

Сибирь хотой (*Leonurus sibiricus* L.) ургамлын хандны тирозиназа дарангуйлах идэвхийн судалгаа

Р.Норовням¹, Virginia Kukula-Koch², Х.Даариймаа^{1*}

¹Монгол Улс, АШУУИС, Эм зүйн сургууль, Эмийн хими, ургамал судлалын тэнхим

²Польш, Люблины Анагаах ухааны их сургууль, Эм зүйн тэнхим

Цахим шуудан: norovnyam@mnmus.edu.mn, Утас: 99152201

Түлхүүр үг:

Меланогенез
L-DOPA
Допахром
Микроплейт
Диоскрининг

Товч утга:

Үндэслэл: Тирозиназа нь меланогенезийн эхний болон хурд хязгаарлагч шатанд оролцож, L-тирозиныг L-DOPA болгон гидроксилжуулах, L-DOPA-г допахинон болгон исэлдүүлэх урвалыг катализладаг зэс агуулсан фермент юм. Тирозиназын идэвхийг бууруулах байгалийн гаралтай нэгдлүүдийг илрүүлэх нь эм зүй, фармакогноз, гоо сайхны бүтээгдэхүүний судалгаанд ач холбогдолтой. *Leonurus* төрлийн ургамлууд фенолт нэгдэл, фенилпропаноид, флавоноид, иридоид, алкалоид болон дитерпеноид зэрэг олон төрлийн хоёрдогч метаболит агуулдаг бөгөөд зарим *Leonurus* зүйлээс ялгасан нэгдлүүдийн тирозиназа дарангуйлах үйлдэл өмнө нь мэдээлэгдсэн. Гэвч Сибирь хотой (*Leonurus sibiricus* L.) ургамлын центрифугийн хуваарилалтын хроматографиар ялгасан фракцуудын тирозиназа дарангуйлах идэвхийн талаарх мэдээлэл хязгаарлагдмал байна. **Зорилго:** *L. sibiricus* ургамлын бутанолын фракцыг центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн аргаар фракцлан, нимгэн үеийн хроматографийн профайлд үндэслэн нэгтгэсэн дээжүүдийн mushroom tyrosinase дарангуйлах идэвхийг үнэлж, хамгийн идэвхтэй фракцын бүлгийг тогтоох. **Арга, аргачлал:** *L. sibiricus*-ийн бутанолын фракцыг центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн системээр ялгаж нийт 82 фракц цуглуулав. Фракцуудыг нимгэн үеийн хроматографийн аргаар silica gel хавтан дээр этилацетат-метанол (85:15, v/v) хөдөлгөөнт фаз ашиглан хөгжүүлж, NPG илрүүлэгч урвалжаар боловсруулан хэт ягаан туяаны гэрэлд ажиглав. Ижил төстэй толбоны байрлал, тоо болон флуоресценцийн профайлтай дараалсан фракцуудыг нэгтгэж нийт 15 нэгтгэсэн дээж бэлтгэв. Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцууд ижил төстэй TLC профайл үзүүлсэн тул дээж 11 болгон нэгтгэсэн. Тирозиназа дарангуйлах идэвхийг mushroom tyrosinase болон L-DOPA субстрат ашигласан 96-нүхт микроплейтийн спектрофотометрийн аргаар тодорхойлов. Дээжүүдийг DMSO-д 1 мг/мл концентрациар бэлтгэж, 100 мМ фосфатын буфер (pH 6.8), 20 мкл дээж, 20 мкл mushroom tyrosinase (500 ОУН/мл)-ийг 10 минут урьдчилан инкубацалсны дараа 80 мкл 8 мМ L-DOPA нэмж 25°C-д 20 минут урвал явуулав. Допахромын үүсэлтийг Promega GloMax Explorer microplate reader-ээр 450 нм-д хэмжив. Дээжийн өөрийн шингээлтийг background хэмжилтээр засварлаж, кожик хүчил (1 мг/мл)-ийг эерэг хяналтаар ашиглав. **Үр дүн:** Нэгтгэсэн 15 дээжийн тирозиназа дарангуйлах идэвх харилцан адилгүй байв. Центрифугийн

хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцуудыг агуулсан дээж 11 хамгийн өндөр идэвх үзүүлж, тирозиназын идэвхийг 35.89% дарангуйлав. Дараагийн өндөр идэвхийг дээж 14 (21.98%), дээж 5 (20.43%), дээж 3 (16.96%) үзүүлсэн бол бусад дээжийн дарангуйлалт 0-11.73%-ийн хооронд байв. Эерэг хяналт кожик хүчил ижил нөхцөлд 59.14% дарангуйлалт үзүүлсэн. Дээж 11-ийн идэвх бусад нэгтгэсэн дээжээс өндөр байсан нь биологийн идэвхтэй нэг буюу хэд хэдэн бүрэлдэхүүн центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцын мужид харьцангуй баяжсан байж болохыг таамаглаж байна. **Дүгнэлт:** Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн фракцлалт, TLC-д суурилсан фракцуудын нэгтгэл болон mushroom tyrosinase-L-DOPA скринингийг хослуулснаар *L. sibiricus*-ийн бутанолын фракцаас тирозиназа дарангуйлах идэвх харьцангуй өндөртэй бүлгийг тогтоох боломжтой байв. Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцуудыг нэгтгэсэн дээж 11 нь цаашид LC-MS/MS шинжилгээ, биондэвхэд чиглэсэн дахин фракцлалт, нэгдэл тусгаарлалт болон концентраци-хамааралт IC₅₀ судалгаанд тэргүүлэх дээж болох боломжтой.

Үндэслэл: Тирозиназа (EC 1.14.18.1) нь меланины биосинтезийн үндсэн ферментүүдийн нэг бөгөөд монофенолын гидроксилжилт болон о-дифенолын исэлдэлтийг хурдасгадаг. Тус фермент нь меланогенезийн хурд хязгаарлагч шатанд оролцдог тул тирозиназын идэвхийг бууруулах нэгдлүүдийг байгалийн болон синтетик эх үүсвэрээс илрүүлэх судалгаа өргөн хийгдэж байна.^{1-4,15} Сүүлийн үеийн судалгаагаар ургамлын гаралтай флавоноид, фенилпропаноид, терпеноид болон бусад фенолт нэгдлүүд тирозиназ дарангуйлах идэвх үзүүлэх боломжтойг мэдээлсэн бөгөөд байгалийн эх үүсвэрээс шинэ дарангуйлагч илрүүлэхэд ферментэд суурилсан скринингийн аргуудыг өргөн ашиглаж байна.^{3,4}

Leonurus төрлийн ургамлууд биологийн идэвхт хоёрдогч метаболитоор баялаг бөгөөд дитерпеноид, алкалоид, флавоноид, фенолт нэгдэл, фенилпропаноид болон иридоид зэрэг олон бүлгийн нэгдэл агуулдаг.^{5,6} *Leonurus sibiricus* L.-ийн фитохимийн судалгаагаар фенолкарбоны хүчил, флавоноид, иридоид гликозид болон фенилпропаноидын бүлгийн нэгдлүүд илэрсэн бөгөөд HPLC-MS шинжилгээгээр 36 нэгдлийг урьдчилан тодорхойлсон байна.⁷ Мөн тус ургамлын ханданд хлорогений, кофейны, р-кумарын, ферулийн хүчил болон кверцетин зэрэг фенолт нэгдлүүд илэрсэн бөгөөд сүүлийн үеийн судалгаагаар шинэ лабдан болон ent-халиман төрлийн дитерпеноидуудыг ялган тодорхойлжээ.^{8,9}

Leonurus japonicus-аас ялгасан 10-methoxy-leonurine болон leonurine нэгдлүүд mushroom tyrosinase-ийн өрсөлдөөнт дарангуйлагч болохыг тогтоосон бөгөөд IC₅₀ утга нь тус тус 7.4±0.4 мкМ болон 12.4±0.8 мкМ байсан нь *Leonurus* төрлийн ургамлыг тирозиназын дарангуйлагчийн боломжит эх үүсвэр болгон судлах үндэслэлийг нэмэгдүүлж байна.¹⁰

Центрифугийн хуваарилалтын хроматографи (centrifugal partition chromatography) нь хатуу сорбент ашигладаггүй, хоорондоо үл холилдох хоёр шингэн фазын хооронд бодисын хуваарилагдах чанарт тулгуурладаг бөгөөд ургамлын нийлмэл хандыг фракцлах, байгалийн нэгдлийг баяжуулахад хэрэглэгддэг.^{11,12} Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийг биологийн идэвхийн үнэлгээтэй хослуулан идэвхт фракц болон нэгдлийг илрүүлэх боломжтой бөгөөд өмнөх судалгаанд центрифугийн хуваарилалтын хроматографид суурилсан ялгалтыг тирозиназа дарангуйлах идэвхийн үнэлгээтэй хослуулан хэрэглэсэн байна.¹³ Судлаач Zhang Y (2016) нарын судалгаанд центрифугийн хуваарилалтын хроматографийг UPLC/MS шинжилгээтэй хослуулж, ялгасан нэгдлүүдийн тирозиназа дарангуйлах идэвхийг үнэлсэн нь центрифугийн хуваарилалтын хроматографид суурилсан фракцлалт ба биоидэвхийн скринингийг уялдуулах боломжийг харуулсан. Иймд *L. sibiricus* ургамлын бутанолын фракцыг центрифугийн хуваарилалтын хроматографиар ялган, TLC профайлд үндэслэн нэгтгэсэн дээжүүдийн тирозиназа дарангуйлах идэвхийг харьцуулан үнэлж, дараагийн фитохимийн нарийвчилсан шинжилгээнд сонгох идэвхтэй фракцын бүлгийг тогтоох шаардлагатай гэж үзэв.

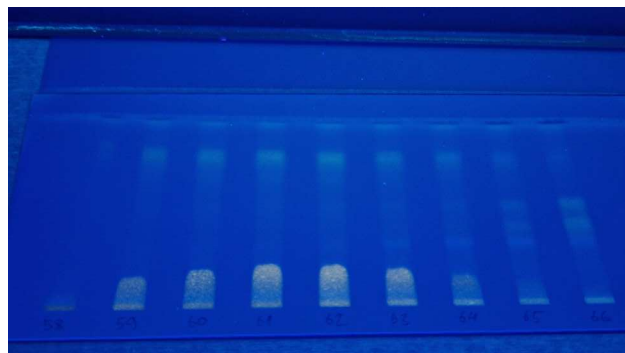
Зорилго: Сибирь хотой (*Leonurus sibiricus* L.) ургамлын бутанолын фракцыг центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн аргаар фракцлан, TLC профайлд үндэслэн нэгтгэсэн дээжүүдийн тирозиназа дарангуйлах идэвхийг үнэлж, хамгийн идэвхтэй фракцын бүлгийг тогтоох.

Арга, аргачлал:

Ургамлын материал ба дээж бэлтгэл: Судалгаанд 2025 онд Монгол Улсын Архангай аймгийн Эрдэнэбулган сумын 5-р багаас бэлтгэсэн *Leonurus sibiricus* L. ургамлын түүхий эдээс гарган авсан хандны бутанолын өтгөн фракцыг ашиглав. Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн фракцлалтад бутанолын өтгөн хандаас 0.600 г дээж авч ашигласан.

Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн фракцлалт: *L. sibiricus*-ийн бутанолын өтгөн хандаас 0.600 г авч Armen GLIDER центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн системээр шингэн-шингэний хуваарилалтын зарчимд үндэслэн фракцлав. Нийт 82 тусдаа фракц цуглуулсан.

TLC шинжилгээ ба фракцуудыг нэгтгэх: Центрифугийн хуваарилалтын хроматографиар цуглуулсан 82 фракцыг silica gel TLC хавтан дээр шинжилж, EtOAc-MeOH (85:15, v/v) хөдөлгөөнт фазад хөгжүүлэв. Хөгжүүлсний дараа NPG илрүүлэгч урвалжаар боловсруулсны дараа 254 нм-ийн хэт ягаан туяаны гэрэлд ажиглав. Үүссэн толбоны байрлал, тоо болон флуоресценцийн төстэй байдлаар дараалсан фракцуудыг бүлэглэв. Ижил төстэй TLC fingerprint бүхий фракцуудыг нэгтгэснээр нийт 15 нэгтгэсэн дээж гарган авсан. Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцуудыг дээж 11 болгон нэгтгэсэн (Зураг 1).



Зураг 1. Дээж 11 болгон нэгтгэхэд ашигласан центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59–64-р болон зэргэлдээ фракцуудын TLC профайл.

59-64-р фракцуудыг ижил төстэй хроматографийн профайлд үндэслэн нэгтгэж дээж 11 болгон бэлтгэсэн. Хөдөлгөөнт фаз: EtOAc-MeOH (85:15, v/v); илрүүлэгч: NPG.

Тирозиназа дарангуйлах идэвхийн үнэлгээ: Тирозиназа дарангуйлах идэвхийг судлаач Kukula-Koch W. (2025) нарын хэрэглэсэн mushroom tyrosinase/L-DOPA микроплейтийн аргачлалд тулгуурлан үнэлэв.¹⁴

96-нүхт микроплейтэд 100 мкл 100 мМ фосфатын буфер (pH 6.8), 20 мкл 1 мг/мл дээжийн DMSO уусмал, 20 мкл mushroom tyrosinase (500 ОУН/мл) нэмж, тасалгааны температурт 10 минут урьдчилан

инкубацилав. Дараа нь 80 мкл 8 мМ L-DOPA нэмэн урвалыг 25°C-д 20 минут явуулж, 450 нм-д Promega GloMax Explorer microplate reader-ээр шингээлтийг хэмжив. Дээжгүй хяналтад 20 мкл DMSO хэрэглэж, кожик хүчил (1 мг/мл)-ийг эерэг хяналтаар ашиглав. Дээжийн background absorbance-ийг фермент болон L-DOPA-гүй нөхцөлөөр засварлав.

Үлдэгдэл тирозиназын идэвх (%) = $[(S-S_0)/(C-C_0)] \times 100$; Тирозиназа дарангуйлалт (%) = $100 - \text{үлдэгдэл идэвх (\%)}$, энд S нь дээжтэй урвалын шингээлт, S_0 нь дээжийн background, C нь хяналтын урвалын шингээлт, C_0 нь хяналтын background болно.

Статистик боловсруулалт: Дээж тус бүрийн тирозиназа дарангуйлах идэвхийн хэмжилтийг микроплейт дээр гурван техникийн давталтаар гүйцэтгэв. Шингээлтийг 450 нм долгионы уртад хэмжиж, тирозиназа дарангуйлах идэвхийг хяналтын бүлэгтэй харьцуулан хувиар илэрхийлэв. Үр дүнг дундаж утгаар үзүүлэв.

Энэхүү судалгаа нь ургамлын гаралтай дээжид хийсэн in vitro химийн болон ферментийн туршилт бөгөөд хүн болон туршилтын амьтан оролцоогүй. Судалгааны ажлыг “Сибирь хотой ургамлын хими, технологийн судалгаа” сэдвийн хүрээнд гүйцэтгэсэн бөгөөд судалгааны ёс зүйн зөвшөөрлийг АШУҮИС-н Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2025 оны

04 дүгээр сарын 25-ны өдрийн 24-25/08-02 дугаар тогтоолоор авсан болно.

Үр дүн: Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн фракцлалт ба TLC профайлд суурилсан фракцын нэгтгэл: Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн фракцлалтаар нийт 82 фракц гарган авсан. TLC шинжилгээгээр ижил төстэй хроматографийн профайлтай дараалсан фракцуудыг нэгтгэж, нийт 15 нэгтгэсэн дээж бэлтгэв. Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцуудын NPG-ээр илэрсэн TLC профайл ойролцоо байсан тул эдгээрийг Дээж 11 болгон нэгтгэсэн. 65-66-р фракц руу шилжихэд TLC профайл өөрчлөгдөх хандлага ажиглагдсан.

Тирозиназа дарангуйлах идэвх: 15 нэгтгэсэн дээжийн скринингээр дээж 11 хамгийн өндөр идэвх үзүүлж, тирозиназын идэвхийг 35.89% дарангуйлсан. Дээж 14, дээж 5, дээж 3 нь тус тус 21.98%, 20.43%, 16.96% дарангуйлалт үзүүлэв. Эерэг хяналт кожик хүчил (1 мг/мл) 59.14% дарангуйлалт үзүүлсэн. Дээж 1, 2, 13 болон 15-ын засварласан үлдэгдэл тирозиназын идэвх 100%-иас их байсан тул дарангуйлах идэвхийг 0% гэж илэрхийлэв (Хүснэгт 1). 96-нүхт микроплейтийн A450 хэмжилтийн дэлгэцийн үр дүнг Зураг 2-т үзүүлэв.



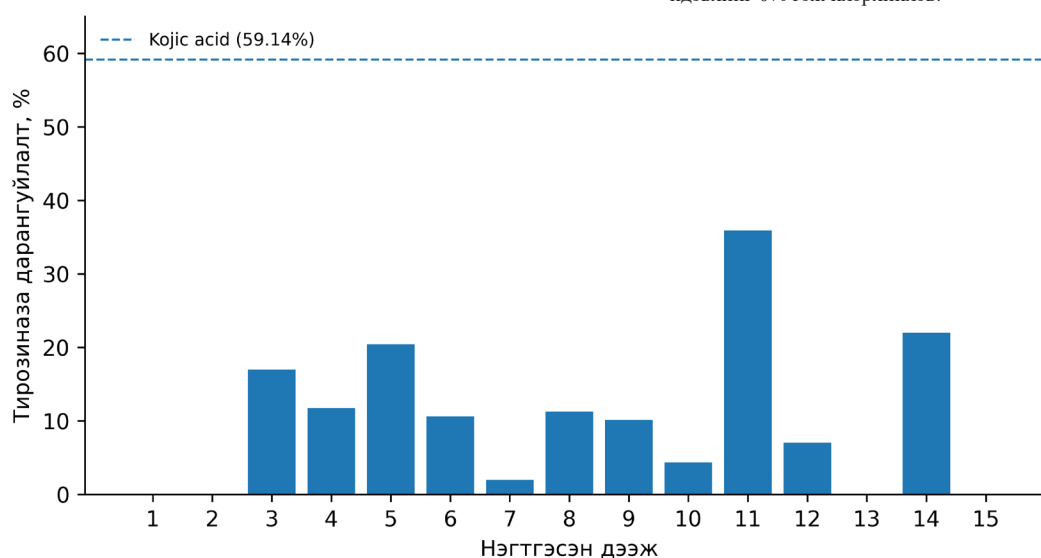
Зураг 2. 96-нүхт микроплейтийн тирозиназа-L-DOPA урвалын A450 хэмжилтийн үр дүн.

Тайлбар: Шингээлтийг Promega GloMax Explorer микроплейт уншигчаар 450 нм-д хэмжсэн.

Хүснэгт 1. TLC профайлд үндэслэн нэгтгэсэн дээжүүдийн тирозиназа дарангуйлах идэвх

Нэгтгэсэн дээж	Үлдэгдэл идэвх, %	Тирозиназа дарангуйлах идэвх, %
Дээж 1	102.31	0.00
Дээж 2	102.81	0.00
Дээж 3	83.04	16.96
Дээж 4	88.27	11.73
Дээж 5	79.57	20.43
Дээж 6	89.39	10.61
Дээж 7	98.02	1.98
Дээж 8	88.71	11.29
Дээж 9	89.84	10.16
Дээж 10	95.65	4.35
Дээж 11	64.11	35.89
Дээж 12	92.96	7.04
Дээж 13	101.72	0.00
Дээж 14	78.02	21.98
Дээж 15	116.48	0.00
Кожик хүчил (1 мг/мл)	40.86	59.14

Тайлбар: Дээж 11 нь центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59–64-р фракцуудыг нэгтгэсэн дээж болно. Үлдэгдэл тирозиназын идэвх 100%-иас давсан тохиолдолд тухайн дээжид дарангуйлах нөлөө илрээгүй гэж үзэж, тирозиназа дарангуйлах идэвхийг 0% гэж илэрхийлэв.



Зураг 3. *Leonurus sibiricus* L.-ийн 15 нэгтгэсэн дээжийн тирозиназа дарангуйлах идэвх. Тасархай шугам нь кожик хүчил (1 мг/мл)-ийн дарангуйлалтыг харуулав.

Хэлцэмж: Энэхүү судалгаанд *L. sibiricus*-ийн бутанолын фракцыг центрифугийн хуваарилалтын хроматографиар ялган нийт 82 фракц гаргаж, TLC профайлд үндэслэн 15 нэгтгэсэн дээж бэлтгэсний дараа тэдгээрийн тирозиназа дарангуйлах идэвхийг харьцуулан үнэлэв. Идэвх бүх дээжид жигд тархаагүй бөгөөд центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59–64-р фракцуудыг нэгтгэсэн Дээж 11 нь 35.89%-ийн дарангуйлалт үзүүлж, шинжилсэн дээжүүдээс хамгийн өндөр дарангуйлах идэвхийн утгатай байв. Энэ нь тирозиназа дарангуйлах үйлдэлтэй нэг буюу хэд хэдэн бүрэлдэхүүн центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн тухайн хроматографийн бүсэд харьцангуй баяжсан байх боломжийг харуулж байна.

Ургамлын гаралтай тирозиназын дарангуйлагчдын химийн бүтэц олон янз бөгөөд флавоноид, фенилпропаноид, терпеноид болон бусад фенолт нэгдлүүдийн тирозиназа дарангуйлах идэвх өмнөх судалгаануудад мэдээлэгдсэн.^{3,4} *L. sibiricus*-ийн хувьд фенолкарбоны хүчил, флавоноид, иридоид гликозид, фенилпропаноид болон дитерпеноидын бүлгийн олон нэгдэл өмнө нь тодорхойлогдсон.^{5,7-9} Иймээс Дээж 11-ийн идэвх нь эдгээр бүлгийн нэг буюу хэд хэдэн нэгдлийн агууламжтай холбоотой байх боломжтой боловч одоогийн судалгааны үр дүнгээр тодорхой нэгдэлд уг идэвхийг хамааруулах боломжгүй.

Судлаач Kim JH (2020) нар *L. japonicus*-аас ялгасан 10-methoxy-leonurine болон leonurine нь mush-

room tyrosinase-ийн өрсөлдөөнт дарангуйлагч болохыг тогтоож, IC_{50} утгыг тус тус 7.4 ± 0.4 мкМ болон 12.4 ± 0.8 мкМ гэж тодорхойлсон.¹⁰ Энэхүү үр дүн нь *Leonurus* төрлийн ургамалд тирозиназа дарангуйлах идэвхтэй нэгдлүүд агуулагдаж болохыг дэмжиж байгаа боловч бидний судалгаанд дээж 11-ийн бүрэлдэхүүнийг дан нэгдлийн түвшинд ялган тодорхойлоогүй тул 35.89%-ийн дарангуйлалтыг *leonurine* болон бусад тодорхой нэгдлийн үйлдэлтэй шууд холбон тайлбарлах боломжгүй.

Центрифугийн хуваарилалтын хроматографи нь хатуу сорбент ашигладаггүй шингэн-шингэний хуваарилалтын арга тул ургамлын нийлмэл ханд дахь нэгдлүүдийг хуваарилалтын коэффициентын ялгаанд үндэслэн фракцлах боломжтой.^{11,12} Судлаач Zhang Y (2016) нарцентрифугийнхуваарилалтынхроматографид суурилсан ялгалтыг хроматографийн шинжилгээ болон тирозиназа дарангуйлах идэвхийн үнэлгээтэй хослуулан ургамлын гаралтай идэвхт бүрэлдэхүүнийг судалсан нь ийм төрлийн bioactivity-guided approach хэрэгжих боломжтойг харуулсан.¹³ Бидний судалгаанд үүнтэй төстэй зарчмаар центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн фракцлалтын дараа TLC профайлыг ашиглан фракцуудыг нэгтгэж, дараагийн шатанд тирозиназын скрининг хийснээр идэвх харьцангуй өндөртэй хроматографийн бүсийг центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59–64-р фракцад нарийсган тогтоосон.

Судлаач Kusio-Targońska K (2025) нарын судалгаанд ургамлын гаралтай материалын тирозиназа дарангуйлах идэвхийг mushroom tyrosinase-д суурилсан спектрофотометрийн аргаар үнэлж, кожик хүчлийг эерэг хяналтаар хэрэглэсэн.¹⁴ Тус судалгаанд кожик хүчил (1 мг/мл) 57.97%-ийн дарангуйлалт үзүүлсэн бол энэхүү туршилтад ижил концентраци дахь кожик хүчил 59.14%-ийн дарангуйлалт үзүүлсэн. Хоёр үр дүн ойролцоо байгаа боловч тусдаа туршилтаар гарсан утгууд тул статистикийн шинжилгээгүйгээр хоорондоо статистикийн хувьд ижил гэж дүгнэх боломжгүй. Судалгааны нэг хязгаарлалт нь тирозиназа дарангуйлах идэвхийн скринингийг техникийн гурван давталтаар гүйцэтгэсэн бөгөөд бие даасан туршилтын давталтаар баталгаажуулаагүй явдал юм. Иймээс фракцуудын хоорондын ялгаанд статистикийн таамаглал шалгах шинжилгээ хийгээгүй. Мөн идэвх харьцангуй өндөр үзүүлсэн дээж 11-ийн химийн бүрэлдэхүүнийг LC-MS/MS аргаар хараахан тодорхойлоогүй. Цаашид центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59–64-р фракцын химийн бүрэлдэхүүнийг LC-MS/MS аргаар тодорхойлж, био идэвхэд чиглэсэн дахин фракцлалт болон нэгдэл тусгаарлалтыг хийхийн зэрэгцээ бие даасан давталт бүхий концентраци-хамааралт туршилтаар тирозиназа дарангуйлах идэвх болон IC_{50} утгыг баталгаажуулах шаардлагатай. Бусад судалгааны үр дүнтэй харьцуулахад *Leonurus* төрлийн ургамлуудад тирозиназа дарангуйлах идэвх өмнө нь мөн ажиглагдсан байна. *Leonurus cardiaca*-ийн хандуудыг үнэлсэн судалгаанд тирозиназа дарангуйлах идэвх илэрсэн бөгөөд хандууд нь цэвэршүүлсэн хандуудаас илүү өндөр идэвх үзүүлсэн байна.¹⁶ *L. japonicus*-оос тусгаарласан нэгдлүүдийн судалгаанд

7-р нэгдэл нь B16F10 меланома эсэд меланины нийлэгжилтийг тун-хамааралт байдлаар бууруулж, тирозиназын идэвхийг дунд зэрэг дарангуйлсан байна.¹⁷ Мөн Тайландын 16 эмийн ургамлын хандыг 1 мг/мл концентрацид үнэлсэн судалгаанд тирозиназын дарангуйлалт 4.80–91.51%-ийн хооронд хэлбэлзсэн бөгөөд *Clitoria macrophylla* болон *Eleutherine americana* ургамлын хандууд харгалзан $27.36 \pm 7.95\%$ ба $45.10 \pm 1.59\%$ дарангуйлалт үзүүлсэн байна.¹⁸ Энэхүү судалгааны дээж 11 нь ижил концентрацид 35.89%-ийн дарангуйлалт үзүүлсэн нь дээрх ургамлын гаралтай хандуудад мэдээлэгдсэн идэвхийн хүрээнд байна. Гэвч ургамлын түүхий эдийн хэсэг, хандлалтын арга, фермент ба субстратын концентраци, урвалын нөхцөл болон үр дүнг илэрхийлсэн арга зэргээс шалтгаалан эдгээр үзүүлэлтийг шууд тоон болон статистикийн байдлаар харьцуулах боломжгүй.

Дүгнэлт: *Leonurus sibiricus* L.-ийн бутанолын фракцыг центрифугийн хуваарилалтын хроматографиар ялган 82 фракц гаргаж, TLC профайлд үндэслэн 15 дээж болгон нэгтгэн тирозиназа дарангуйлах идэвхийг үнэлэв. Центрифугийн хуваарилалтын хроматографийн 59-64-р фракцуудыг агуулсан дээж 11 хамгийн өндөр буюу 35.89% дарангуйлалт үзүүлж, дээж 14 (21.98%), дээж 5 (20.43%), дээж 3 (16.96%) дараагийн идэвхтэй бүлгүүд байв. Дээж 11-ийг цаашид LC-MS/MS шинжилгээ, био идэвхэд чиглэсэн дахин фракцлалт, идэвхт нэгдэл тусгаарлалт болон концентраци-хамааралт IC_{50} судалгаанд тэргүүлэх дээж болгон сонгох нь зүйтэй гэж үзэж байна.

Талархал: Энэхүү судалгааны ажлын Польш Улсад гүйцэтгэсэн хэсгийг GreenCosmIn (HORIZON-MSCA Staff Exchanges, No. 101131346) төслийн хүрээнд Medical University of Lublin-ийн Department of Pharmacognosy-д хийж гүйцэтгэв. Судалгааны лабораторийн арга зүй болон центрифугийн хуваарилалтын хроматографи, ферментийн туршилтын дэмжлэг үзүүлсэн хамт олонд талархал илэрхийлэе.

Ном зүй:

1. Uchida R, Ishikawa S, Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanin pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(2):141-145.
2. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol*. 1994;46(12):982-985.
3. Li J, Li C, Peng X, Li S, Liu B, Chu C. Recent discovery of tyrosinase inhibitors in traditional Chinese medicines and screening methods. *J Ethnopharmacol*. 2023;303:115951. doi:10.1016/j.jep.2022.115951.
4. Wang Y, Xiong B, Xing S, et al. Medicinal prospects of targeting tyrosinase: a feature review. *Curr Med Chem*. 2023;30(23):2638-2671. doi:10.2174/09298673296666220915123714.
5. Sayed MA, Alam MA, Islam MS, et al. *Leonurus sibiricus* L. (honeyweed): a review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016;6(12):1076-1080.
6. Zhang RH, Liu ZK, Yang DS, Zhang XJ, Sun HD, Xiao WL. Phytochemistry and pharmacology of the genus *Leonurus*: the herb to benefit the mothers and more. *Phytochemistry*. 2018;147:167-183. doi:10.1016/j.phytochem.2017.12.016.
7. Pitschmann A, Zehl M, Heiss E, et al. Quantitation of phenylpropanoids and iridoids in insulin-sensitising extracts of *Leonurus*

- sibiricus* L. (Lamiaceae). *Phytochem Anal.* 2016;27(1):23-31. doi:10.1002/pca.2583.
8. Oliveira AS, Cercato LM, Souza MTS, et al. The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects. *J Ethnopharmacol.* 2017;206:144-151.
9. Wang C, Tian J, Liu C, et al. Labdane and ent-halimane diterpenoids with STAT3-inhibitory activity from *Leonurus sibiricus*. *Phytochemistry.* 2023;214:113802.
10. Kim JH, Leem HH, Lee GY. The guanidine pseudoalkaloids 10-methoxy-leonurine and leonurine act as competitive inhibitors of tyrosinase. *Biomolecules.* 2020;10(2):174. doi:10.3390/biom10020174.
11. Kędzierski B, Kukula-Koch W, Głowniak K. Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances—a review. *Acta Pol Pharm.* 2014;71(2):223-227.
12. Friesen JB, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF. Countercurrent separation of natural products: an update. *J Nat Prod.* 2015;78(7):1765-1796. doi:10.1021/np501065h.
13. Zhang Y, Shi C, Liu C, Yu M, Qi Y, Li S. Saponins from *Panax bipinnatifidus* Seem.: new strategy of extraction, isolation, and evaluation of tyrosinase inhibitory activity based on mathematical calculations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1039:79-87. doi:10.1016/j.jchromb.2016.10.043.
14. Kusio-Targońska K, Kosheva N, Wojtanowski KK, Gaweł-Beben K, Beis D, Kukula-Koch W. Tyrosinase inhibitors among flora of Lubelskie Region—application of bio-chromatographic approach and zebrafish model in bioactivity screening of plant material. *Molecules.* 2025;30(9):1979. doi:10.3390/molecules30091979.
15. Logesh R, Prasad SR, Chipurupalli S, Robinson N, Mohankumar SK. Natural tyrosinase enzyme inhibitors: a path from melanin to melanoma and its reported pharmacological activities. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2023;1878(6):188968. doi:10.1016/j.bbcan.2023.188968.
16. Angeloni S, Spinozzi E, Maggi F, et al. Phytochemical profile and biological activities of crude and purified *Leonurus cardiaca* extracts. *Plants (Basel).* 2021;10(2):195. doi:10.3390/plants10020195.
17. Lai KY, Hu HC, Chiang HM, et al. New diterpenes leojaponins G-L from *Leonurus japonicus*. *Fitoterapia.* 2018;130:125-133. doi:10.1016/j.fitote.2018.08.014.
18. Chaikhong K, Chumpolphant S, Rangsinth P, Sillapachaiyaporn C, Chuchawankul S, Tencomnao T, et al. Antioxidant and anti-skin aging potential of selected Thai plants: in vitro evaluation and in silico target prediction. *Plants (Basel).* 2023;12(1):65. doi:10.3390/plants12010065.

Tyrosinase inhibitory activity of *Leonurus sibiricus* L. extract

Norovnyam R¹, Kukula-Koch W², Daariimaa Kh^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy, MNUMS, Mongolia

²Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, Poland

E-mail: norovnyam@mnums.edu.mn, Tel: +976-99152201

Abstract:

Background: Tyrosinase is a copper-containing enzyme that catalyzes key initial reactions of melanogenesis, including the hydroxylation of L-tyrosine and oxidation of L-DOPA. The discovery of natural tyrosinase inhibitors remains relevant to pharmaceutical, pharmacognostic, and cosmetic research. Species of the genus *Leonurus* contain diverse secondary metabolites, including phenolic compounds, phenylpropanoids, flavonoids, iridoids, alkaloids, and diterpenoids. Selected constituents from *Leonurus* species have previously demonstrated tyrosinase inhibitory properties. However, information on the tyrosinase inhibitory activity of chromatographically fractionated *Leonurus sibiricus* L. remains limited.

Aim: To fractionate the n-butanol fraction of *L. sibiricus* by centrifugal partition chromatography (CPC), pool the obtained fractions according to their thin-layer chromatographic profiles, and evaluate the mushroom tyrosinase inhibitory activity of the pooled samples to identify the most active chromatographic region.

Materials and Methods: The n-butanol fraction of *L. sibiricus* was separated by CPC, yielding 82 individual fractions. The fractions were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel using ethyl acetate–methanol (85:15, v/v) as the mobile phase. After development, the chromatograms were derivatized with NPG reagent and visualized under UV light. Consecutive fractions showing comparable TLC band patterns and fluorescence profiles were combined into 15 pooled samples. CPC fractions 59–64 were combined as Sample 11. Tyrosinase inhibitory activity was evaluated using a 96-well microplate spectrophotometric assay with mushroom tyrosinase and L-DOPA as the substrate. Samples were prepared in DMSO at 1 mg/mL. Each reaction contained 100 mM phosphate buffer (pH 6.8), 20 µL of sample solution, and 20 µL of mushroom tyrosinase (500 U/mL). After 10 min of pre-incubation, 80 µL of 8 mM L-DOPA was added, and the reaction was maintained at 25 °C for 20 min. Dopachrome formation was measured at 450 nm using a Promega GloMax Explorer microplate reader. Sample background absorbance was corrected using enzyme- and substrate-free wells, and kojic acid at 1 mg/mL was used as a positive control.

Results: The 15 pooled samples demonstrated different levels of tyrosinase inhibitory activity. Sample 11, corresponding to CPC fractions 59–64, showed the strongest inhibitory effect, with 35.89% inhibition. Samples 14, 5, and 3 showed 21.98%, 20.43%, and 16.96% inhibition, respectively, whereas the remaining pooled samples showed lower or negligible inhibition. Kojic acid showed 59.14% inhibition under the same assay conditions. The highest activity observed in Sample 11 suggests enrichment of one or more bioactive constituents within the chromatographic region corresponding to CPC fractions 59–64.

Conclusion: The combination of CPC fractionation, TLC-guided pooling, and a mushroom tyrosinase–L-DOPA screening assay enabled localization of tyrosinase inhibitory activity within a defined fraction range of *L. sibiricus*. Sample 11, comprising CPC fractions 59–64, represents the priority material for subsequent LC-MS/MS characterization, bioactivity-guided subfractionation, isolation of active constituents, and concentration-dependent IC₅₀ evaluation.

Keywords: Melanogenesis, L-DOPA, Dopachrome, Microplate, Bioactivity screening