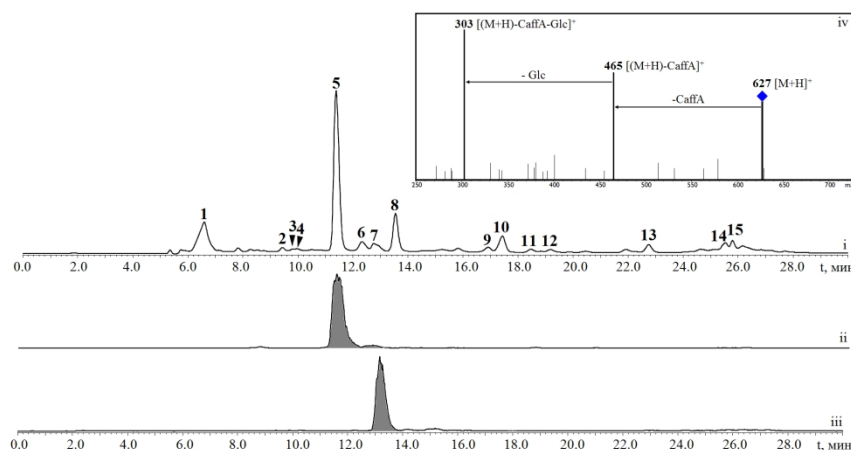


Рис. 3. Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) фракции S-3 из листьев *S. salicifolia* (i) при длине волны 360 нм и в режиме SIM для положительных ионов с m/z 627 (ii) и 611 (iii). На iv – масс-спектр (ESI, положительный режим) 6''-*O*-кофеил-гиперозида (5). Сокращения: CaffA – кофейная кислота, Glc – глюкоза. Числами обозначено положение соединений: 1 – 3-*O*-кофеилхинная кислота, 2 – гиперозид, 3 – трифолин, 4 – изокверцитрин, 5 – 6''-*O*-кофеил-гиперозид, 6 – 6''-*O*-кофеил-изокверцитрин, 7 – 6''-*O*-кофеил-астрагалин, 8 – 1-*O*-*n*-гидроксibenзоил-6-*O*-*n*-кумароил- β -D-глюкопиранозид, 9 – 3,4,5-три-*O*-кофеилхинная кислота, 10 – изорамнетин-3-*O*- β -D-глюкопиранозид, 11 – тилирозид, 12 – изорамнетин-3-*O*- α -L-рамнопиранозид, 13 – 1-*O*-*цис*-циннамоил-6-*O*-(2'-метилен-4'-гидрокси-бутироил)- β -D-глюкопиранозид, 14 – 1-*O*-(4''-гидрокси-3''-метилфуран-2''-он)-6-*O*-*транс*-циннамоил- β -D-глюкопиранозид, 15 – 1-*O*-(4''-гидрокси-3''-метилфуран-2''-он)-6-*O*-*цис*-циннамоил- β -D-глюкопиранозид

Таблица 4. Анти- α -амилазная активность некоторых флавоноидов, $IC_{50} \pm SD^{a,b}$, мкг/мл

Углеводная часть	Агликон	
	Кемпферол	Кверцетин
–	> 200 (R)	76,11 \pm 1,52 (R) ^d
β -D-Галактопираноза	> 200 (3)	147,64 \pm 2,95 (2)
β -D-Глюкопираноза	> 200 (R)	148,92 \pm 3,01 (4)
6''-Кофеил- β -D-галактопираноза	Н.о. ^f	46,18 \pm 0,92 (5) ^d
6''-Кофеил- β -D-глюкопираноза	182,16 \pm 3,64 (7) ^d	51,06 \pm 1,02 (6) ^d

^a Среднее из пяти определений. ^b В скобках указан номер соединения или R для коммерческих образцов. ^c Вещество сравнения – акарбоза (IC_{50} 154,35 \pm 3,08 мкг/мл). ^d Н.о. – не определялось. ^e Разница статистически достоверна по сравнению с показателями группы вещества сравнения ($p < 0,05$).

Влияние химического состава листьев *S. salicifolia* на их биологическую активность. С применением микроколоночной ВЭЖХ-УФ было выявлено, что к числу детектируемых компонентов листьев *S. salicifolia* относились фенилпропаноид 1 и шесть флавоноидов (5–7, 10–12), содержание которых было определено в семи образцах дикорастущего (Sa01–Sa07) и одной коммерческой партии сырья (Sa08) (табл. 5).

В результате было установлено, что суммарное содержание фенилпропаноидов составило 6,97–18,82 мг/г, флавоноидов – 12,02–23,17 мг/г, причем на долю флавоноидных кофеилгликозидов приходилось от 3,12 до 17,37 мг/г от массы воздушно-сухого сырья. Доминирующими соединениями листьев *S. salicifolia* были 3-*O*-кофеилхинная кислота (1) и 6''-*O*-кофеил-гиперозид (5), концентрации которых составили 6,97–18,82 и 0,60–10,76 мг/г соответственно. Качество коммерчески доступного материала *S. salicifolia* (образец Sa08) оказалось удовлетворительным, что позволяет рекомендовать его для практического использования.

Рассматривая вопрос о химической характеристике и аутентификации *S. salicifolia*, можно предложить использование 3-*O*-кофеилхинной кислоты (1) и 6''-*O*-кофеил-гиперозида (5) в качестве маркеров подлинности растительного сырья.

Показатели анти- α -амилазной активности спиртовых экстрактов из листьев *S. salicifolia* составили от 46,41 мкг/мл (образец Sa05) до 263,10 мкг/мл (образец Sa04) (табл. 5). Применение корреляционного анализа выявило наличие связей между химическим составом и биологической активностью *S. salicifolia*. Наиболее выраженной зависимостью между анти- α -амилазной активностью и химическим составом обладали пары, включающие суммарное содержание флавоноидных кофеилгликозидов и содержание 6''-*O*-кофеил-гиперозида, у которых коэффициенты корреляции составили 0,9238 и 0,9606 соответственно (рис. 4).

Таблица 5. Содержание некоторых соединений в листьях *S. salicifolia* (мг/г^a ± SD^b) и их анти- α -амилазная активность (IC₅₀ ± SD^b)

Показатель ^г	Номер образца <i>S. salicifolia</i>							
	Sa01	Sa02	Sa03	Sa04	Sa05	Sa06	Sa07	Sa08
3- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота (1)	13,86 ± 0,27	11,52 ± 0,21	12,00 ± 0,24	12,81 ± 0,25	18,82 ± 0,37	14,02 ± 0,28	6,96 ± 0,14	10,60 ± 0,21
6''- <i>O</i> -Кофеил-гиперозид (5)	8,75 ± 0,17	10,28 ± 0,21	6,43 ± 0,12	0,60 ± 0,01	10,53 ± 0,21	10,76 ± 0,20	7,62 ± 0,15	7,06 ± 0,14
6''- <i>O</i> -Кофеил-изокверцитрин (6)	0,78 ± 0,01	1,57 ± 0,03	0,48 ± 0,01	1,02 ± 0,02	2,10 ± 0,04	0,95 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,81 ± 0,02
6''- <i>O</i> -Кофеил-астрагалин (7)	2,35 ± 0,04	0,90 ± 0,02	2,39 ± 0,04	1,50 ± 0,03	4,74 ± 0,09	2,91 ± 0,05	3,49 ± 0,06	2,11 ± 0,04
Изорамнетин-3- <i>O</i> - β -D-Glcp (10)	1,76 ± 0,03	2,46 ± 0,04	2,29 ± 0,04	3,15 ± 0,06	1,89 ± 0,03	1,56 ± 0,03	0,67 ± 0,01	1,53 ± 0,03
Тилирозид (11)	1,42 ± 0,02	2,52 ± 0,05	1,25 ± 0,02	5,36 ± 0,10	1,85 ± 0,02	1,57 ± 0,03	0,89 ± 0,02	1,47 ± 0,03
Изорамнетин-3- <i>O</i> - α -L-Rhap (12)	2,89 ± 0,05	0,57 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,39 ± 0,01	2,06 ± 0,04	1,47 ± 0,03	1,34 ± 0,03	0,99 ± 0,02
Σ фенилпропаноидов	13,86	11,52	12,00	12,81	18,82	14,02	6,96	10,60
Σ флавоноидов	17,95	18,30	13,82	12,02	23,17	19,22	14,60	13,97
Σ флавоноидных кофеилгликозидов	11,88	12,75	9,30	3,12	17,37	14,62	11,70	9,98
Σ фенольных соединений	31,81	29,82	25,82	24,83	41,99	33,24	21,56	24,57
IC ₅₀ ^д , мкг/мл	69,30 ± 2,07 ^е	62,35 ± 1,87 ^е	103,63 ± 3,10 ^е	263,10 ± 7,89 ^е	46,41 ± 1,42 ^е	60,02 ± 1,82 ^е	70,34 ± 2,09 ^е	119,97 ± 3,62 ^е

^a От массы воздушно-сухого сырья. ^b Среднее из пяти определений. ^в Среднее из трех определений. ^г Glcp – глюкопираноза, Rhap – рамнопираноза, Σ – суммарное содержание. ^д Вещество сравнения – акарбоза (IC₅₀ 154,35 ± 3,08 мкг/мл). ^е Разница статистически достоверна по сравнению с показателями группы вещества сравнения ($p < 0,05$).

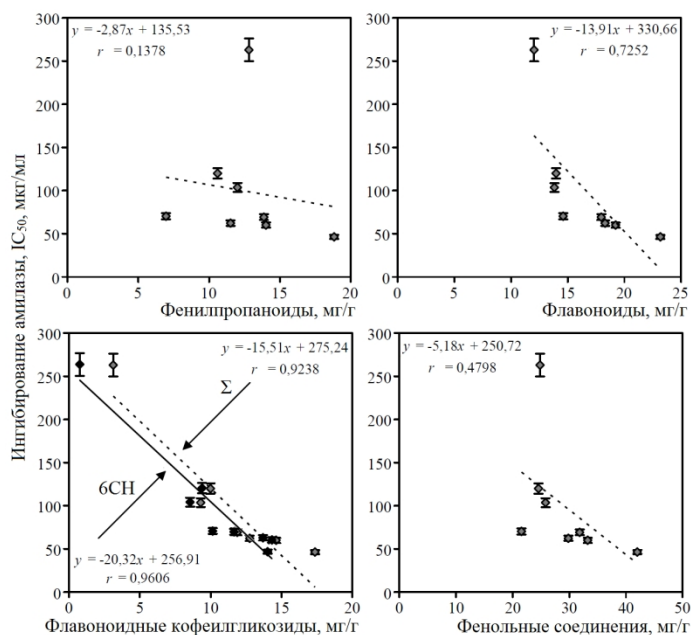


Рис. 4. Корреляционные зависимости между содержанием групп фенольных соединений в листьях *S. salicifolia* (мг/г) и их анти- α -амилазной активностью (IC₅₀, мкг/мл). Для флавоноидных кофеилгликозидов использовали данные по их суммарному содержанию (Σ) и содержанию 6''-*O*-кофеил-гиперозида (6CH). Приведены уравнения линейных зависимостей « y - x », где x – содержание, y – IC₅₀, мкг/мл, а также коэффициент корреляции (r).

Полученные сведения подтвердили ранние выводы о ведущей роли ацилированных флавоноидных гликозидов в проявлении анти- α -амилазной активности для экстрактов *S. salicifolia*.

Выводы

Флавоноиды представляют собой обширную группу природных фенольных соединений, применяющихся в качестве терапевтических агентов для профилактики и лечения различных хронических заболеваний, связанных с дисбалансом углеводного обмена, в том числе сахарного диабета [1]. Одним из механизмов гипогликемического действия флавоноидов является их способность ингибировать активность пищеварительных ферментов, в том числе α -амилазы [3]. Ранее неоднократно демонстрировалась высокая эффективность растений накопителей флавоноидов в качестве антидиабетических средств [4]. К числу таких концентраторов (и фенольных соединений в целом) относятся виды *Spiraea* (Rosaceae), экстракты ко-

торых могут содержать до 53,02-120,07 мг/г флавоноидов. Сравнительный анализ анти- α -амилазной активности видов *Spiraea* показал высокую эффективность *S. salicifolia*, обусловленную присутствием флавоноидных гликозидов, ацилированных остатком кофейной кислоты. В качестве наиболее выраженного ингибитора был определен 6''-*O*-кофеил-гиперозид, являющийся доминирующим флавоноидом листьев *S. salicifolia*. Полученные сведения позволяют рекомендовать листья *S. salicifolia* в качестве нового лекарственного растительного сырья, для получения средств, обладающих гипогликемическим действием.

Список литературы

1. Etxeberria U., Garza A.L., Campion J., Martinez J.A., Milagro F.I. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase // *Expert Opin. Ther. Targets*. 2012. Vol. 16. Pp. 1–29.
2. Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 // *PLoS Medicine*. 2006. Vol. 3. Pp. 2011–2030.
3. Yin Z., Zhang W., Feng F., Zhang Y., Kang W. α -Glycosidase inhibitors isolated from medicinal plants // *Food Sci. Hum. Wellness*. 2014. Vol. 3. Pp. 136–174.
4. Xiao J., Ni X., Kai G., Chen X. A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013. Vol. 53. Pp. 497–506.
5. Playford R.J., Pither C., Gao R., Middleton S.J. Use of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in patients with 'Middleton syndrome': Normal gastric anatomy but with accelerated gastric emptying causing postprandial reactive hypoglycemia and diarrhea // *Can. J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 27. Pp. 403–404.
6. Sales P.M., Souza P.M., Simeoni L.A., Magalhaes P.O., Silveira D. α -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2012. Vol. 15. Pp. 141–183.
7. Ochir S., Nishizawa M., Park B.J. Inhibitory effect of *Rosa gallica* on the digestive enzymes // *J. Nat. Med.* 2010. Vol. 64. Pp. 275–280.
8. Grussu D., Stewart D., McDougall G.J. Berry polyphenols inhibit alpha-amylase *in vitro*: Identifying acting components in rowanberry and raspberry // *J. Agric. Food. Chem.* 2011. Vol. 59. Pp. 2324–2331.
9. Hamdan I.I., Afifi F.U. Screening of Jordanian flora for alpha-amylase inhibitory activity // *Pharm. Biol.* 2008. Vol. 46. Pp. 746–750.
10. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K. Meadowsweet teas as new functional beverages: Comparative analysis of nutrients, phytochemicals and biological effects of four *Filipendula* species // *Molecules*. 2017. Vol. 22. Art. No 16 (doi:10.3390/molecules22010016).
11. Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Olennikov D.N. Agrimoniin, an active ellagitannin from *Comarum palustre* herb with anti- α -glucosidase and antidiabetic potential in streptozotocin-induced diabetic rats // *Molecules*. 2017. Vol. 22. Art. No 73 (doi: 10.3390/molecules22010073).
12. Chirikova N.K., Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Quantitative determination of flavonoid content in the aerial part of Baical scullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. Vol. 36. Pp. 915–922.
13. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins // *J. Agric. Food Chem.* 1998. Vol. 46. Pp. 4267–4274.
14. Galvez M., Martin-Cordero C., Houghton P.J., Ayuso M.J. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species // *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53. Pp. 1927–1933.
15. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Componential profile and amylase inhibiting activity of phenolic compounds from *Calendula officinalis* L. leaves // *The Sci. World J.* 2014. Vol. 2014. Art. ID 654193 (doi:10.1155/2014/654193).
16. Olennikov D.N., Stolbikova A.V., Tankhaeva L.M., Petrov E.V. Phenylpropanoids and polysaccharides of *Plantago depressa* and *P. media* // *Chem. Nat. Comp.* 2011. Vol. 47. Pp. 165–169.
17. Azimova S.S., Vinogradova V.I. Natural compounds. Flavonoids: plant sources, structure and properties. New York: Springer, 2013. 661 p.
18. Yoshida K., Hishida A., Iida O., Hosokawa K., Kawabata J. Flavonol caffeoylglycosides as α -glucosidase inhibitors from *Spiraea cantoniensis* flowers // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56. Pp. 4367–4371.
19. Choudhary M.I., Naheed N., Abbaskhan A., Ali S., Atta-ur-Rahman. Hemuterpene glucosides and other constituents from *Spiraea canescens* // *Phytochemistry*. 2009. Vol. 70. Pp. 1467–1473.
20. Hiradate S., Morita S., Sugie H., Fijii Y., Harada J. Phytotoxic *cis*-cinnamoyl glycosides from *Spiraea thunbergii* // *Phytochemistry*. 2004. Vol. 65. Pp. 731–739.
21. Kim C.-S., Datta P.K., Hara T., Itoh E., Horiike M. Precursor of α -methylene- γ -butyrolactone involved in the insecticidal activity of Thunberg spiraea, *Spiraea thunbergii* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999. Vol. 63. Pp. 152–154.
22. Ahn B., Oh K., Park S., Chung S., Cho E., Kim J., Ro J., Lee K. Phenolic compounds from leaves of *Spiraea salicifolia* // *Korean J. Pharmacogn.* 1996. Vol. 27. Pp. 178–183.
23. Кривошеев И.М. Фармакогностическое исследование спиреи иволистной (*Spiraea salicifolia* L.), произрастающей в Восточной Сибири: автореф. дисс. ... канд. фарм. наук. Улан-Удэ, 2014. 21 с.

Поступило в редакцию 6 мая 2017 г.

Kashchenko N.I.¹, Chirikova N.K.², Olennikov D.N.^{1*} ACYLATED FLAVONOIDS OF SPIRAEA GENUS AS α -AMYLASE INHIBITORS

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, ul. Sakh'yanyovoy, 6, Ulan-Ude, 670047 (Russia), e-mail: olennikovdn@mail.ru

² North-Eastern Federal University, ul. Belinskogo, 58, Yakutsk, 677027 (Russia)

Spiraea L. is a genus of deciduous shrubs of Rosaceae family widespread on the territory of Eastern Siberia. As a result of the study of six *Spiraea* species growing on the Baikal region, it was shown that they characterized by a high content of phenolic compounds and their extracts had an inhibitory effect on α -amylase. The use of correlation analysis made it possible to reveal the leading role of flavonoids as carriers of the biological effect of extracts. The most active was the extract of *S. salicifolia* leaves with an IC₅₀ value 69,30 μ g/mL. After fractionation and chromatographic separation of the extractive substances, 18 compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of *S. salicifolia* and fifteen of them for the first time for the species, including trifolin, 6''-O-caffeoyl-hyperoside, 6''-O-caffeoyl-isoquercitrin, 6''-O-caffeoyl-astragalin, 1-O-*p*-hydroxybenzoyl-6-O-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid, isoramnetinin-3-O- β -D-glucopyranoside, tiliroside, isoramnetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, 1-O-*cis*-cinnamoyl-6-O-(2'-methylene-4'-hydroxybutyryl)- β -D-glucopyranose, 1-O-(4''-hydroxy-3''-methylfurane-2''-one)-6-O-*trans*-cinnamoyl- β -D-glucopyranose, 1-O-(4''-hydroxy-3''-methylfurane-2''-one)-6-O-*cis*-cinnamoyl- β -D-glucopyranose, 6-tuliposide A and tulipalin A. The most active inhibitors of α -amylase were flavonoid caffeoyl glycosides with 6''-O-caffeoyl-hyperoside as a most effective inhibitor with IC₅₀ value 46.18 μ g/mL. Latter compound determined the total anti- α -amylase effect of *S. salicifolia*. The content of 6''-O-caffeoyl-hyperoside in leaves of *S. salicifolia* was 0,60-10,53 mg/g and flavonoids – 12,02-23,17 mg/g. This study demonstrated the fact that the acylated flavonoids of *Spiraea* are effective inhibitors of α -amylase.

Keywords: *Spiraea*; *Rosaceae*; *Spiraea salicifolia*; flavonoids; 6''-O-caffeoyl-hyperoside; HPLC; α -amylase inhibition.

References

1. Etxeberria U., Garza A.L., Campion J., Martinez J.A., Milagro F.I. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2012, vol. 16, pp. 1–29.
2. Mathers C.D., Loncar D. *PLoS Medicine*, 2006, vol. 3, pp. 2011–2030.
3. Yin Z., Zhang W., Feng F., Zhang Y., Kang W. *Food Sci. Hum. Wellness*, 2014, vol. 3, pp. 136–174.
4. Xiao J., Ni X., Kai G., Chen X. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2013, vol. 53, pp. 497–506.
5. Playford R.J., Pither C., Gao R., Middleton S.J. *Can. J. Gastroenterol.*, 2013, vol. 27, pp. 403–404.
6. Sales P.M., Souza P.M., Simeoni L.A., Magalhaes P.O., Silveira D. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2012, vol. 15, pp. 141–183.
7. Ochir S., Nishizawa M., Park B.J. *J. Nat. Med.*, 2010, vol. 64, pp. 275–280.
8. Grussu D., Stewart D., McDougall G.J. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, vol. 59, pp. 2324–2331.
9. Hamdan I.I., Afifi F.U. *Pharm. Biol.*, 2008, vol. 46, pp. 746–750.
10. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K. *Molecules*, 2017, vol. 22, art. no 16. (doi: 10.3390/molecules22010016)
11. Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Olennikov D.N. *Molecules*, 2017, vol. 22, art. no 73. (doi: 10.3390/molecules22010073)
12. Chirikova N.K., Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2010, vol. 36, pp. 915–922.
13. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, vol. 46, pp. 4267–4274.
14. Galvez M., Martin-Cordero C., Houghton P.J., Ayuso M.J. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, pp. 1927–1933.
15. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. *The Sci. World J.*, 2014, vol. 2014, art. ID 654193. (doi: 10.1155/2014/654193).
16. Olennikov D.N., Stolbikova A.V., Tankhaeva L.M., Petrov E.V. *Chem. Nat. Comp.*, 2011, vol. 47, pp. 165–169.
17. Azimova S.S., Vinogradova V.I. *Natural compounds. Flavonoids: plant sources, structure and properties*, New York: Springer, 2013. 661 p.
18. Yoshida K., Hishida A., Iida O., Hosokawa K., Kawabata J. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 4367–4371.
19. Choudhary M.I., Naheed N., Abbaskhan A., Ali S., Atta-ur-Rahman. *Phytochemistry*, 2009, vol. 70, pp. 1467–1473.
20. Hiradate S., Morita S., Sugie H., Fijii Y., Harada J. *Phytochemistry*, 2004, vol. 65, pp. 731–739.
21. Kim C.-S., Datta P.K., Hara T., Itoh E., Horiike M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, vol. 63, pp. 152–154.
22. Ahn B., Oh K., Park S., Chung S., Cho E., Kim J., Ro J., Lee K. *Korean J. Pharmacogn.*, 1996, vol. 27, pp. 178–183.
23. Krivosheev I.M. *Farmakognosticheskoe issledovanie spirei ivolistnoi (Spiraea salicifolia L.), proizra-staiushchei v Vostochnoi Sibiri: avtoref. diss. ... kand. farm. nauk.* [Pharmacognostic study of spiraea islea (*Spiraea salicifolia* L.), which grows in Eastern Siberia. Author's abstract. diss. ... cand. farm. sciences]. Ulan-Ude, 2014, 21 p. (in Russ.).

Received May 6, 2017

* Corresponding author.