








В.И. Топоркова¹ 
А.О. Понкратова¹ 
А.К. Уэйли¹ 
В.Г. Лужанин² 
М.Ю. Гончаров¹ 

Применение спектральных методов анализа для установления структуры индивидуальных вторичных метаболитов, выделенных из надземной части хохлатки крупноприцветниковой

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Проф. Попова, д. 14а, Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Екатерининская, д. 110, Пермь, 614990, Российская Федерация






✉ Понкратова Анастасия Олеговна; anastasiya.ponkratova@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Растения рода *Corydalis* (*Papaveraceae*) широко используются в восточной медицине и отличаются богатым содержанием биологически активных веществ. Один из представителей рода во флоре России – хохлатка крупноприцветниковая (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) распространена на территории Западной и Восточной Сибири, однако ее химический состав недостаточно изучен. **Цель работы:** проведение фитохимического анализа травы хохлатки крупноприцветниковой (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) путем выделения в индивидуальном виде и определения структуры основных вторичных метаболитов современными хроматографическими методами анализа и ЯМР-спектроскопией. **Материалы и методы:** высушенная надземная часть культивируемого растения *C. bracteata*. Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности – Dianion® HP-20 (Supelco) и Sephadex® LH-20 (GE Healthcare), а также методом препаративной ВЭЖХ на колонке Kromasil® C18 с детектированием при 235 нм. В качестве элюента использовали смеси вода–ацетонитрил в соотношениях от 5:95 до 50:50 по объему с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты. Анализ фракций перед объединением проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Анализ растворов полученных индивидуальных соединений проводили методом ВЭЖХ на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu) с колонкой SUPELCOSIL™ LC-18 и детектированием при 235 и 280 нм. Структуры выделенных индивидуальных соединений устанавливали методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии на приборе Bruker Avance III 400 МГц. **Результаты:** из надземной части *C. bracteata* выделены и охарактеризованы четыре индивидуальных соединения: алкалоид изохинолинового ряда – коптизин, флавоноиды – рутин, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид и кемпферол-3-О-β-D-глюкопиранозид. **Выводы:** при проведении фитохимического анализа надземной части хохлатки крупноприцветниковой впервые были выделены соединения как алкалоидной, так и флавоноидной природы, структура которых была доказана с помощью ЯМР-спектроскопии. *C. bracteata* следует рассматривать в качестве перспективного потенциального источника биологически активных веществ.

Ключевые слова: хохлатка крупноприцветниковая; *Corydalis bracteata*; флавоноиды; алкалоиды; вторичные метаболиты; селективное выделение; ЯМР-спектроскопия

Для цитирования: Топоркова В.И., Понкратова А.О., Уэйли А.К., Лужанин В.Г., Гончаров М.Ю. Применение спектральных методов анализа для установления структуры индивидуальных вторичных метаболитов, выделенных из наземной части хохлатки крупноприцветниковой. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(1):56–64. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-56-64>

V.I. Toporkova¹ 
 A.O. Ponkratova¹ 
 A.K. Whaley¹ 
 V.G. Luzhanin² 
 M.Yu. Goncharov¹ 

The Use of Spectroscopic Methods for Structural Elucidation of Individual Secondary Metabolites Isolated from the Aerial Parts of *Corydalis bracteata*

¹ St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

² Perm State Pharmaceutical Academy, 101, Ekaterininskaya St., Perm 614990, Russian Federation

✉ Anastasiia O. Ponkratova; anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ABSTRACT

Plants of the *Corydalis* (*Papaveraceae*) genus are widely used in oriental medicine and are known for their particularly rich content of biologically active substances. One of the species encountered in Russia, the large-flowered corydalis (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.), is widespread in Western and Eastern Siberia, but none the less its chemical composition has not been properly studied yet. **The aim of the study** was to perform phytochemical analysis of *Corydalis bracteata* herb through isolation of the main secondary metabolites and elucidation of their structure, using modern chromatographic methods of analysis and NMR spectroscopy. **Materials and methods:** the analysis was performed for dried aerial parts of *C. bracteata*. The isolation of individual compounds was performed using open-column chromatography and glass columns packed with sorbents with different selectivity characteristics—Dianion[®] HP-20 (Supelco) and Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare)—as well as preparative-scale chromatography with a Kromasil[®] C18 column and detection at 235 nm. Water and acetonitrile mixed in the ratios 5:95–50:50 v/v with the addition of 0.1% trifluoroacetic acid were used as the eluents. The analysis of fractions before pooling was performed by high-performance thin-layer chromatography with Silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck). The analysis of the individual compound solutions was performed by HPLC using a Prominence LC-20 (Shimadzu) instrument, a SUPELCOSIL[™] LC-18 column, and detection at 235 nm. The structures of the isolated individual compounds were elucidated by one- and two-dimensional NMR spectroscopy using a Bruker Avance III 400 MHz NMR spectrometer. **Results:** four individual compounds from the *C. bracteata* aerial parts were isolated and analysed: an isoquinoline alkaloid—coptisine (1) and three flavonoids—rutin (2), quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (3), and kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (4). **Conclusions:** as a result of the phytochemical analysis of the *C. bracteata* aerial parts, compounds of both alkaloid and flavonoid nature were isolated for the first time, and their structures were elucidated using NMR spectroscopy. *C. bracteata* should be considered as a promising potential source of biologically active substances.

Key words: large-flowered corydalis; *Corydalis bracteata*; flavonoids; alkaloids; secondary metabolites; selective isolation; NMR spectroscopy

For citation: Toporkova V.I., Ponkratova A.O., Whaley A.K., Luzhanin V.G., Goncharov M.Yu. The use of spectroscopic methods for structural elucidation of individual secondary metabolites isolated from the aerial parts of *Corydalis bracteata*. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(1):56–64. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-56-64>

Введение

Растения рода *Corydalis* (*Papaveraceae*) широко используются в восточной медицине благодаря содержанию большого количества биологически активных веществ [1, 2]. В результате ранее проведенных исследований химического состава [2–8] из различных видов *Corydalis* были выделены изохинолиновые алкалоиды следующих классов: протоберберинового, бензофенантрелинового, апорфинового, протопинового, бензилизохинолинового, морфинанов и спиробензилизохинолинового. Наиболее изученные виды хохлатки, такие как *Corydalis yanhusuo*, описанная в Европейской и Китайской фармакопее, и *Corydalis decumbens*, описанная в Китайской фармакопее [9], наряду с другими видами *Corydalis* применяются как болеутоляющие средства в виде таблеток, гранул, порошков и экстрактов для облегчения боли при гастралгии, мигрени и дисменорее, как противовоспалительные средства для лечения ревматизма и заболеваний печени, а также для лечения сердечной аритмии [2, 10–13]. В то же время информация по применению вида *Corydalis bracteata* в народной и традиционной медицине отсутствует.

Хохлатка крупноприцветниковая (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) представляет собой многолетнее травянистое растение с длинными черешковыми тройчато рассеченными листьями и дуговидно изогнутыми крупными цветками желтого цвета с восходящим шпорцем, собранными в соцветие кисть. *C. bracteata* произрастает в Азии и широко распространена в Западной и Восточной Сибири и Монголии. Ранее в *C. bracteata* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) были идентифицированы 12 алкалоидов, однако выделение их в индивидуальном виде из *C. bracteata*, наряду с изучением химического состава соединений, относящихся к другим классам, в данном растении ранее не проводилось [1].

Актуальность данного исследования обусловлена широким спектром биологической активности изохинолиновых алкалоидов, а также отсутствием

данных о вторичных метаболитах растения, относящихся к другим классам [2, 10, 11, 14–19].

Цель работы – проведение фитохимического анализа травы хохлатки крупноприцветниковой (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) путем выделения в индивидуальном виде и определения структуры основных вторичных метаболитов современными хроматографическими методами анализа и ЯМР-спектроскопией.

Материалы и методы

Надземная часть *C. bracteata* собрана в фазу цветения на территории Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук (Санкт-Петербург). Поскольку хохлатка крупноприцветниковая занесена в Красные книги Бурятской АССР и Иркутской области, а также включена в списки редких и исчезающих растений Сибири, для дальнейших исследований следует использовать культивируемое растение.

Сырье перед экстракцией подвергали воздушно-теневого сушке, измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Предварительно осуществляли выбор оптимального экстрагента. В пять колб вместимостью 200 мл помещали по 10 г сырья *C. bracteata* и добавляли 100 мл соответствующего экстрагента: гексана, дихлорметана, бутанола, 70 или 96% этилового спирта. Экстракцию проводили в плотно закрытых колбах при комнатной температуре в течение 48 ч. Полученные экстракты анализировали методом ВЭЖХ на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu) с диодно-матричным детектором при длинах волн 235 и 280 нм. Использовали колонку SUPELCOSIL™ LC-18 (250×4,6 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки – 40 °С. Объем вводимой пробы – 10 мкл. В качестве элюента использовали смеси вода–ацетонитрил в соотношениях от 5:95 до 0:100 по объему с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты. Время анализа – 50 мин. Было установлено, что использование 96% этилового спирта позволяет получить экстракт из *C. bracteata*

с наибольшим качественным и количественным содержанием производных флавоноидов и алкалоидов, поэтому данный экстрагент был выбран для дальнейшей работы.

800 г измельченного сырья подвергали многократной экстракции 96% этиловым спиртом (7500 мл) при комнатной температуре с использованием механической мешалки (Heidolph). Экстракция проводилась до того момента, пока полученный экстракт не становился бледным по сравнению с первоначальным. Все полученные спиртовые экстракты объединяли и выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph) при 60 °С до объема 350 мл. К 350 мл экстракта добавляли 100 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую жидкостно-жидкостную (ЖЖ) экстракцию с равными объемом *n*-гексана. После чего к водно-спиртовому остатку добавляли 200 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую ЖЖ экстракцию с равным объемом дихлорметана. В заключение проводили ЖЖ экстракцию водно-спиртового остатка с равным объемом бутанола.

Дихлорметановую фракцию выпаривали досуха на вакуумно-ротационном испарителе, после чего сухой остаток растворяли в 96% этиловом спирте. Образовавшийся нерастворимый в 96% этаноле осадок отфильтровывали, промывали 96% этанолом и затем растворяли в 10 мл воды очищенной. Таким образом было получено соединение **1** массой (m_1) = 24,15, (время удерживания на колонке SUPELCOSIL™ LC-18 в описанных выше условиях анализа (t_{R1}) = 27,445).

Бутанольную фракцию выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 50% этаноле и загружали на колонку, заполненную сорбентом Dianion® HP20 (Supelco, CAS 9052-95-3). Проводили градиентное элюирование с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10% (соотношение вода – 96% этанол от 100:0 до 0:100 по объему). Собранные фракции анализировали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с целью выявления фракций со схожими компонентами. ВЭТСХ выполняли на приборе CAMAG® (аппликатор для полуавтоматического нанесения образцов Linomat 5, автоматическая камера для хроматографирования пластин Automatic Developing Chamber 2, изображения получали при помощи TLC Vizualizer 2), с использованием пластин для ВЭТСХ Silica gel 60 F₂₅₄ с размером частиц сорбента 4–8 мкм (Merck, кат. № 105642)

в системе растворителей *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:2).

Фракции, которым на хроматограмме соответствовали пятна с одинаковыми факторами удерживания (R_f) и окраской, – объединяли. Объединенные фракции выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 20 мл и анализировали методом ВЭЖХ на колонке SUPELCOSIL™ LC-18 в описанных выше условиях для выбора фракций с наибольшим содержанием определяемых веществ.

Фракцию, полученную при элюировании колонки 40% этанолом, загружали на открытую колонку, заполненную сорбентом Sephadex® LH-20 (GE Healthcare), и подвергали изократическому элюированию 50% этанолом. Полученные фракции анализировали методом ВЭТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которым на хроматограмме соответствовали пятна с одинаковыми факторами удерживания (R_f) и окраской, – объединяли. Объединенные фракции выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 20 мл. Таким образом было получено 12 фракций. Полученные фракции анализировали методом ВЭЖХ для выбора фракций с наибольшим содержанием определяемых веществ. Выбранные фракции 8 и 10 подвергали хроматографическому разделению на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе Smartline (Knauer) со спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Применяли препаративную хроматографическую колонку Kromasil® C18 (250×30 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм. Скорость потока подвижной фазы составляла 40 мл/мин. В качестве элюента использовали смеси вода–ацетонитрил в соотношениях от 5:95 до 50:50 по объему с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты.

Из фракции 8 было выделено соединение **2** (m_2 = 45,15 мг, t_{R2} = 19,347 мин), а из фракции 10 соединения **3** (m_3 = 16,15 мг, t_{R3} = 19,819 мин) и **4** (m_4 = 12,65 мг, t_{R4} = 20,965 мин).

Структуры выделенных индивидуальных соединений устанавливали методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии на приборе Bruker Avance III 400 МГц (Bruker NMR Technology). Растворитель – ДМСО-*d*₆. Параметры ¹H-ЯМР анализа: ширина спектра – 24,9917 ppm (10 000 Гц), угол поворота намагниченности – 30°, задержка на релаксацию – 1 с, количество накоплений сигнала свободной индукции – 16,

число точек аналого-цифрового преобразования – 64к, способ калибровки шкалы химических сдвигов – относительно остаточных сигналов дейтерорастворителя. Параметры NOESY анализа: задержка на релаксацию – 1,93 с, количество накоплений сигнала свободной индукции на 1 инкремент – 8, число точек аналого-цифрового преобразования 2к на 128, время смешивания 0,7 с.

Результаты и обсуждение

Соединение **1** представляет собой оранжевое кристаллическое вещество, УФ-спектр которого имеет максимумы поглощения при 265, 358 и 484 нм. ¹H-ЯМР спектр соединения содержал сигналы 14 протонов, среди которых присутствовали две спиновые системы. Первая спиновая система состояла из двух дублет-дублетов в алифатической области спектра, каждый из которых интегрировался на два протона и соответствовал двум соседним CH₂ группам при δН 4,88 (2Н, дд, J = 7,2; 6,0 Гц) и 3,20 (2Н, дд, J = 7,2; 6,0 Гц) м.д. Сильный химический сдвиг метиленовой группы при 4,88 м.д. может быть обусловлен только наличием в соседнем положении от него положительно заряженного атома азота дегидроизохинолиновой системы. Вторая спиновая система состояла из двух дублетов

Таблица 1. ¹H-ЯМР данные соединения **1** – коптисин

Table 1. ¹H NMR data of compound **1**—coptisine

Положение <i>Position</i>	δН (J, Гц/Hz)
1	7,80 (1H, c) 7.80 (1H, s)
4	7,09 (1H, c) 7.09 (1H, s)
5	3,20 (2H, т, J = 7,2; 6,0) 3.20 (2H, t, J = 7.2, 6.0)
6	4,88 (2H, т, J = 7,2; 6,0) 4.88 (2H, t, J = 7.2, 6.0)
8	9,95 (1H, c) 9.95 (1H, s)
11	7,83 (1H, д, J = 8,7) 7.83 (1H, d, J = 8.7)
12	8,05 (1H, д, J = 8,7) 8.05 (1H, d, J = 8.7)
13	8,96 (1H, c) 8.96 (1H, s)
2,3-OCH ₂ O	6,18 (2H, c) 6.18 (2H, s)
9,10-OCH ₂ O	6,54 (2H, c) 6.54 (2H, s)

в ароматической области спектра при δН 8,05 (1Н, д, J = 8,7 Гц) и 7,83 (1Н, д, J = 8,7 Гц) м.д. Исходя из константы спин-спиновой взаимодействия в 8,7 Гц очевидно, что данные ароматические протоны расположены в ортоположении относительно друг друга. Все остальные 8 протонов, представленные в ¹H-ЯМР спектре, являются синглетами, интегрирующимися на 1 или 2 протона при δН 6,18 (2Н, с), 6,54 (2Н, с), 7,09 (1Н, с), 7,80 (1Н, с), 8,96 (1Н, с) и 9,95 (1Н, с) м.д. Наличие ароматических синглетов, сдвинутых в область более слабого поля при 8,96 (1Н, с) и 9,95 (1Н, с) м.д., и положительно заряженного атома азота указывает на то, что данные протоны находятся в электронодефицитной N-замещенной пиридиновой системе. Синглеты при δН 6,18 (2Н, с) и 6,54 (2Н, с) м.д. указывают на наличие двух метилendioкси-групп в молекуле. Исходя из вышеперечисленных спектральных данных было установлено, что соединение **1** является представителем протоберберинового алкалоидов, но в зависимости от расположения двух метилendioкси-групп в протоберберинового системе наблюдаемые спектральные характеристики могут потенциально соответствовать, по крайней мере, четырем возможным изомерам. В результате структура соединения **1** была установлена как коптисин на основе анализа ¹H-ЯМР данных (табл. 1) и анализа соответствующих NOESY корреляций.

Доказательством структуры коптисина являются NOESY корреляции от 4-Н (δН 7,09 м.д.) к протонам 5-CH₂ группы (δН 3,20 м.д.), от протонов 6-CH₂ группы (δН 4,88 м.д.) к 8-Н (δН 9,95 м.д.) и от 13-Н (δН 8,96 м.д.) к 12-Н (δН 8,05 м.д.) и 1-Н (δН 7,80 м.д.) (рис. 1).

Соединение **2** – желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы УФ-поглощения

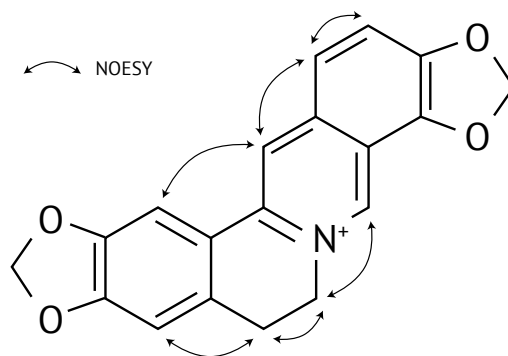


Рис. 1. Ключевые NOESY корреляции коптисина

Fig. 1. Key NOESY correlations of coptisine

при 255 и 351 нм. В ^1H -ЯМР спектре (табл. 2) присутствовали сигналы, характерные для рутина – наличие спиновой системы кольца А, состоящей из протонов 6-Н при δH 6,20 (1H, д, $J = 2,0$ Гц), и 8-Н 6,40 (1H, д, $J = 2,0$ Гц) м.д., и спиновой системы кольца В, состоящей из протонов 2'-Н при δH 7,54 (1H, уш. с), 5'-Н 6,85 (1H, д, $J = 8,6$ Гц) и 6'-Н 7,55 (1H, дд, $J = 8,6; 2,0$ Гц) м.д. Сигналы аномерных протонов остатков глюкозы 1''-Н и рамнозы 1'''-Н находились при δH 5,35 (1H, д, $J = 7,3$ Гц) и 4,39 (1H, д, $J = 1,2$ Гц) м.д. соответственно. Таким образом, на основании анализа спектральных данных и сравнения их с литературными данными, предполагается, что соединение **2** является рутином [20].

Соединение **3** представляет собой желтое кристаллическое вещество с максимумами УФ-поглощения при 254 и 351 нм. В ^1H -ЯМР

спектре присутствовали сигналы, характерные для остатков кверцетина и глюкозы (табл. 2). В ароматической области спектра наблюдались сигналы спиновой системы кольца А, состоящей из протонов 6-Н при δH 6,21 (1H, д, $J = 1,9$ Гц) и 8-Н 6,41 (1H, д, $J = 1,9$ Гц) м.д., и спиновой системы кольца В, состоящей из протонов 2'-Н при δH 7,58 (1H, д, $J = 2,1$ Гц), 5'-Н 6,85 (1H, д, $J = 9,0$ Гц) и 6'-Н 7,55 (1H, дд, $J = 9,0; 2,1$ Гц) м.д. Сигнал аномерного протона остатка глюкозы 1''-Н наблюдался при δH 5,47 (1H, д, $J = 7,3$ Гц) м.д. В результате анализа полученных спектральных данных и сравнения их с литературными данными предполагается, что соединение **3** представляет собой кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид [21].

Соединение **4** представляет собой желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы

Таблица 2. ^1H -ЯМР данные соединений **2–4** – рутин, кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид, кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид

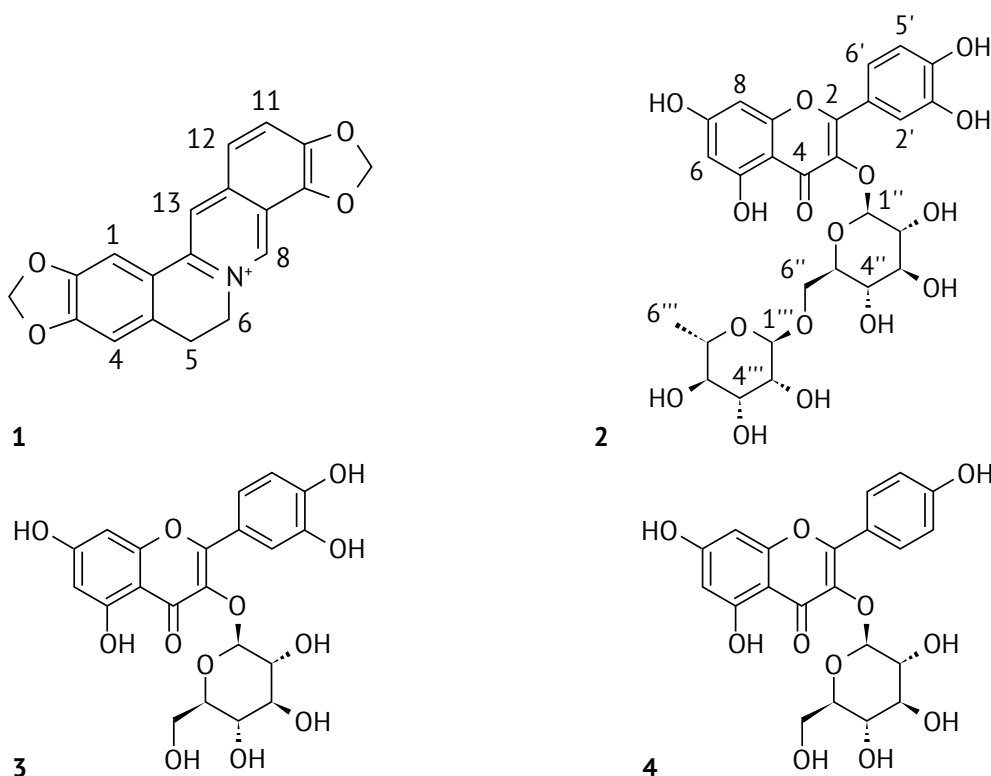
Table 2. ^1H NMR data of compounds **2–4**: rutine, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, and kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside

Положение <i>Position</i>	Соединение 2 <i>Compound 2</i> δH (J , Гц/Hz)	Положение <i>Position</i>	Соединение 3 <i>Compound 3</i> δH (J , Гц/Hz)	Положение <i>Position</i>	Соединение 4 <i>Compound 4</i> δH (J , Гц/Hz)
6	6,20 (1H, д, $J = 2,0$) 6.20 (1H, d, $J = 2.0$)	6	6,21 (1H, д, $J = 1,9$) 6.21 (1H, d, $J = 1.9$)	6	6,22 (1H, д, $J = 2,0$) 6.22 (1H, d, $J = 2.0$)
8	6,40 (1H, д, $J = 2,0$) 6.40 (1H, d, $J = 2.0$)	8	6,41 (1H, д, $J = 1,9$) 6.41 (1H, d, $J = 1.9$)	8	6,45 (1H, д, $J = 2,0$) 6.45 (1H, d, $J = 2.0$)
2'	7,54 (1H, уш. с) 7.54 (1H, brs)	2'	7,58 (1H, д, $J = 2,1$) 7.58 (1H, d, $J = 2.1$)	2', 6'	8,04 (2H, д, $J = 8,9$) 8.04 (2H, d, $J = 8.9$)
5'	6,85 (1H, д, $J = 8,6$) 6.85 (1H, d, $J = 8.6$)	5'	6,85 (1H, д, $J = 9,0$) 6.85 (1H, d, $J = 9.0$)	3', 5'	6,89 (2H, д, $J = 8,9$) 6.89 (2H, d, $J = 8.9$)
6'	7,55 (1H, дд, $J = 8,6; 2,0$) 7.55 (1H, dd, $J = 8.6, 2.0$)	6'	7,58 (1H, дд, $J = 9,0; 2,1$) 7.58 (1H, dd, $J = 9.0, 2.1$)	1''	5,46 (1H, д, $J = 7,3$) 5.46 (1H, d, $J = 7.3$)
1''	5,35 (1H, д, $J = 7,3$) 5.35 (1H, d, $J = 7.3$)	1''	5,47 (1H, д, $J = 7,3$) 5.47 (1H, d, $J = 7.3$)	2''– 6''	3,09–3,57 (6H, м) 3.09–3.57 (6H, m)
2''– 6''	3,08–3,73 (6H, м) 3.08–3.73 (6H, m)	2''– 6''	3,09–3,59 (6H, м) 3.09–3.59 (6H, m)	5-OH	12,62 (1H, с) 12.62 (1H, s)
1'''	4,39 (1H, д, $J = 1,2$) 4.39 (1H, d, $J = 1.2$)	5-OH	12,65 (1H, с) 12.65 (1H, s)	7-OH	10,89 (1H, с) 10.89 (1H, s)
2'''– 5'''	3,08–3,72 (5H, м) 3.08–3.72 (5H, m)	7-OH	10,86 (1H, с) 10.86 (1H, s)	4''-OH	10,20 (1H, с) 10.20 (1H, s)
6'''	1,0 (3H, д, $J = 6,2$) 1.0 (3H, d, $J = 6.2$)	3''-OH	9,21 (1H, с) 9.21 (1H, s)		
5-OH	12,60 (1H, с) 12.60 (1H, s)	4''-OH	9,81 (1H, с) 9.81 (1H, s)		
7-OH	10,84 (1H, с) 10.84 (1H, s)				
3''-OH	9,17 (1H, с) 9.17 (1H, s)				
4''-OH	9,67 (1H, с) 9.67 (1H, s)				

поглощения в УФ-спектре при 265 и 347 нм. В ^1H -ЯМР спектре соединения **4** присутствовали сигналы, характерные для остатков кемпферола и глюкозы (табл. 2). В ароматической области спектра наблюдались сигналы спиновой системы кольца А, состоящей из протонов 6-Н при δH 6,22 (1H, д, $J = 2,0$ Гц) и 8-Н 6,45 (1H, д, $J = 2,0$ Гц) м.д., и спиновой системы кольца В, состоящей из протонов 2',6' при δH 8,04 (2H, д, $J = 8,9$ Гц) и 3',5'-Н при δH 6,89 (2H, д, $J = 8,9$ Гц) м.д. Сигнал аномерного протона остатка глюкозы 1''-Н наблюдался при δH 5,46 (1H, д, $J = 7,3$ Гц)

м.д. В результате анализа спектральных данных и сравнения их с литературными данными предполагается, что соединение **4** представляет собой кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид [22].

В результате исследования из надземной части *C. bracteata* были выделены и охарактеризованы четыре индивидуальных соединения: коптизин (**1**) [23], рутин (**2**) [20], кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид (**3**) [21] и кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид (**4**) [22], структуры которых представлены ниже:



Заключение

В результате фитохимического изучения надземной части *Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers. методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности, а также методом препаративной ВЭЖХ было выделено одно соединение, относящееся к классу алкалоидов, и три соединения, относящихся к классу флавоноидов. Структура выделенных соединений была охарактеризована с помощью ЯМР-спектроскопии. Соединение **1** представ-

ляет собой алкалоид изохинолинового ряда – коптизин, соединение **2** – рутин, соединение **3** – кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид, соединение **4** – кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид. Соединения **2–4** обнаружены в растениях рода *Corydalis* впервые, а также все соединения выделены впервые из вида *C. bracteata*. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что надземная часть *C. bracteata* является перспективным источником биологически активных веществ как алкалоидной, так и флавоноидной природы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Khodorova NV, Shavarda AL, Lequart-Pillon M, Laberche JC, Voitsekhovskaja OV, Boitel-Conti M. Biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloids in *Corydalis bracteata*: compartmentation and seasonal dynamics. *Phytochemistry*. 2013;92:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.008>
2. Iranshahi M, Quinn RJ, Iranshahi M. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *RSC Adv*. 2014;4(31):15900–13. <https://doi.org/10.1039/C3RA47944G>
3. Jha RN, Pandey MB, Singh AK, Singh S, Singh VP. New alkaloids from *Corydalis* species. *Nat Prod Res*. 2009;23(3):250–5. <https://doi.org/10.1080/14786410801996390>
4. Xiao HT, Peng J, Liang Y, Yang J, Bai X, Hao XY, et al. Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat Prod Res*. 2011;25(15):1418–22. <https://doi.org/10.1080/14786410802496911>
5. Liu Z, Mi Z, Wang P, Chang S, Han N, Yin J. Two new alkaloids from the tubers of *Corydalis ambigua* subsp. *amurensis* and their anti-proliferative activity. *Nat Prod Res*. 2020;34(23):3305–12. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1566821>
6. Yao HN, Peng ZT, Zhang YF, Liu DF, Huang BF, Tu PF, et al. Alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Corydalis racemosa* (Thunb.) Pers. *Nat Prod Res*. 2021;35(22):4272–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1696796>
7. Muhammad N, Lal Shrestha R, Adhikari A, Wadood A, Khan H, Khan AZ, et al. First evidence of the analgesic activity of govaniadine, an alkaloid isolated from *Corydalis gowaniana* Wall. *Nat Prod Res*. 2015;29(5):430–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.951933>
8. Tong S, Yan J, Lou J. Preparative isolation and purification of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by high-speed counter-current chromatography. *J Liq Chrom Relat Technol*. 2005;28(18):2979–89. <https://doi.org/10.1080/10826070500274638>
9. Jiang L, Li M, Zhao F, Chu S, Zha L, Xu T, et al. Molecular identification and taxonomic implication of herbal species in genus *Corydalis* (Papaveraceae). *Molecules*. 2018;23(6):1393. <https://doi.org/10.3390/molecules23061393>
10. Khodorova NV, Miroslavov EA, Shavarda AL, Laberche J, Boitel-Conti M. Bud development in *Corydalis* (*Corydalis bracteata*) requires low temperature: a study of developmental and carbohydrate changes. *Ann Bot*. 2010;105(6):891–903. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq076>
11. Wang L, Zhang Y, Wang Z, Gong N, Kweon TD, Vo B, et al. The antinociceptive properties of the *Corydalis yanhusuo* extract. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162875>
12. Zhang J, He S, Wang J, Wang C, Wu J, Wang W, et al. A review of the traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology of *Corydalis yanhusuo*. *Nat Prod Commun*. 2020;15(9):1934578X2095775. <https://doi.org/10.1177/1934578X20957752>
13. Zhang S, Ouyang F, Wang C, Gu M. Fingerprint of tablet of *Corydalis tuber* for alleviating pain by HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2007;31(3):452–64. <https://doi.org/10.1080/10826070701780870>
14. Chlebek J, Korabecny J, Dolezal R, Stepankova S, Perez DI, Hostalkova A, et al. In vitro and in silico acetylcholinesterase inhibitory activity of thalicttricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Molecules*. 2019;24(7):1340. <https://doi.org/10.3390/molecules24071340>
15. Kim YJ, Lim HS, Kim Y, Lee J, Kim BY, Jeong S-J. Neuroprotective effect of *Corydalis ternata* extract and its phytochemical quantitative analysis. *Chem Pharm Bull*. 2017;65(9):826–32. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00300>
16. Kim KH, Lee IK, Choi SU, Lee JH, Moon E, Kim SY, et al. New triterpenoids from the tubers of *Corydalis ternata*: structural elucidation and bioactivity evaluation. *Planta Med*. 2011;77(13):1555–8. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270781>
17. Guo J, Wang SB, Yuan TY, Wu YJ, Yan Y, Li L, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation. *Atherosclerosis*. 2013;231(2):384–91. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.003>
18. Chen H, Luo C, Liang J, Zhang Z, Lin G, Wu J, et al. Anti-inflammatory activity of coptisine free base in mice through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2017;811:222–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.027>
19. Friedemann T, Schumacher U, Tao Y, Leung AKM, Schröder S. Neuroprotective activity of coptisine from *Coptis chinensis* (Franch). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:827308. <https://doi.org/10.1155/2015/827308>
20. Baki PA, El-Sherei MM, Khaleel AE, Motaal AA, Abdallah HI. Aquaretic activity of *Solidago canadensis* L. cultivated in Egypt and determination of the most bioactive fraction. *JPR*. 2019;18(2):922–37. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.2390>
21. Islam M, Al-Amin M, Siddiqi MMA, Akter S, Haque MM, Sultana N, et al. Isolation of quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside from the leaves of *Azadirachta indica* and antimicrobial and cytotoxic screening of the crude extracts. *Dhaka Univ J Sci*. 2012;60(1):11–4. <https://doi.org/10.3329/dujs.v60i1.10328>
22. Bylka W, Matlawska I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Pol Pharm*. 2001;58(1):69–72. PMID: 11370291
23. Colombo ML, Bugatti C, Mossa A, Pescalli N, Piazoni L, Pezzoni G, et al. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Farmaco*. 2001;56(5–7):403–9. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01121-1](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01121-1)

Вклад авторов. В.И. Топоркова – выделение и анализ индивидуальных соединений из лекарственного растительного сырья; А.О. Понкратова – выделение и анализ индивидуальных соединений из лекарственного растительного сырья; А.К. Уэйли – сбор и интерпретация результатов ЯМР-спектроскопии; В.Г. Лужанин – написание текста рукописи; М.Ю. Гончаров – идея, планирование исследования, ответственность за все аспекты работы. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарности. ЯМР-данные были получены с использованием оборудования ресурсного центра «Магнитно-резонансные методы исследования» Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Valeria I. Toporkova— isolation and analysis of individual compounds from the herbal substance; Anastasiia O. Ponkratova— isolation and analysis of individual compounds from the herbal substance; Andrei K. Whaley—obtaining and interpretation of NMR data; Vladimir G. Luzhanin— writing of the paper; Mikhail Yu. Goncharov—elaboration of the idea of the study, planning of the study, carrying responsibility for all aspects of the study. All the authors took part in the discussion of the results.

Acknowledgements. NMR data were obtained using the equipment of the Magnetic Resonance Research Centre of St. Petersburg State University.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Топоркова Валерия Игоревна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5985-5156>
toporkova.valeriya@pharminnotech.com

Понкратова Анастасия Олеговна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>
anastasiya.ponkratova@yandex.ru

Уэйли Андрей Кеннет.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>
9968639@gmail.com

Лужанин Владимир Геннадьевич, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>
vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

Гончаров Михаил Юрьевич, д-р биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>
mikhail.goncharov@pharminnotech.com

Valeria I. Toporkova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5985-5156>
toporkova.valeriya@pharminnotech.com

Anastasiia O. Ponkratova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>
anastasiya.ponkratova@yandex.ru

Andrei K. Whaley.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>
9968639@gmail.com

Vladimir G. Luzhanin, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>
vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

Mikhail Yu. Goncharov, Dr. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>
mikhail.goncharov@pharminnotech.com

Статья поступила 01.12.2021

После доработки 26.01.2022

Принята к печати 04.03.2022

Article was received 1 December 2021

Revised 26 January 2022

Accepted for publication 4 March 2022