

Н.И. КУЛЕШ, С.А. ФЕДОРЕЕВ, М.В. ВЕСЕЛОВА,
В.А. ДЕНИСЕНКО, В.П. ГРИГОРЧУК

Водорастворимые изофлавоноиды из корней *Maackia amurensis*

Из коры корней *Maackia amurensis* выделены семь изофлавоноидов, включая пять новых гликозидов. Их структуры определены как 4'-O-гентиобиозид даидзина, 4'-O-β-D-глюкопиранозид 7-O-гентиобиозилдаидзеина, 4'-O-β-D-глюкопиранозид 7-O-гентиобиозилгенистеина, 7-O-гентиобиозид 3'-метоксидаидзеина и 7-O-гентиобиозид каликосина. Изофлавоноиды 4'-O-β-D-глюкопиранозиды даидзина и генистина в корнях *M. amurensis* идентифицированы впервые.

Ключевые слова: *Maackia amurensis*, изофлавоноиды, гликозиды.

Water soluble isoflavonoids from *Maackia amurensis* roots. N.I. KULESH, S.A. FEDOREEV, M.V. VESELOVA, V.A. DENISENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok), V.P. GRIGORCHUK (A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok).

Seven isoflavonoids, including five new glycosides, were isolated from bark of *Maackia amurensis* roots, and their structures were identified as daidzin-4'-O-gentiobioside, 7-O-gentiobiosyldaidzein-4'-O-β-D-glucopyranoside, 7-O-gentiobiosylgenistein-4'-O-β-D-glucopyranoside, 3'-methoxydaidzein-7-O-gentiobioside and kalikoin-7-O-gentiobioside. In the roots of *M. amurensis*, the isoflavonoids 4'-O-β-D-glucopyranosides of daidzin and genistin were found for the first time.

Key words: *Maackia amurensis*, isoflavones, glycosides.

Введение

Хорошо известно, что лекарственные средства, полученные из растений, обладают более мягким воздействием на организм человека, что позволяет применять их на протяжении длительного времени, не опасаясь серьезных осложнений. Немаловажно и то, что производство таких препаратов требует значительно меньших экономических и финансовых затрат.

Экстракты лекарственных растений обладают разным фармакологическим эффектом. В последние годы у ряда экстрактов таких растений или выделенных из них соединений с выраженным антиоксидантным действием в экспериментах *in vitro* и *in vivo* были выявлены антикоагуляционные и антитромбоцитарные свойства. Во многих растениях обнаружены также эстрогенные свойства, обусловленные наличием в их составе изофлавонов и лигнанов. К таким растениям относится и маакия амурская (*Maackia amurensis* Rupert et Maxim.).

КУЛЕШ Надежда Ивановна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, *ФЕДОРЕЕВ Сергей Александрович – доктор химических наук, заведующий лабораторией, ВЕСЕЛОВА Марина Владимировна – кандидат химических наук, научный сотрудник, ДЕНИСЕНКО Владимир Анатольевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), ГРИГОРЧУК Валерия Петровна – ведущий инженер (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: fedoreev-s@mail.ru

M. amurensis широко распространена в Приморском крае, на северо-востоке Китая и в Северной Корее. Растение содержит большое количество полифенолов, обладающих выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, гепатопротективными и другими свойствами. Из древесины были выделены изофлавоны, птерокарпаны, мономерные, димерные стильбены и другие соединения, составляющие полифенольный комплекс субстанции медицинского препарата «Максар®», разработанного и зарегистрированного в Российской Федерации сотрудниками лаборатории химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (Владивосток) в качестве гепатопротективного средства (Р N003294/01) [1, 2, 14]. «Максар» обладает также антитромбогенными, антитромбоцитарными и противоопухолевыми свойствами [12, 13]. Для более эффективного применения этого уникального реликтового растения в фармацевтической промышленности важно было оценить возможность использования других его органов, например корней, в качестве альтернативного самовозобновляемого источника сырья для производства лекарственных средств.

Корни *M. amurensis*, в отличие от древесины, содержат комплекс из 12 гликозидных форм изофлавонов и птерокарпанов. В его состав входят 7-*O*-гентиобиозиды даидзеина, генистеина, афромозина, псевдобаптигенина, формонетина, 5-*O*-метилгенистеина, 3-*O*-гентиобиозиды маакиаина и медикарпина, даидзин, генистин, 7-*O*-примверозилформонетин и 7-*O*-примверозилпсевдобаптигенин [8, 17].

Комплекс изофлавоноидов из корней *M. amurensis* обладает выраженными антиоксидантными и гепатопротективными свойствами и является перспективным для создания на его основе новых фармацевтических средств [8, 9, 11, 15, 17]. При CCl_4 -гепатите этот комплекс нормализует показатели липидного обмена печени [9, 11], способствует снижению активности маркерных ферментов цитолиза и удельной массы печени, обеспечивает сохранение уровня глюкозы в крови и окисленных никотинамидных коферментов, нормализует содержание пирувата и лактата в печени животных. В восстановлении реакций углеводного и липидного обмена печени действие препарата, полученного на основе изофлавоноидов из корней маккии амурской, оказалось более эффективным, чем эталонных гепатопротекторов легалона и максара [8, 11].

В литературе имеются сведения о ди-, три- и тетрагликозидах изофлавоноидов в растениях сем. Fabaceae. Такие конъюгированные формы изофлавоноидов получают при обработке изофлавонов ферментами сем. гликозилтрансфераз [20]. Изофлавоны даидзеин и генистеин, присутствующие в растениях сем. Fabaceae почти исключительно в виде гликозидов, из-за их большой молекулярной массы не поглощаются клетками эпителия кишечника и поэтому не способны всасываться в желудочно-кишечном тракте без соответствующих метаболических преобразований, которые начинаются в тонком кишечнике, продолжаются в печени и завершаются в толстом кишечнике при участии кишечной микрофлоры. Превращение гликозидов изофлавонов, в том числе гентиобиозида формонетина [7], в биоактивные агликоны осуществляется благодаря действию кишечных β -глюкозидаз. Затем эти агликоны доводятся до периферического кровообращения. Биотрансформация изофлавоноидов микрофлорой кишечника приводит к образованию не только биоактивных агликонов, но и их конъюгированных форм в виде глюкуронидов и сульфатов, которые обнаруживаются в крови и тканях животных [7]. Конъюгаты этих изофлавонов могут обладать биологической активностью (антиоксидантной, гепатопротекторной, антитромбоцитарной, антикоагулянтной и др.) и служить перспективным источником биологически активных соединений [7, 18, 19]. В то же время свободные агликоны при попадании в организм животных в основном сорбируются на стенках желудка и почти не достигают кишечника, что существенно снижает их биологическую активность. Гликозидные формы изофлавонов лишены этого недостатка. Благодаря более высокой растворимости в воде по сравнению с агликонами они легко проникают в кишечник, где под воздействием микрофлоры превращаются в биоактивные молекулы.

Новыми препаратами из корней *M. amurensis* могут стать либо комплекс изофлавоноидов, проявляющий более выраженные гепатопротекторные свойства, чем препараты «Максар®» и «Карсил®», либо отдельные его компоненты, например 7-*O*-гентиобиозид формонетина (ГБФ). Изофлавоноиды из корней *M. amurensis* снижают АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов [4, 6, 10], а препарат ГБФ существенно изменяет показатели коагуляционного гемостаза, удлиняя тромбопластиновое время, уменьшая коагуляцию и свертывание крови и увеличивая протромбиновое время [3, 5, 6]. Гипокоагуляционный эффект ГБФ реализовывался в торможении реакций внутреннего и внешнего путей свертываемости крови. ГБФ в экспериментах *in vivo* проявлял выраженные гипокоагуляционный и антитромбоцитарный эффекты в дозе 25 мг/кг и не вызывал у экспериментальных животных каких-либо токсических эффектов в дозах более чем 100 мг/кг [3, 4, 6].

Методы

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были сняты на приборах Bruker AVANCE III DRX-700 и DRX-500 (Германия) в ДМСО- d_6 при 30 °С. Значения химических сдвигов (δ) и КССВ (J) приведены в миллионных долях (мд) и герцах (Гц) соответственно.

Аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого разрешения (ВЭЖХ-УФ-МС-ВР) индивидуальных соединений из корней *M. amurensis* проводили на хроматомасс-спектрометре Shimadzu LCMS-IT-TOF (Япония), оснащенный жидкостным хроматографом высокого давления LC-20А, детектором на диодной матрице SPD-M20А и времяпролетным масс-спектрометром с ионной ловушкой. Разделение компонентов смесей выполняли на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, Agilent, США) с размером частиц 3,5 мкм, термостатированной при 40 °С. УФ-спектры записывали в диапазоне длин волн (λ) от 200 до 800 нм.

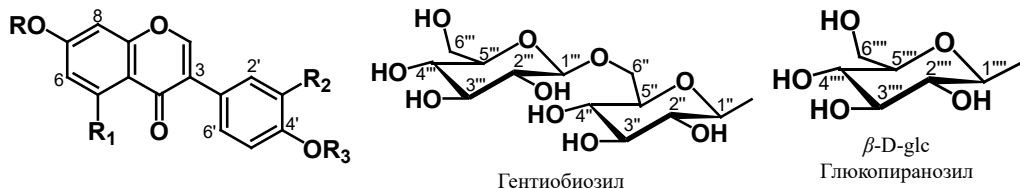
Подвижная фаза состояла из растворов муравьиной кислоты (0,1 %) в деионизированной воде (А) и ацетонитриле (Б). Градиентное элюирование осуществляли со скоростью потока растворителей 0,2 мл/мин по следующей схеме: 5 % Б (5 мин), 5–40 % Б (45 мин), 40–95 % Б (65 мин), 95 % Б (80 мин). Масс-спектрометрические данные получали в режиме ионизации электрораспылением и одновременной регистрации отрицательных и положительных ионов с разрешением 12 000. Диапазон регистрируемых значений m/z составил 200–1000, давление газа-осушителя (N_2) – 150 кПа, поток газа распылителя – 1,5 л/мин, потенциал ионного источника – 3,8 кВ при регистрации положительных и 4,5 кВ – отрицательных ионов.

12,3 г сухого спиртового экстракта из коры корней *M. amurensis* дважды хроматографировали на колонке, заполненной сорбентом «Полихром» в воде. В результате получили суммарную фракцию полярных соединений (2,0 г), содержащую до 20 % свободных углеводов. Водные фракции анализировали методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-УФ-МС-ВР. Фракции, содержащие гликозиды изофлавонов, повторно хроматографировали на полихrome. Хроматография суммы водорастворимых гликозидов на сорбенте Toyopearl HW-50С в воде дала семь изофлавоноидов с выходом 3,8, 5,3, 8,8, 10,5, 26,0, 6,6 и 6,8 мг.

Результаты

Мы продолжили изучение химического состава суммарного спиртового экстракта из коры корней *M. amurensis*. Целью этой работы было выделение и установление строения наиболее полярных, растворимых в воде конъюгированных форм изофлавоноидов. Суммарный спиртовый экстракт, кроме гликозидов изофлавонов, содержал до 15 % углеводов (в основном D-глюкозы), а также ксилозы, фруктозы и сахарозы, что существенно затрудняло выделение и идентификацию изофлавоноидов. Многократной хроматографией на сорбенте «Полихром» суммарная фракция гликозидов изофлавонов была

отделена от мономерных и олигомерных сахаров. Из этой фракции хроматографией на сорбенте Тоуорепл HW-50С были получены в индивидуальном состоянии семь гликозидов изофлавонов, из которых пять (1, 2, 4, 6, 7) оказались новыми соединениями, а два (3, 5) – впервые выделенными из *M. amurensis* (см. рисунок).



	R	R ₁	R ₂	R ₃
1	β -D-glc	H	H	Гентиобиозил
2	Гентиобиозил	H	H	β -D-glc
3	β -D-glc	H	H	β -D-glc
4	Гентиобиозил	ОН	H	β -D-glc
5	β -D-glc	ОН	H	β -D-glc
6	Гентиобиозил	H	OCH ₃	H
7	Гентиобиозил	H	ОН	CH ₃

Структуры гликозидов из коры корней *M. amurensis*

В дополнение к 12 гликозидам изофлавонов и птерокарпанов мы выделили еще 7 изофлавоноидов, которые представлены диглюкозидами даидзеина (3), генистеина (5), гентибиозидами 3'-метоксидаидзеина (6) и каликозина (7), тригликозидами даидзеина (1, 2) и генистеина (4).

Структуры новых соединений были установлены как 4'-O-гентибиозид даидзина (1), 4'-O- β -D-глюкопиранозид 7-O-гентибиозилдаидзеина (2), 4'-O- β -D-глюкопиранозид 7-O-гентибиозилгенистеина (4), 7-O-гентибиозид 3'-метоксидаидзеина (6) и 7-O-гентибиозид каликозина (7). Соединения 3 и 5 на основании спектральных данных были идентифицированы как 4'-O- β -D-глюкопиранозид даидзина и 4'-O- β -D-глюкопиранозид генистеина. Эти гликозиды ранее были выделены из клеточной культуры *M. amurensis* [16].

Заключение

Таким образом, нами был изучен полный химический состав комплекса гликозидов из коры корней *M. amurensis*. Этот комплекс гликозидов обладает гепатопротективной активностью и способен ингибировать ряд показателей тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в условиях энтерального введения. Следовательно, существует перспектива создания на его основе нового гепатопротективного средства, по эффективности не уступающего препаратам «Максар®» и «Карсил®» и способного уменьшать вероятность возникновения тромбозов при различных сердечно-сосудистых заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородова Э.И., Венгеровский А.И., Гайсаев Р.О., Саратиков А.С., Федорев С.А. Новое гепатозащитное средство – Максар // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 1999. Т. 8. С. 46–48.
2. Гайсаев Р.О., Белобородова Э.И., Саратиков А.С. Способ лечения хронических гепатитов: пат. 2175237 РФ. Заявл. 02.06.1998; опубл. 27.10.2001, Бюл. № 30.
3. Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Момот А.П., Талалаева О.С., Кулеш Н.И., Федорев С.А., Лычева Н.А. Влияние 7-O-гентибиозида формонетина на показатели коагуляционного гемостаза и фибринолиза у крыс // Тромбоз, гемостаз и реология. 2016. Т. 67. С. 73–76.

4. Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Момот А.П., Брюханов В.М., Талалаева О.С., Кулеш Н.И., Федореев С.А., Лычева Н.А. Влияние 7-О-гентиобиозида формонетина на показатели тромбоцитарного гемостаза у крыс // Тромбоз, гемостаз и реология. 2016. Т. 66. С. 55–58.
5. Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Кулеш Н.И., Федореев С.А. Средство, обладающее антиагрегантной и антикоагулянтной активностью: пат. 2573379 РФ. Заявл. 12.08.2014; опубл. 20.01.2016, Бюл. № 2.
6. Зверев Я.Ф., Кудинов А.В., Момот А.П., Федореев С.А., Замятина С.В., Кулеш Н.И., Лычева Н.А., Федоров Д.В. Антиагрегантная и антикоагулянтная активность 7-О-гентиобиозида формонетина в условиях *in vitro* и *in vivo* // Бюл. сиб. медицины. 2016. Т. 15. С. 30–39.
7. Зверев Я.Ф., Федореев С.А., Кудинов А.В., Тарбеева Д.В., Кулеш Н.И., Григорчук В.П., Замятина С.В. Особенности фармакокинетики 7-О-гентиобиозида формонетина определяют его гемостатическую активность у крыс // Тромбоз, гемостаз и реология. 2018. Т. 74. С. 78–87.
8. Кулеш Н.И., Федореев С.А., Веселова М.В., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Влияние изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // Хим.-фарм. журн. 2016. Т. 50. С. 21–27.
9. Кулеш Н.И., Федореев С.А., Веселова М.В., Мищенко Н.П., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е. Гепатопротективное средство: пат. 2454243 РФ. Заявл. 14.02.2011; опубл. 27.06.2012, Бюл. № 18.
10. Кулеш Н.И., Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Федореев С.А., Веселова М.В., Мищенко Н.П. Средство, обладающее антиагрегантной и антикоагулянтной активностью: пат. 2601407 РФ. Заявл. 08.09.2015; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 31.
11. Кушнерова Н.Ф., Федореев С.А., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П., Веселова М.В., Момот Т.В. Гепатопротекторные свойства изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* при экспериментальном поражении печени четыреххлористым углеродом // Эксперим. и клинич. фармакол. 2014. Т. 77. С. 26–30.
12. Плотникова А.М., Шульгау З.Т., Плотникова Т.М., Алиев О.И., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П., Федореев С.А. Антитромбогенная и антитромбоцитарная активность экстракта из древесины мааки амурской // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. Т. 147. С. 164–167.
13. Плотникова А.М., Плотникова Т.М., Шульгау З.Т., Федореев С.А., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П., Василевская Н.А., Имбс Т.И., Глебо Л.И. Средство, обладающее гемореологической и антитромбоцитарной активностью: пат. 2342944 РФ. Заявл. 06.06.2007; опубл. 10.01.2009, Бюл. № 1.
14. Федореев С.А., Кулеш Н.И., Глебо Л.И., Покушалова Т.В., Веселова М.В., Саратиков А.С., Венгерский А.И., Чучалин В.С. Препарат Максар из дальневосточного растения мааки амурской // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. С. 22–26.
15. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Федореев С.А. Корни мааки амурской – перспективный источник для создания гепатопротекторных препаратов // Фундам. исслед. 2014. Т. 5. С. 1225–1228.
16. Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P., Grishchenko O.V., Veselova M.V., Krivoschekova O.E., Kulesh N.I., Denisenko V.A., Tchernoded G.K., Zhuravlev Y.N. Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56. P. 7023–7031.
17. Kulesh N.I., Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Zverev Ya.F., Zamyatina S.V. Antioxidant activity of the isoflavonoids from the roots of *Maackia amurensis* // Nat. Prod. Comm. 2013. Vol. 8. P. 589–592.
18. Pyo Y.-H., Lee T.-C., Lee Y.-C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with b-glucosidase-producing lactic acid bacteria // Food Res. Int. 2005. Vol. 38. P. 551–559.
19. Shelnett S.R., Cimino C.O., Wiggins P.A., Ronis M.J.J., Badger T.M. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage // Amer. J. Clin. Nutr. 2002. Vol. 76. P. 588–594.
20. Veitch N.C. Isoflavonoids of the leguminosae // Nat. Prod. Rep. 2013. Vol. 30. P. 988–1027.