



Оригинальная статья / Research article

Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L.

А. О. Понкратова^{1*}, А. К. Уэйли¹, А. А. Орлова¹, С. Н. Смирнов², Е. Б. Серебряков², В. Г. Лужанин¹

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

*Контактное лицо: Понкратова Анастасия Олеговна. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. А. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-7836-5785>;
С. Н. Смирнов – <https://orcid.org/0000-0003-2042-337X>; Е. Б. Серебряков – <https://orcid.org/0000-0002-1021-6871>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 04.03.2021

Статья принята в печать: 13.04.2021

Статья опубликована: 25.05.2021

Резюме

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются широко распространенной группой заболеваний по всему миру, ежегодно поражающей более 150 миллионов человек. У порядка 30 % пациентов, перенесших первичную инфекцию, ИМП переходит в хроническую форму. Лекарственные препараты растительного происхождения наряду с синтетическими диуретиками и антибиотиками широко применяются для профилактики и лечения ИМП, а поиск и выделение индивидуальных веществ из растительного сырья, обладающих фармакологическим потенциалом, является актуальным. Настоящее исследование посвящено выделению индивидуальных соединений, относящихся к классу проантоцианидинов, из надземной части водяники черной (*Empetrum nigrum* L.).

Цель. Разработать методики выделения индивидуальных проантоцианидинов из надземной части *Empetrum nigrum* и установить химическую структуру выделенных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа.

Материалы и методы. Побеги *Empetrum nigrum* были собраны в районе питомника лекарственных растений Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (далее – СПбХФУ) (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года. Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором, а также методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на приборе SAMAG (Швейцария). Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективностью, а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенный спектрофотометрическим детектором. Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами 1D и 2D ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия).

Результаты и обсуждение. С помощью разработанных методик из побегов *Empetrum nigrum* выделено три индивидуальных соединения, относящихся к классу проантоцианидинов типа А. Согласно данным ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, соединение **1** представляет собой эпикатехин-(2β → О → 5, 4β → 6)-эпикатехин с крайне редким типом межмономерной связи (2β → О → 5, 4β → 6). Соединения **2** и **3** представляют собой эпикатехин-(2β → О → 7, 4β → 8)-эпикатехин (процианидин А2) и эпикатехин-(2β → О → 7, 4β → 8)-катехин (процианидин А1) соответственно. Все индивидуальные соединения (**1-3**) обнаружены и выделены из *Empetrum nigrum* впервые.

Заключение. В результате исследования из надземной части *Empetrum nigrum* были выделены три индивидуальных соединения (проантоцианидины типа А), которые ранее в *Empetrum nigrum* не были обнаружены. Предполагается последующее исследование биологической активности выделенных соединений.

Ключевые слова: водяника черная, *Empetrum nigrum*, конденсированные танины, проантоцианидины типа А, вторичные метаболиты

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. О. Понкратова, А. А. Орлова выполнили экспериментальную часть по выделению индивидуальных соединений. С. Н. Смирнов выполнил исследования методом ЯМР-спектроскопии. Е. Б. Серебряков выполнил исследование методом масс-спектрометрии. А. К. Уэйли интерпретировал результаты ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. В. Г. Лужанин руководил научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):80–86. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86>

Isolation and Structure Elucidation of Three Dimeric A-type Proanthocyanidins from *Empetrum Nigrum* L.

Anastasiia O. Ponkratova^{1*}, Andrei K. Whaley¹, Anastasia A. Orlova¹, Sergey N. Smirnov², Evgeny B. Serebryakov², Vladimir G. Luzhanin¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

² St Petersburg University, Saint Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya emb., Saint-Petersburg, 199034, Russia

*Corresponding author: Anastasiia O. Ponkratova. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

© Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г., 2021

© Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G., 2021

ORCID: Anastasiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>;
Anastasia A. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-7836-5785>; Sergey N. Smirnov – <https://orcid.org/0000-0003-2042-337X>;
Evgeny B. Serebryakov – <https://orcid.org/0000-0002-1021-6871>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Received: 04.03.2021 Revised: 13.04.2021 Published: 25.05.2021

Abstract

Introduction. Urinary tract infections are a common group of diseases worldwide, affecting more than 150 million people every year. In about 30 % of patients with initial infection, UTI becomes chronic. Herbal medicines, along with synthetic diuretics and antibiotics, are widely used for the prevention and treatment of UTIs, which makes the search and isolation of various substances from plant materials an important task. The present study is devoted to the isolation of compounds belonging to the class of proanthocyanidins from the aerial part of the black crowberry (*Empetrum nigrum* L.).

Aim. Method development for the isolation of individual dimeric type A proanthocyanidins from the aerial part of *Empetrum nigrum* and the elucidation of their chemical structure using modern physicochemical methods of analysis.

Materials and methods. Shoots of *Empetrum nigrum* were collected next to the Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University Nursery Garden of Medicinal Plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozerskoe highway, 38 km) in August 2019. Fraction analysis was performed through analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Prominence LC-20 (Shimadzu corp., Japan) equipped with a SPD-M20A diode-array detector, as well as by high performance thin layer chromatography (HPTLC) using a CAMAG HPTLC system (Switzerland). The isolation of compounds was carried out by open column chromatography using sorbents with different selectivity, as well as by preparative HPLC using a Smartline system (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structures of the isolated compounds were established by 1D and 2D NMR experiments (Bruker Avance III 400 MHz, Germany), as well as high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Germany).

Results and discussion. Using the developed methods, from the *Empetrum nigrum* shoots we managed to isolate and characterised three individual compounds belonging to the class of A-type proanthocyanidins. According to NMR and mass spectrometry data, compound **1** is epicatechin-(2 β → O → 5, 4 β → 6)-epicatechin, with an extremely rare type of intermonomer bond (2 β → O → 5, 4 β → 6). Compounds **2** and **3** are epicatechin-(2 β → O → 7, 4 β → 8)-epicatechin (procyanidin A2) and epicatechin-(2 β → O → 7, 4 β → 8)-catechin (procyanidin A1), respectively. All individual compounds (**1-3**) were found and isolated from *Empetrum nigrum* for the first time.

Conclusion. As a result of the research, three individual compounds (A-type proanthocyanidins) were isolated from the aerial part of *Empetrum nigrum*. All individual compounds (**1-3**) were found and isolated from *Empetrum nigrum* for the first time. Future assessment of the isolated compounds biological activity is presumed.

Keywords: black crowberry, *Empetrum nigrum*, condensed tannins, A-type proanthocyanidins, secondary metabolites

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anastasiia O. Ponkratova, Anastasia A. Orlova performed the experimental part. Sergey N. Smirnov performed the NMR experiments. Evgeny B. Serebryakov performed the HR-ESI-MS experiments. Andrei K. Whaley performed processing of the NMR-experiments and HR-ESI-MS results. Vladimir G. Luzhanin oversaw of the research. All authors took part in the discussion of the results.

For citation: Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86>

ВВЕДЕНИЕ

Водяника черная (*Empetrum nigrum* L.) представляет собой вечнозеленый кустарничек из семейства *Ericaceae*. *E. nigrum* произрастает преимущественно в Северном полушарии, включая северные европейские страны (Скандинавские страны, Великобритания), северную часть России, Японию и Китай, Гренландию и северо-восток Канады. К типичным местообитаниям данного вида относятся сфагновые болота, мохово-лишайниковые тундры и заболочиваемые хвойные леса [1]. Разнообразие вторичных метаболитов водяники черной обеспечивает широкий диапазон применения в медицине в качестве противосудорожного, церебропротективного, антиоксидантного, диуретического, противомикробного, противогрибкового [2–4] и противовоспалительного [5] средства, а также для лечения туберкулеза [6] и диареи [7]. В предыдущих фитохимических исследованиях сообщалось об обнаружении и выделении различных групп соединений, включая флавоноиды [8], бибензилы [9, 10],

9,10-дигидрофенантрены, халконы и дигидрохалконы [9, 11], а также проантоцианидины [12].

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются одними из наиболее часто встречаемых инфекций в клинической практике во всем мире. Данная группа заболеваний ежегодно выявляется у более 150 миллионов человек [13]. У порядка 30 % пациентов, перенесших первичную инфекцию, ИМП приобретает хронический характер. Большое количество побочных эффектов значительно ограничивает применение антибиотиков и диуретиков [14]. Лекарственные препараты растительного происхождения широко применяются для профилактики и лечения ИМП, а поиск и выделение индивидуальных веществ из растительного сырья, обладающих фармакологическим потенциалом, является актуальным [15]. Установлено, что проантоцианидины (конденсированные танины) типа А проявляют бактериальную антиадгезионную активность как в отношении чувствительных к антибиотикам, так и в устойчивых штаммов уропатогенных бак-

терий [16, 17]. Наряду с этим отмечается мочегонный эффект проантоцианидинов и их способность снижать уровень мочевой кислоты в сыворотке крови (антигиперурикемическая активность), вследствие чего проантоцианидины могут использоваться для лечения подагры и мочекаменной болезни [18]. Также установлено, что проантоцианидины проявляют иммуностимулирующую, противовирусную [19], противомикробную [20] и противовоспалительную [21] активности. В связи с этим выделение индивидуальных соединений, относящихся к группе проантоцианидинов, является актуальным, так как данные соединения могут являться потенциальными лекарственными кандидатами для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний мочевыделительной системы. Ранее коллективом авторов также было выделено семь индивидуальных соединений из растений, обладающих диуретической активностью [22].

Таким образом, **целью настоящего исследования** стала разработка методики выделения индивидуальных проантоцианидинов из надземной части *Empetrum nigrum* и установление химической структуры выделенных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Побеги *Empetrum nigrum* были собраны в районе питомника лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года.

Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором, при 235 и 254 нм. Применялась хроматографическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (25 см × 4,6 мм) с размером частиц 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура анализа – 40 °С. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ

0,1 % (с H₂O:CH₃CN 5:95 до H₂O:CH₃CN 0:100, по объему). Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) выполнялась на приборе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин для ВЭТСХ Merck HPTLC Silica gel 60 F254 plate (4–8 μm).

Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности – Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония) и Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Швеция), а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartlina (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Применялась препаративная хроматографическая колонка Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5 мкм). Скорость потока элюента 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1 % (с H₂O:CH₃CN 5:95 до H₂O:CH₃CN 50:50, по объему).

Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия).

Выделение индивидуальных соединений проводилось на кафедре фармакогнозии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, ЯМР-спектроскопическое и масс-спектрометрическое исследования выделенных соединений проводились на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате настоящего исследования из надземной части *Empetrum nigrum* были выделены и охарактеризованы три индивидуальных соединения, относящихся к группе проантоцианидинов типа А (1-3) (рисунок 1).

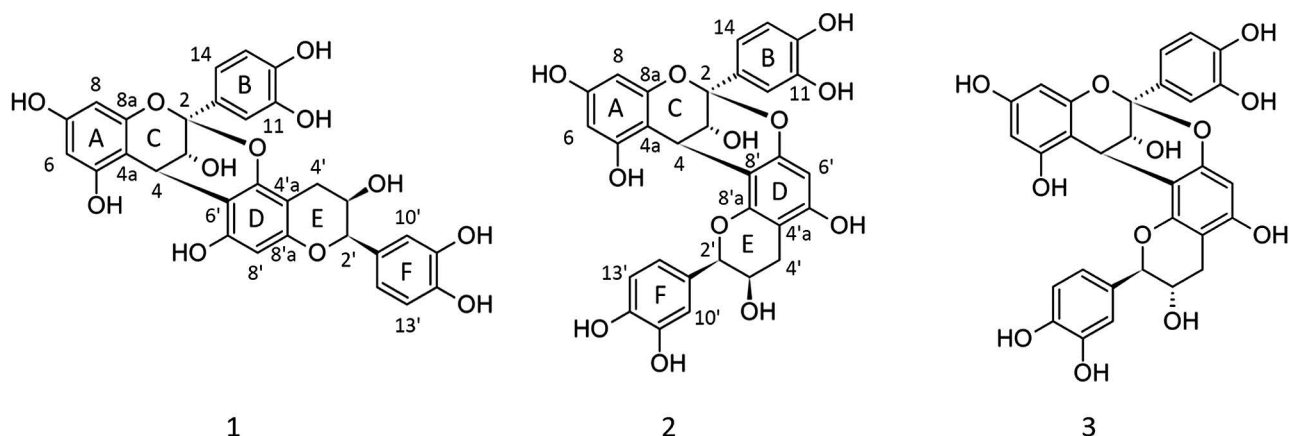


Рисунок 1. Структуры соединений 1-3

Figure 1. Structures of compounds 1-3

Перед экстракцией сырье подвергалось воздушно-тенева сушке, измельчалось и просеивалось через сито с диаметром отверстий 1 мм. 744 грамма измельченного сырья подвергалось многократной экстракции 96%-м этиловым спиртом (EtOH) (3150 мл) при комнатной температуре с использованием механической мешалки (Heidolph, Германия). Экстракция проводилась до того момента, пока полученный экстракт не становился бледным по сравнению с первоначальным. Все полученные спиртовые экстракты объединялись и выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С до объема 500 мл. К 500 мл экстракта добавляли 100 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую жидкостно-жидкостную (ЖЖ) экстракцию с равными объемами *n*-гексана. После чего к водно-спиртовому остатку добавляли 300 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую ЖЖ экстракцию с равным объемом дихлорметана (ДХМ). В заключение проводили ЖЖ экстракцию водно-спиртового остатка с равным объемом бутанола.

Бутанольную подфракцию выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 100 мл, после чего загружали на открытую стеклянную колонку, заполненную сорбентом Dianion® HP-20. Проводили градиентное элюирование с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10 % (с H₂O:96 % EtOH 100:0 до H₂O:96 % EtOH 0:100, по объему). Собранные фракции анализировались методом ВЭТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которые имели пятна с одинаковыми факторами удерживания (*R_f*) и окраской, – объединялись. Объединенные фракции выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 10 мл. Фракция, содержащая целевые соединения, загружалась на открытую колонку, заполненную сорбентом Sephadex LH-20, и подвергалась изократическому элюированию 96%-м EtOH. Полученные фракции анализировались методом ВЭТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которые имели пятна с одинаковыми факторами удерживания (*R_f*) и окраской, – объединялись. Объединенные фракции выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 10 мл. Фракция, содержащая танины, подвергалась хроматографическому разделению на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе, в результате чего были выделены: соединение **1** (*m* = 4,36 мг, *t_R* = 21,784 мин); соединение **2** (*m* = 8,12 мг, *t_R* = 18,893 мин); соединение **3** (*m* = 7,54 мг, *t_R* = 20,759 мин).

Соединения **1-3** представляют собой белые кристаллические вещества. УФ-спектр соединений имеет один максимум поглощения при 278 нм. Во всех спектрах HR-ESI-MS отображает пик молекулярных ионов [M + H]⁺ при *m/z* 577,1341 (расч. 577,1346), что соответствует молекулярной формуле C₃₀H₂₅O₁₂. Из этих данных следует, что соединения **1-3** являются изомерами.

В ¹H и COSY ЯМР-спектрах соединения **1** присутствуют три ароматические спиновые системы: AM (кольцо А), образованная 6-Н (δН 6.05 (д, 2.0 Гц) и 8-Н (δН 5.97 (д, 2.0 Гц)); АВХ (кольцо В), образованная 10-Н (δН 7.04 (д, 1.9 Гц), 13-Н (δН 6.78 (д, 8.1 Гц) и 14-Н (δН 6.84 (дд 8.1, 1.9 Гц)) и А'В'Х' (кольцо Е), образованная 10'-Н (δН 6.82 (д, 1.7 Гц)), 13'-Н (δН 6.69 (д, 8.1 Гц)) и 14'-Н (δН 6.59 (дд, 8.1, 1.7 Гц)). Синглет 8'-Н протона кольца D обнаруживался при δН 6.09. Также имеются две алифатические спиновые системы – одна из них в кольце С, состоящая из протонов Н-3 (δН 3.85 (т, 4.2, 3.1 Гц)), Н-4 (δН 4.08 (д, 3.1 Гц) и протона гидроксильной группы 3-ОН (δН 5.53 (д, 4.2 Гц)). Вторая алифатическая спиновая система наблюдалась в кольце F и состоит из протонов 2'-Н (δН 4.70, уш. с.), 3'-Н (δН 3.96, м), 4'α-Н (δН 2.81 (дд, 17.1, 3.2 Гц)), 4'β-Н (2.45, м) и протона гидроксильной группы 3'-ОН (δН 4.70 (д, 5.0 Гц)). Указанные данные свидетельствуют о том, что соединение **1** является димером, состоящим из остатков эпикатехина и катехина.

¹H ЯМР-спектр соединения **1** также содержал синглеты семи фенольных ОН протонов, отнесенных к положениям 5-ОН (δН 9.39, с), 7-ОН (δН 9.51, с), 11-ОН (δН 9.08, с), 12-ОН (δН 9.21, с), 7'-ОН (δН 9.77, с), 11'-ОН (δН 8.90, с), 12'-ОН (δН 8.98, с) через корреляции NOESY. Сигналы протонов двух фенольных гидроксильных групп в положениях 5 и 7' были в одинаковой степени уширены в сравнении с остальными, что указывает на наличие процесса обмена протонами между ними.

NOESY-корреляции протонов 4'α-Н и 4'β-Н кольца F с ароматическими протонами 10-Н и 14-Н кольца В наряду с NOESY корреляциями ароматического протона 8'-Н с протонами фенольных гидроксильных групп в положениях 5, 7' подтверждают наличие системы 2β → О → 5, 4β → 6 связей между остатком эпикатехина и катехина (рисунок 2). Факт уширения пика фенольной группы ОН в положениях 5 и 7' дополнительно подтверждает предложенную структуру. Таким образом, в результате анализа ЯМР- и масс-спектров данное соединение было идентифицировано как димерный процианидин – эпикатехин-(2β → О → 5, 4β → 6)-эпикатехин с крайне редким типом межмономерной связи (2β → О → 5, 4β → 6), ранее выделенное только из бобов какао [23].

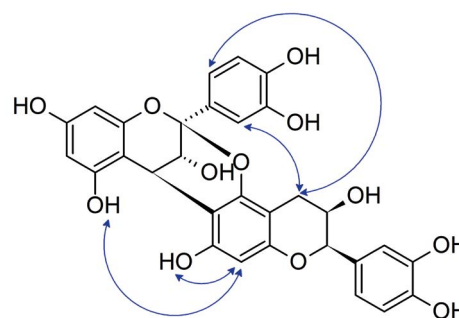


Рисунок 2. Ключевые NOESY-корреляции для соединения **1**
Figure 2. Key NOESY correlations of compound **1**

В ^1H и COSY ЯМР-спектрах соединения **2** наблюдались три ароматические спиновые системы: AM (кольцо A), образованная 6-Н (δH 6.03 (д, 2.0 Гц) и 8-Н (δH 5.92 (д, 2.0 Гц)); ABX (кольцо B), образованная 10-Н (δH 6.96, уш. с.), 13-Н (δH 6.78, м) и 14-Н (δH 6.78, м) и A'B'X' (кольцо E), образованная 10'-Н (δH 7.18 (д, 1.2 Гц)), 13'-Н (δH 6.73 (д, 8.5 Гц)) и 14'-Н (δH 6.81 (дд, 8.5, 1.2 Гц)). Синглет 6'-Н протона кольца D обнаруживался при δH 6.12. Присутствуют также две алифатические спиновые системы – одна из них в кольце C, состоящая из протонов Н-3 (δH 3.77 (т, 4.0, 2.8 Гц)), Н-4 (δH 4.26 (д, 2.8 Гц) и протона гидроксильной группы 3'-ОН (δH 5.22 (д, 4.0 Гц)); вторая алифатическая спиновая система наблюдалась в кольце F и состоит из протонов 2'-Н (δH 4.74, уш. с.), 3'-Н (δH 3.78, дд, 4.1, 4.0), 4' α -Н (δH 2.70 (дд, 17.3, 4.0 Гц)), 4' β -Н (2.53, м) и протона гидроксильной группы 3'-ОН (δH 4.65 (д, 4.1 Гц)). Указанные данные свидетельствуют о том, что соединение **2** (по аналогии с соединением **1**) является димером, состоящим из остатков эпикатехина.

^1H ЯМР-спектр соединения **2** содержал синглеты протонов семи фенольных гидроксиллов, отнесенных к положениям 5-ОН (δH 8.59, с), 7-ОН (δH 9.36, с), 11-ОН (δH 9.04, с), 12-ОН (δH 9.15, с), 5'-ОН (δH 9.66, с), 11'-ОН (δH 9.01, с), 12'-ОН (δH 8.86, с) через корреляции NOESY.

HMBC-корреляции от 4 α -Н до 7'-С (δC 150.6), 8'-С (δC 106.0) и 8 α '-С (δC 151.5) подтвердили наличие (2 β \rightarrow О \rightarrow 7, 4 β \rightarrow 8) связи между субъединицами. Таким образом, в результате анализа ЯМР- и масс-спектров данное соединение было идентифицировано как процианидин A2 – эпикатехин-(2 β \rightarrow О \rightarrow 7, 4 β \rightarrow 8)-эпикатехин (рисунок 3).

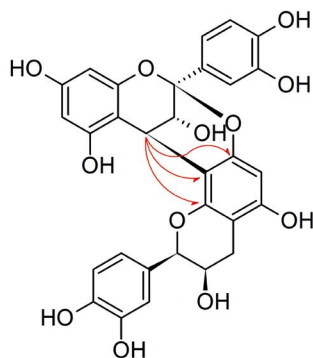


Рисунок 3. Ключевые HMBC-корреляции для соединения **2**

Figure 3. Key HMBC correlations of compound **2**

ЯМР-спектры соединения **3** практически полностью совпадали с ЯМР-спектрами соединения **2**. Единственную отличительную черту составляли протоны кольца F – 2'-Н (δH 4.42 (д, 8.3 Гц)), 3'-Н (δH 3.67, м), 4' α -Н (δH 2.72 (дд, 16.2, 6.0 Гц)) и 4' β -Н (δH 2.37 (дд, 16.2, 8.7 Гц)). На основании констант спин-спинового взаимодействия и литературных данных было установлено, что соединение **3** представляет собой процианидин A1 – эпикатехин-(2 β \rightarrow О \rightarrow 7, 4 β \rightarrow 8)-катехин [24].

ЯМР-спектры соединений **1-3** представлены в таблице 1.

Таблица 1. Данные ЯМР соединений 1-3

Table 1. NMR data of compounds 1-3

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2		Соединение 3 Compound 3
	δH (J в Гц) (δH (J, Hz))	δH (J в Гц) (δH (J, Hz))	δC	δH (J в Гц) (δH (J, Hz))
2			98.7	
3	3.85 (т, 4.2, 3.1) 3.85 (t, 4.2, 3.1)	3.77 (дд, 2.8, 4.0) 3.77 (dd, 2.8, 4.0)	66.6	3.75 (т, 4.1, 3.0) 3.75 (t, 4.1, 3.0)
4	4.08 (д, 3.1 Hz) 4.08 (d, 3.1 Hz)	4.26 (д, 2.8) 4.26 (d, 2.8)	27.9	4.17 (д, 3.0) 4.17 (d, 3.0)
4 α			102.7	
5			156.6	
6	6.05 (д, 2.0) 6.05 (d, 2.0)	6.03 (д, 2.0) 6.03 (d, 2.0)	96.9	6.03 (д, 2.1) 6.03 (d, 2.1)
7			156.9	
8	5.97 (д, 2.0) 5.97 (d, 2.0)	5.92 (д, 2.0) 5.92 (d, 2.0)	94.8	5.90 (д, 2.1) 5.90 (d, 2.1)
8 α			152.9	
9			131.6	
10	7.04 (д, 1.9) 7.04 (d, 1.9)	6.96 (ушс) 6.96 (brs)	115.4	7.06 (д, 1.4) 7.06 (d, 1.4)
11			145.5	
12			145.6	
13	6.78 (д, 8.1) 6.78 (d, 8.1)	6.78 (м) 6.78 (m)	115.4	6.71 (д, 8.2) 6.71 (d, 8.2)
14	6.84 (дд, 8.1, 1.9) 6.84 (dd, 8.1, 1.9)	6.78 (м) 6.78 (m)	118.2	6.66 (дд, 8.2, 1.4) 6.66 (dd, 8.2, 1.4)
3'-ОН	5.53 (д, 4.2) 5.53 (d, 4.2)	5.22 (д, 4.0) 5.22 (d, 4.0)		5.21 (д, 4.1) 5.21 (d, 4.1)
5-ОН	9.39 (с) 9.39 (s)	8.59 (с) 8.59 (s)		8.72 (с) 8.72 (s)
7-ОН	9.51 (с) 9.51 (s)	9.36 (с) 9.36 (s)		9.35 (с) 9.35 (s)
11-ОН	9.08 (с) 9.08 (s)	9.04 (с) 9.04 (s)		9.02 (с) 9.02 (s)
12-ОН	9.21 (с) 9.21 (s)	9.15 (с) 9.15 (s)		9.17 (с) 9.17 (s)
2'	4.70 (ушс) 4.70 (brs)	4.74 (ушс) 4.74 (brs)	79.8	4.43 (д, 8.3) 4.43 (d, 8.3)
3'	3.96 (м) 3.96 (m)	3.78 (дд, 4.0, 4.1) 3.78 (dd, 4.0, 4.1)	65.2	3.67 (м) 3.67 (m)
4' α	2.81 (дд, 17.1, 3.2) 2.81 (dd, 17.1, 3.2)	2.70 (дд, 17.3, 4.0) 2.70 (dd, 17.3, 4.0)	30.0	2.72 (дд, 16.2, 6.0) 2.72 (dd, 16.2, 6.0)
4' β	2.45 (м) 2.45 (m)	2.53 (м) 2.53 (m)		2.37 (дд, 16.2, 8.7) 2.37 (dd, 16.2, 8.7)
4' α			101.3	

Окончание табл. 1

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2		Соединение 3 Compound 3
	δH (J в Гц) (δH (J, Hz))	δH (J в Гц) (δH (J, Hz))	δC	δH (J в Гц) (δH (J, Hz))
5'			155.5	
6'		6.12 (c) 6.12 (s)	95.0	6.12 (c) 6.12 (s)
7'			150.6	
8'	6.09 (c) 6.09 (s)		106.0	
8'a			151.5	
9'			130.6	
10'	6.82 (д, 1.7) 6.82 (d, 1.7)	7.18 (д, 1.2) 7.18 (d, 1.2)	115.9	6.94 (м) 6.94 (m)
11'			144.9	
12'			144.9	
13'	6.69 (д, 8.1) 6.69 (d, 8.1)	6.73 (д, 8.5) 6.73 (d, 8.5)	115.4	6.76 (м) 6.76 (m)
14'	6.59 (дд, 8.1, 1.7) 6.59 (dd, 8.1, 1.7)	6.81 (дд, 8.5, 1.2) 6.81 (dd, 8.5, 1.2)	118.7	6.76 (м) 6.76 (m)
3'-ОН	4.70 (д, 5.0) 4.70 (d, 5.0)	4.65 (д, 4.1) 4.65 (d, 4.1)		5.03 (д, 6.0) 5.03 (d, 6.0)
5'-ОН	–	9.66 (c) 9.66 (s)		9.76 (c) 9.76 (s)
7'-ОН	9.77 (c) 9.77 (s)	–		–
11'-ОН	8.90 (c) 8.90 (s)	9.01 (c) 9.01 (s)		9.16 (c) 9.16 (s)
12'-ОН	8.98 (c) 8.98 (s)	8.86 (c) 8.86 (s)		8.85 (c) 8.85 (s)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования были разработаны методики выделения индивидуальных проантоцианидинов типа А из наземной части *Empetrum nigrum*, с помощью которых были выделены и охарактеризованы три процианидина. Согласно данным одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии высокого разрешения, соединение **1** представляет собой димерный процианидин – эпикатехин-(2β → О → 5, 4β → 6)-эпикатехин с крайне редким типом межмономерной связи (2β → О → 5, 4β → 6). Соединения **2** и **3** представляют собой процианидин А2 – эпикатехин-(2β → О → 7, 4β → 8)-эпикатехин и процианидин А1 – эпикатехин-(2β → О → 7, 4β → 8)-катехин соответственно. Соединения **1-3** выделены из растений рода *Empetrum* впервые. В дальнейшем предполагается исследование биологической активности выделенных индивидуальных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

- Kubitzki K., ed. Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. V. 6. In: The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer; 2004. P. 145–194. DOI: 10.1007/978-3-662-07257-8.

- Huttunen S., Toivanen M., Arkkio S., Ruponen M., Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytotherapy Research*. 2011;25(1):122–127. DOI: 10.1002/ptr.3240.
- Kim K. C., Lee I. K., Kang K. A., Kim B. J., Kim D., Moon J. Y., Yoo B. S., Hyun J. W. *Empetrum nigrum* var. japonicum extract suppresses γ-ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(1):161–170. DOI: 10.1142/S0192415X11008725.
- Nohynek L. J., Alakomi H.-L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K.-M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1):18–32. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_4.
- Hyun T. K., Kim H.-C., Ko Y.-J., Kim J.-S. Antioxidant, α-glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (*Empetrum nigrum* var. japonicum). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(2):181–188. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.02.008.
- Matsuura H., Saxena G., Farmer S., Hancock R., Towers G. Antibacterial and antifungal compounds from *Empetrum nigrum*. *Planta Medica*. 1995;61(6):580. DOI: 10.1055/s-2006-959382.
- Moerman D. E. Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. Timber Press: Portland; 2009. 799 p.
- Jurikova T., Mlcek J., Skrovankova S., Balla S., Sochor J., Baron M., Sumczynski D. Black crowberry (*Empetrum nigrum* L.) flavonoids and their health promoting activity. *Molecules*. 2016;21(12):1685. DOI: 10.3390/molecules21121685.
- Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A New Bibenzyl and 9,10-Dihydrophenanthrene Derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry Letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
- Jarevång T., Nilsson M.-Ch., Wallstedt A., Oldham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
- Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica Acta*. 1992;105(4):300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00302.x.
- Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., de Mejia E. G., Rasikin I., Lila M. A. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(7):3884–3900. DOI: 10.1021/jf902693r.
- Öztürk R., Murt A. Epidemiology of urological infections: a global burden. *World Journal of Urology*. 2020;38(11):2669–2679. DOI: 10.1007/s00345-019-03071-4.
- Stamm W. E., Norrby S. R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infections Disease*. 2001;183(1):S1–S4. DOI: 10.1086/318850.
- Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А. Разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3(24):64–67.
- Howell A. B. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007;51(6):732–737. DOI: 10.1002/mnfr.200700038.
- Howell A. B. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002;42(3):273–278. DOI: 10.1080/10408390209351915.
- Dizaye K. Antihyperuricemic and diuretic effects of Procyanidins extracted from *Crataegus monogyna*. *Journal of Medical Sciences*. 2011;15(1):53–59. DOI: 10.15218/zjms.2011.0009.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynski C. A., Joshi S. S., Pruess H. G. Free radical and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000;148(2-3):187–197. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00210-9.
- Shan B., Cai Y.-Z., Brooks J. D., Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(14):5484–5490. DOI: 10.1021/jf070424d.

21. Torras M. A. C., Faura C. A., Schönlau F., Rohdewald P. Antimicrobial activity of Pycnogenol®. *Phytotherapy Research*. 2005;19(7):647–648. DOI: 10.1002/ptr.1662.
22. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
23. Porter L. J., Ma Z., Chan B. G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*. 1991;30(5):1657–1663. DOI: 10.1016/0031-9422(91)84228-k.
24. Lou H., Yamazaki Y., Sasaki T., Uchida M., Tanaka H., Oka S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*. 1999;51(2):297–308. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00736-5.
15. Kauhova I. E., Novikova E. K., Chachin D. A. The development conditions for extraction of the *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. Herbs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;3(24):64–67. (In Russ.)
16. Howell A. B. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007;51(6):732–737. DOI: 10.1002/mnfr.200700038.
17. Howell A. B. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002;42(3):273–278. DOI: 10.1080/10408390209351915.
18. Dizaye K. Antihyperuricemic and diuretic effects of Procyanidins extracted from *Crataegus monogyna*. *Journal of Medical Sciences*. 2011;15(1):53–59. DOI: 10.15218/zjms.2011.0009.
19. Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynski C. A., Joshi S. S., Pruess H. G. Free radical and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000;148(2-3):187–197. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00210-9.
20. Shan B., Cai Y.-Z., Brooks J. D., Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(14):5484–5490. DOI: 10.1021/jf070424d.

REFERENCES

1. Kubitzki K., ed. Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. V. 6. In: The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer; 2004. P. 145–194. DOI: 10.1007/978-3-662-07257-8.
2. Huttunen S., Toivanen M., Arkkio S., Ruponen M., Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytotherapy Research*. 2011;25(1):122–127. DOI: 10.1002/ptr.3240.
3. Kim K. C., Lee I. K., Kang K. A., Kim B. J., Kim D., Moon J. Y., Yoo B. S., Hyun J. W. *Empetrum nigrum* var. japonicum extract suppresses γ -ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(1):161–170. DOI: 10.1142/S0192415X11008725.
4. Nohynek L. J., Alakomi H.-L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K.-M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1):18–32. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_4.
5. Hyun T. K., Kim H.-C., Ko Y.-J., Kim J.-S. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowsberry (*Empetrum nigrum* var. japonicum). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(2):181–188. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.02.008.
6. Matsuura H., Saxena G., Farmer S., Hancock R., Towers G. Antibacterial and antifungal compounds from *Empetrum nigrum*. *Planta Medica*. 1995;61(6):580. DOI: 10.1055/s-2006-959382.
7. Moerman D. E. Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. Timber Press: Portland; 2009. 799 p.
8. Jurikova T., Mlcek J., Skrovankova S., Balla S., Sochor J., Baron M., Sumczynski D. Black crowsberry (*Empetrum nigrum* L.) flavonoids and their health promoting activity. *Molecules*. 2016;21(12):1685. DOI: 10.3390/molecules21121685.
9. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A New Bibenzyl and 9,10-Dihydrophenanthrene Derivative from aerial parts of crowsberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry Letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
10. Jarevång T., Nilsson M.-Ch., Wallstedt A., Oldham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
11. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica Acta*. 1992;105(4):300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00302.x.
12. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., de Mejia E. G., Raskin L., Lila M. A. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(7):3884–3900. DOI: 10.1021/jf902693r.
13. Öztürk R., Murt A. Epidemiology of urological infections: a global burden. *World Journal of Urology*. 2020;38(11):2669–2679. DOI: 10.1007/s00345-019-03071-4.
14. Stamm W. E., Norrby S. R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infections Disease*. 2001;183(1):S1–S4. DOI: 10.1086/318850.
21. Torras M. A. C., Faura C. A., Schönlau F., Rohdewald P. Antimicrobial activity of Pycnogenol®. *Phytotherapy Research*. 2005;19(7):647–648. DOI: 10.1002/ptr.1662.
22. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of Individual Compounds from the Terrestrial Parts of *Ononis Arvensis* L. and *Solidago Canadensis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):83–89. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
23. Porter L. J., Ma Z., Chan B. G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*. 1991;30(5):1657–1663. DOI: 10.1016/0031-9422(91)84228-k.
24. Lou H., Yamazaki Y., Sasaki T., Uchida M., Tanaka H., Oka S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*. 1999;51(2):297–308. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00736-5.