

На правах рукописи

Неретина
Ольга Владимировна

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
КОПЕЕЧНИКА ЩЕТИНИСТОГО
(*Hedysarum setigerum* Turcz. ex Fisch. Et Meyer)

02.00.03. - Органическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук -



Иркутск - 2004

Работа выполнена в Иркутском государственном техническом университете

Научный руководитель: Кандидат химических наук, ведущий
научный сотрудник, доцент
Луцкий Владислав Илларионович

Научный консультант: Доктор химических наук
Семенов Аркадий Алексеевич

Официальные оппоненты: Доктор химических наук, профессор
Каницкая Людмила Васильевна

Кандидат химических наук, доцент
Финкельштейн Борис Львович

Ведущая организация: Тихоокеанский Институт
Биоорганической химии (ТИБОХ)

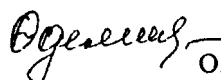
Защита состоится " 24 " июня 2004 года в 10⁰⁰ часов на заседании
Диссертационного совета Д 212.074.06 по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата химических наук при Иркутском Государственном
Университете по адресу: 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 126.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Иркутского
государственного университета

Отзывы и замечания на автореферат просим направлять по адресу: 664003,
Иркутск-3, ул. Карла Маркса 1, ИГУ, ученому секретарю Эдельштейн О.А.

Автореферат разослан "17" мая 2004 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета, к. х. н., доцент


О.А. Эдельштейн

Общая характеристика работы

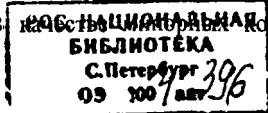
Актуальность работы. Химии принадлежит ведущая роль в деле создания новых лекарств. В последнее десятилетие, несмотря на огромное количество синтетических фармацевтических средств, неуклонно возрастает интерес к препаратам растительного происхождения, обладающим эффективным действием.

Одна из наиболее актуальных и нерешенных проблем медицины — лечение внутриклеточных инфекций. В настоящее время, практически нет надежных способов борьбы с такими инфекциями, как гепатит С и хламидиоз. Тем не менее, в народной медицине' накоплен значительный положительный опыт борьбы с заболеваниями вирусной природы с использованием лекарственных растений, в частности, растений рода *Hedysarum* (копеечник). Противовирусное действие копеечников секции *Obscura* обуславливает гликозилированный ксантон - мангиферин. Растения рода *Hedysarum* других секций (*Fruticosa* В. Fedtsch, *Spinosissima* В. Fedtsch., *Multicaulia* Boiss, *Crinifera* Boiss., *Subacaulia* Boiss), по литературным данным не содержащие мангиферин, также обладают противовирусным действием. Поэтому одной из актуальных задач является исследование химического состава копеечников этих секций и выявление вторичных метаболитов с противовирусным действием.

Целями работы являются: исследование химического состава и установление физико-химическими и спектральными методами структуры соединений, выделенных из наземной части копеечника щетинистого; изучение закономерностей фрагментации, выделенных гликозидов флавоноидов, «мягкими» методами масс-спектрометрии (FAB и MALDI); выявление биологически активных веществ обуславливающих противовирусное действие копеечника щетинистого.

Научная новизна. Впервые изучен химический состав наземной части копеечника щетинистого (*Hedysarum setigerum* Turcz. ex Fisch. Et Meyer, род *Hedysarum*, секция *Multicaulia* Boiss, семейство *Fabaceae*).

Из исследуемого вида растения выделены и идентифицированы двенадцать флавоноидов: агликонов флавонолов (3) и их гликозидов (4), гликозидов флавонов (2) и метоксифлавонов (3). Несмотря на большое число химически изученных ранее видов копеечника (более 40 видов), нами впервые в роде *Hedysarum* обнаружена группа флавонов. Из них один (необудоффицид) является вторым примером обнаружения этого соединения в природе. В



составе *Hedysarum setigerum* идентифицированы карбоциклический лигнан, тетрагидронафталинового и алкалоид протоберберинового типов, что является первым примером выделения представителей этих химических классов из растений рода *Hedysarum*. Среди ароматических соединений растения также идентифицированы 2 гидроксibenзойные кислоты.

Изучены стеринны продуцируемые копеечником щетинистым. Идентифицированы четыре стерина, два из которых впервые выделены из растений рода *Hedysarum*.

На основании полученных FAB⁺ и MALDI⁺ масс-спектров флавоноидов (9 соединений) выдвинуты следующие предположения по закономерности фрагментации флавоноидов в рамках этих методов: в FAB⁺ масс-спектрах гликозидов флавоноидов отсутствие 100% иона, соответствующего отрыву внутренней углеводной единицы, указывает на принадлежность флавоноидов к флавонам и флавонолам; отрыв терминального углеводного остатка вместе с атомом кислорода гликозидной связи наблюдается только в спектрах рамнопиранозил-(1→6)-глюкопиранозидов (рутинозидов), а не рамнопиранозил-(1→2)-глюкопиранозидов (неогесперидозидов).

Выявлены компоненты растения, обуславливающие противовирусное действие копеечника щетинистого, на основе которых планируется создание средства для борьбы с вирусными инфекциями.

Апробация результатов. Материалы работы представлены на конференции молодых ученых Иркутского научного центра СО РАН и вузов Иркутска, Иркутск, 2001; П Всероссийской конференции по химии и технологии растительных веществ, Казань, 2002; Международной научной конференции по химии, технологии и медицинских аспектах природных соединений, Алматы, Казахстан, 2003.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 1 схему, 20 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 152 цитируемых работы.

Используемые сокращения. 1D и 2D ЯМР - одно- и двумерный ядерный магнитный резонанс, ЯЭО - ядерный эффект Оверхаузера, HR-МС - масс-спектрометрия

высокого разрешения, FAB⁺-МС - масс-спектрометрия с ионизацией бомбардировкой быстрыми атомами (положительные ионы), MALDI⁺-МС - масс-спектрометрия с лазерной ионизацией из матрицы, ESI⁺-МС - масс-спектрометрия с ионизацией электро-спреем, ДЭАЭ - диэтиламиноэтилцеллюлоза.

Основное содержание работы

В литературном обзоре систематизированы сведения по химическому составу и фармакологическим свойствам растений рода копеечник. Поскольку при химическом изучении наземной части копеечника щетинистого большинство выделенных соединений относятся к гликозидам флавоноидов, в специальном разделе обзора рассмотрены особенности масс-спектральной фрагментации нелетучих гликозидов флавоноидов с применением современных масс-спектрометрических методов, использующих «мягкие» способы ионизации - FAB и MALDI.

1. Химическое изучение соединений *H. setigerum*

Предметом химического изучения данной работы служила наземная часть копеечника щетинистого. Выделение веществ осуществляли из сконцентрированного водно-метанольного экстракта растения комбинацией хроматографических приемов на различных сорбентах (полиамид, силикагель, сервацел ДЭАЭ в ОН⁺ в форме, сефадексы LH-20-100, G-10) при различных вариациях элюентных систем (вода-метанол, хлороформ-метанол, хлороформ-метанол-вода, гексан-бензол). В итоге было идентифицировано 20 соединений, представленные флавоноидами (12), фенолокислотами (2), лигнанами (1), алкалоидами (1) и стеринами (4).

Суммарное содержание флавоноидов от массы воздушно-сухого сырья составляет около 2%, при этом флавонолы и флавоны находятся примерно в равных долях. Среди флавонолов доминируют в количественном отношении кверцетин (I), кверцитрин (II) и авикулярин (VI), минорными являются изорамнетин (III), 3-метоксикемпферол (IV), 3-0- α -L-арабинофуранозид кемпферола (V) и рутин (IX). У флавонов преобладают роифолин (VIII) и лоницерозид (X), минорные компоненты представлены небудоффицидом (VII), диосмином (XI) и линарином (XII).

Содержание стеринов в наземной части растения составляет порядка 0.09% от массы воздушно-сухого сырья. Фенолокислоты, лигнан и алкалоид относятся к минорным компонентам растения.

1.1. Флавоноидные соединения *H. setigerum*

Флавоноиды составляют доминирующую в качественном и количественном отношении группу изученных соединений копеечника щетинистого. Все флавоноиды содержат 5,7-дигидроксизамещенное кольцо А, но различаются характером и местоположением заместителей в кольце В и γ -пироновом кольце С.

Флавоноидные соединения I-XII включают агпиконы (I, III, IV), 3-0-гликозиды в случае флавонолов (II, V, VI, IX) и 7-О-гликозиды в ряду флавонов (VII, VIII, X, XI, XII). Гликозиды представлены монозидами (II, α -L-Rha_p; V, VI, α -L-Ara_f), биозидами (VIII, X, α -L-Rha_p-(1→2)- β -D-Glc_p; XI, XII, α -L-Rha_p-(1→6)- β -D-Glc_p) и триозидом (VII, α -L-Rha_p-(1→6)-[α -L-Rha_p-(1→2)]- β -D-Glc_p). Некоторые из представителей являются гомологами по степени гидроксирования (V-VI, VIII-X и XI-XII).

1.1.1. Флавоны

Из копеечника щетинистого выделено пять флавоновых гликозидов, из которых четыре являются биозидами (VIII, X, XI, XII) и один - триозидом (VII). Во всех соединениях углеводная цепь представлена β -D-глюкопиранозой и α -L-рамнопиранозой, которая является терминальной и присоединяется к глюкозе по второму или шестому положениям.

До наших исследований не было найдено в растениях рода *Hedysarum* флавоновых соединений ни в свободном, ни в гликозилированном виде. Нам впервые удалось обнаружить в составе *H. setigerum* гликозиды флавонов (роифолин VIII, лоницерозид X) и метоксифлавонов (линарин XII, диосмин XI, небудоффицид VII). Небудоффицид - единственный флавоноид идентифицированный в составе *H. setigerum* и роде *Hedysarum*, который является триозидом и имеет разветвленную углеводную цепь. До настоящего времени он был выделен только из вида *Buddleia officinalis* Maxim.

Структурный анализ гликозидов флавоноидов складывается из двух этапов, первым из которых является изучение агликона. Другим, не менее важным, а зачастую и решающим этапом исследования являются вопросы строения углеводной части молекулы, а также ее взаимосвязи с агликоном. Здесь задача сводится не только к установлению структуры, но и к стереохимическому изучению конфигурации заместителей.



$R = \alpha\text{-L-Rha}_p\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}[\alpha\text{-L-Rha}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\beta\text{-D-Glc}_p$, $R_1 = \text{H}$,
 $R_2 = \text{CH}_3$, **необудоффицид (VII)**

$R = \alpha\text{-L-Rha}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Glc}_p$, $R_1 = R_2 = \text{H}$, **роифолин (VIII)**

$R = \alpha\text{-L-Rha}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Glc}_p$, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, **лоницерозид (X)**

$R = \alpha\text{-L-Rha}_p\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glc}_p$, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, **диосмин (XI)**

$R = \alpha\text{-L-Rha}_p\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glc}_p$, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, **линарин (XII)**

Необудоффицид (VII) Этот флавоноид относится к малораспространенной группе триозидов флавоноидов. В HR-FAB масс-спектре наблюдали пик молекулярного 1 иона m/z 761.2283 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, соответствующий брутто-формуле $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_{18}\text{Na}$.

Из спектров ЯМР ^1H и ^{13}C соединения VII следовало, что его агликон имеет 5,7-дигидроксизамещенное кольцо А. Резонансные сигналы протонов Н-6 (7.02 м.д.) и Н-8 (7.08 м.д.) кольца-А в спектре ЯМР ^1H наблюдали в виде двух дублетов с КССВ 1.8 Гц. По степени окисления у-пиронового кольца С соединение VII отнесли к флавонам, поскольку в спектре присутствовал сигнал протона Н-3 в виде синглета при 6.89 м.д. В УФ-спектре соединения VII имеются также два максимума поглощения при 269 и 326 нм, характерные для флавоновой структуры. Протоны кольца В Н-2',6' и Н-3',5' проявлялись в спектре ЯМР ^1H в виде двух пар дублет дублетов при 7.97, 7.14 м.д. ($J=8.8, 1.9$ Гц), интенсивностью в два протона каждый, следовательно кольцо В имеет пара-замещение. Синглет интенсивностью в три протона при 3.70 (атом углерода в спектре ЯМР ^{13}C - 55.35) м.д. отнесли по значению ХС к ароматической метоксильной группе. Местонахождение этой группы в соединении VII по 4' положению кольца В установили из NOESY спектра, в котором присутствуют кросс-пики протонов ОНз-группы с протонами Н-3',5'. Из вышеприведенных данных следует, что агликоном соединения VII является акацетин.

В 1D и 2D ЯМР спектрах гликозида VII присутствуют резонансные сигналы аномерных протонов (**Н-1''**, **Н-1'''**, **Н-1''''**) трех углеводных единиц и соответствующих им атомов углерода при 5.70 (99.89) м.д. (КССВ 7.5 Гц), 5.46 (102.40) (КССВ 1.2 Гц) и 6.42 (102.32) м.д. (КССВ 1.2 Гц), соответственно. О триозидном характере флавоноида VII также свидетельствует наличие в его FAB масс-спектре осколочных ионов при m/z 469 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{x}146]^+$ и 273 $[\text{M}+\text{Na}-2(\text{OH})-2\text{x}146-162]^+$, соответствующих отрыву двух остатков дезоксигексоз и блока из двух дезоксигексоз и гексозы. Причем дезоксигексозы имеют терминальное расположение. Сигналы метильных групп СНз-

$6'''$ при 1.63 (18.20) и CH_3-6''' 1.93 (19.20) м.д. с константами 6.2 Гц давали основание сделать заключение о том, что в молекуле флавоноида находятся два остатка рамнозы. Значения ХС протонов и углеродов трех углеводных единиц в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединения VII соответствуют одной β -D-глюкопиранозе и двум - α -L-рамнопиранозам. Место гликозилирования агликона и последовательность присоединения углеводов между собой выяснили из HMBC и ROESY спектров. Аномерный протон глюкозы H-1'' (5.70 м.д.) в HMBC спектре имеет кросс-пик с атомом углерода C-7 (163.71 м.д.), а в ROESY спектре аномерный протон глюкозы H-1'' дает кросс-пики с протонами H-6 (7.02 м.д.) и H-8 (7.08 м.д.) кольца А. Аномерный протон рамнозы H-1''' (5.46 м.д.) в HMBC спектре имеет кросс-пик с атомом углерода C-6'' (67.32 м.д.) глюкозы, а в ROESY спектре с протоном H-6'' (4.68 м.д.) глюкозы. Аномерный протон рамнозы H-1'''' (6.42 м.д.) в HMBC спектре дает кросс-пик с атомом углерода C-2'' (77.52 м.д.) глюкозы, а в ROESY спектре с протоном H-2'' (4.50 м.д.) глюкозы. Значения ХС атомов углерода глюкозы C-2'' (77.52 м.д.) и C-6'' (67.32 м.д.) также свидетельствуют об их гликозилировании. Полученные данные указывают на то, что остаток глюкозы присоединяется по 7 положению в агликоне, а два остатка рамнозы гликозилируют глюкозу по 2 и 6 положениям (рис. 1).

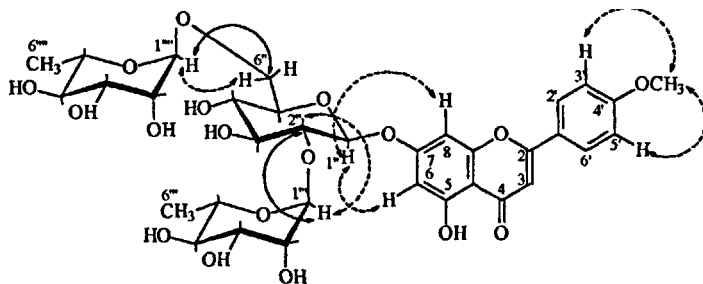


Рис. 1. Наблюдаемые ЯЭО (\leftrightarrow) в ROESY спектре и H-C корреляция (\leftrightarrow) в HMBC спектре соединения VII

Совокупность всех данных для соединения VII позволили нам идентифицировать этот флавоноид как 7-0- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)-[α -L-рамнопиранозил(1 \rightarrow 2)]- β -D-глюкопиранозид 5,7-дигидрокси-4'-метоксифлавона (необудоффицид, рис. 1).

Биозиды флавонов. Копеечник шетинистый содержит четыре биозиды флавонов: **7-O- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-глюкопиранозид** 5,7,4'-тригидроксифлавона (роифолин, VIII), **7-O- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-глюкопиранозид** 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавона (лоницерозид, X), **7-O- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид** 5,7,3-тригидрокси-4'-метоксифлавона (диосмин, XI) и **7-O- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид** 5,7-дигидрокси-4'-метоксифлавона (лиарин, XII). Агликоны этих флавонов представляют собой гомологи по степени гидроксирования и метоксилирования кольца В. Все они являются 7-O-гликозидами и имеют одинаковый качественный состав биозидной цепи (**α -L-Rha_p, β -D-Glc_p**), но отличаются порядком связи между углеводами. В соединениях VIII, X рамноза присоединяется к глюкозе по 2 положению (неогеспериозиды), а в соединениях XI, XII - по 6 положению (рутинозиды).

Разделение этих флавонов провели на полиамидном сорбенте в системе вода-метанол и получили две фракции. В первой (**MeOH:H₂O 15 \rightarrow 30%**) присутствовали соединения VIII и X, а во второй (**MeOH:H₂O 30 \rightarrow 40%**) - XI и XII. Такое хроматографическое поведение биозидов гидрокси- и метоксифлавонов свидетельствует о том, что хроматография проходит по распределительному механизму. Известно, что во флавонах пространственно-свободные 7 и 4' OH-группы играют основную роль в их сорбционной способности, а 3' OH-группа - минимальную. Соединения VIII и X отличаются между собой на 3' OH-группу, поэтому такое структурное различие не позволило индивидуализировать оба соединения. Доминирующий компонент VIII выделили в индивидуальном виде и получили фракцию обогащенную компонентом X. Флавоноиды XI, XII является минорными компонентами и имеют аналогичные структурные различия (3'-ОН группу), которые также не позволили нам разделить эти соединения.

Роифолин (VIII). лоницерозид (XV) диосмин (XI). лиарин (XII). Идентификацию соединений провели с помощью ¹H, ¹³C и 2D ЯМР спектроскопии и HR-FAB масс-спектрометрии. На рисунках 2 и 3 представлены фрагменты спектров ЯМР ¹H для каждой пары соединений.

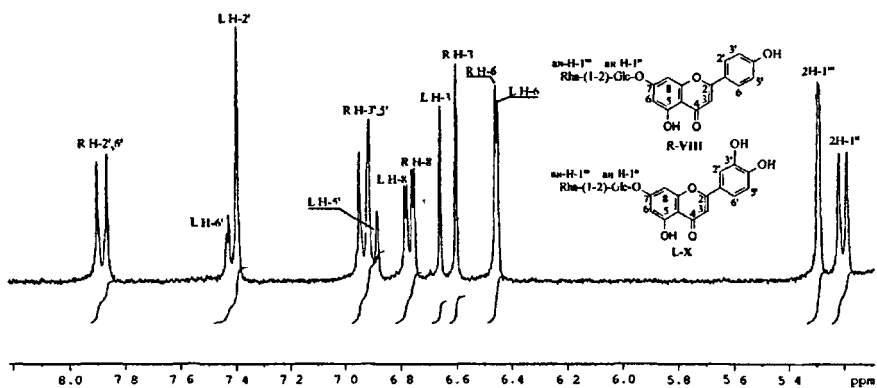


Рис. 2. Фрагмент спектра ЯМР ^1H суммы соединений VIII и X (CD_3OD)

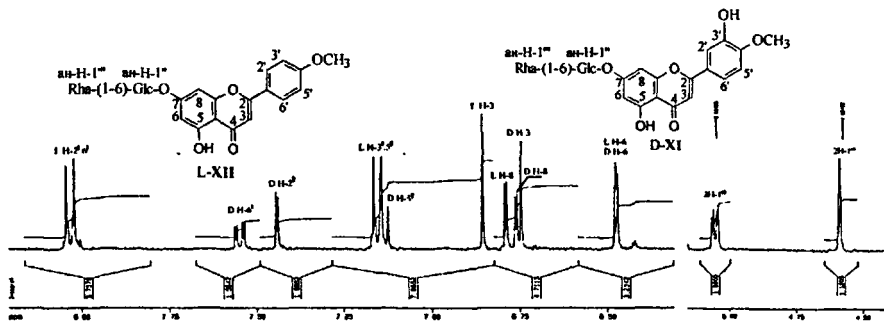


Рис. 3. Фрагмент спектра ЯМР ^1H суммы соединений XI и XII (DMSO-d_6)

1.1.2. Флавонолы

Флавонолы в *H. setigerum* представлены как агликонами (I, III, IV) так и гликозидами (II, V, VI, IX): кверцетин (I), кверцитрин (II), изорамнетин (III), 3-метоксикемпферол (IV), 3- $\text{O-}\alpha\text{-L}$ -арабинофуранозид кемпферола (V), авикулярин (VI), рутин (IX).

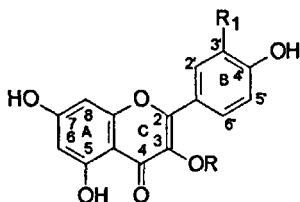
Идентификация флавонолов проведена на основании физико-химических и спектральных данных, которые приведены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические и спектральные данные флавонолов, выделенных из копеечника щетинистого

| Соединение | HR-FAB ⁺ | УФ, λ_{max} , нм | Спектры ЯМР ¹ H, δ м.д., J/Гц; (I - III, VI - DMSO-d ₆ , IV - (CD ₃) ₂ OC, V - CD ₃ OD, IX - C ₅ D ₅ N) | | | | | |
|---|---------------------------------|---------------------------------------|--|------------------------|---------------|---------------|--|---|
| | | | H-2',6' | H-3',5' | H-8 | H-6 | Другие протоны заместителей | |
| кверцетин (I), т.пл. 302°C | 303.0501 [M+H] ⁺ | 256 374 | 7.70 (д, 1.9), 7.54 (дд, 8.5, 1.9) | 6.86 (д, 8.5) | 6.40 (д, 1.6) | 6.19 (д, 1.6) | - | - |
| кверцитрин (II), т.пл. 181-183°C | 449.1082 [M+H] ⁺ | 256 353 | 7.27 (д, 2.1), 7.25 (дд, 8.2, 2.1) | 6.86 (д, 8.2) | 6.37 (д, 2.1) | 6.18 (д, 2.1) | 5.23 (д, 1.2, H-1" Rha) | 0.81-3.95 (7H, Rha) |
| изорамнетин (III), т.пл. 299-300°C | 317.0665 [M+H] ⁺ | 255 369 | 7.78 (д, 2.0), 7.72 (дд, 8.6, 2.0) | 6.96 (д, 8.6) | 6.50 (д, 2.0) | 6.22 (д, 2.0) | 3.86 (с, OCH ₃ -3') | - |
| 3-метокси кемферол (IV), т.пл. 270-272°C | 323.0536 [M+Na] ⁺ | 267 350 | 8.01 (д, 8.2) | 6.99 (д, 8.2) | 6.49 (д, 1.5) | 6.25 (д, 1.5) | 3.86 (с, OCH ₃ -3) | - |
| 3-O- α -L-арабинофуранозид кемферола (V), т.пл. 226-227°C | 441.0804 [M+Na] ⁺ | 266 354 | 7.95 (дд, 8.6, 2.2) | 6.92 (дд, 8.6, 2.2) | 6.41 (д, 2.2) | 6.21 (д, 2.2) | 5.46 (уш. с., H-1" Ara) | 3.41-4.31 (5H, Ara) |
| авикулярин (VI), т.пл. 208-209°C | 435.0927 [M+H] ⁺ | 257 355 | 7.48 (д, 2.2), 7.53 (дд, 8.4, 2.2) | 6.86 (д, 8.4) | 6.39 (д, 2.0) | 6.20 (д, 2.0) | 5.58 (д, 1.1, H-1" Ara) | 3.35-4.16 (5H, Ara) |
| рутин (IX), т.пл. 190-192°C | 633.1434 [M+Na] ⁺ | 257 357 | 8.33 (д, 1.8), 8.09 (дд, 8.3, 1.8) | 7.35 (д, 8.3) | 6.66 (д, 1.7) | 6.64 (д, 1.7) | 5.96 (д, 7.2, H-1" Glc), 3.93-4.52 (6H, Glc) | 5.29 (д, 1.2, H-1" Rha), 1.48-4.39 (7H, Rha) |

Флавонолы



- $R=H$, $R_1=OH$, кверцетин (I)
 $R=\alpha-L-Rha_p$, $R_1=OH$, кверцитрин (II)
 $R=H$, $R_1=OCH_3$, изорамнетин (III)
 $R=CH_3$, $R_1=H$, 3-метоксикемпферол (IV)
 $R=\alpha-L-Ara_f$, $R_1=H$, 3-O- α -L-арабинофуранозид кемпферола (V)
 $R=\alpha-L-Ara_f$, $R_1=OH$, авикулярин (VI)
 $R=\alpha-L-Rha_p-(1\rightarrow6)-O-\beta-D-Glc_p$, $R_1=OH$, рутин (IX)

Практически для всех изученных растений рода *Hedysarum* характерно наличие кверцетина и его 3-O-гликозидов. Присутствие кемпферола отмечено только для одного вида *Я. caucasicum*, а его 3-O-глюкозида (астрагалин) - для *Я polybotrys*. Флавонолы IV, III и V несмотря на их широкое распространение в природе, в роде *Hedysarum* идентифицированы впервые. Для моногликозидов флавонолов характерно наличие α -L-арабинозы в фуранозной форме, что встречается в составе вторичных метаболитов растений относительно редко.

На основании- полученного и литературного материала рассмотрены возможные пути биосинтеза некоторых фенольных соединений в растениях рода *Hedysarum* и предложены группы соединений ранее не выделенных, но ожидаемых по биогенезу. Так как в листьях *Я. carnosum*, *Я. spinosissimum capitatum*, *Я. flexuosum*, *Я. pallidum*, *Я. coronarium*. была обнаружена галловая кислота, а в составе *Я. polybotrys* метиловый эфир 3,4,5-триметоксикоричной кислоты, то следует ожидать, что в копеечниках должны синтезироваться халконы, флавоноиды и изофлавоноиды содержащие 3',4',5'-замещенное кольцо В. На настоящий момент подобные вторичные метаболиты в составе растений рода *Hedysarum* ещё не обнаружены.

2. Изучение флавоноидов, выделенных из *H. setigerum*, методами FAB и MALDI масс-спектрометрии

В процессе исследования химического состава надземной части *Hedysarum setigerum* нами выделены и изучены методом FAB⁺ и MALDI⁺ масс-спектрометрии 12 флавоноидов (агликоны, гликозиды флавонолов и гликозиды флавонов).

В. FAB⁺ масс-спектрах практически всех флавоноидов присутствовали фрагментные ионы, соответствующие отрыву - OH, H₂O, CO, CO₂, HCO от молекулярных ионов [M+H]⁺ и [M+Na]⁺

На рисунке 4 представлена фрагментация агликоновой и гликозидной частей на примере 7-О-гликозидов флавонов, которая аналогично протекает и для 3-О-гликозидов флавонолов. Для 7-О-замещенных флавонов и метоксифлавонов при распаде γ -пиронового кольца наиболее характерен разрыв углерод-углеродных связей по положениям 1-9, 4-10 (путь I) и 1-9, 3-4 (путь II), относительная интенсивность ($I_{\text{отн}}$) ионов 98-100%. Но в тоже время, в масс-спектрах этой группы флавоноидов наблюдали осколочные ионы, образующиеся по путям III, IV, VI, VII и VIII, с $I_{\text{отн}}$ от 9 до 40 % (рис. 4). Фрагментация агликоновой части в 3-О-замещенных флавонолах протекала по направлениям: I, II, III, IV, VI, VII и VIII (рис. 4), с образованием ионов различной интенсивности. При этом в масс-спектрах этой группы флавоноидов не наблюдали общих закономерностей при фрагментации γ -пиронового кольца.

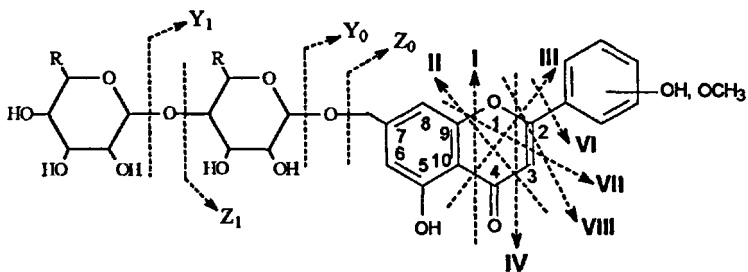


Рис. 4. Пути фрагментации агликоновой и углеводной частей в масс-спектрах 7-О-гликозидов флавонов

Таким образом, на основании собственных и литературных данных можно сделать вывод о том, что фрагментация γ -пиронового кольца по пути I или IV, с образованием осколочных ионов различной интенсивности, протекает для большинства гликозидов флавоноидов и не зависит от их принадлежности к флавонам, флавонолам или флаванонам.

Распад агликоновой части флавоноида по другим направлениям, вероятно, зависит не только от химической структуры соединения, но и способа ионизации молекулы. Преобладающая фрагментация агликона по пути II и III наблюдается только в ESI^+ масс-спектрах кемпферола и апигенина соответственно. В нашем случае, в FAB^+ масс-спектрах производных кемпферола фрагментация γ -пиронового кольца по пути II отсутствует, но наблюдается в масс-спектрах гликозидов акацетина (линарин, необудоффицид), апигенина (роифолин) и диосметина (диосмин). А распад

агликоновой части по пути III осуществляется не только для гликозидов апигенина (роифолин), но и гликозидов кверцетина (авикулярин, рутин), что согласуется с данными работы по ESI⁺.

Фрагментация углеводной части всех гликозидов флавоноидов, протекала с отщеплением углеводных единиц (рис. 4). При этом в масс-спектрах наблюдали типичные ионы - соответствующие отрыву всех углеводных остатков (Y_0 , агликон) и терминального углевода (Y_1). В масс-спектре кемпферол-3-O- α -L-арабинофуранозида присутствовал лишь ион Z_0 , соответствующий отрыву терминального остатка углевода вместе с атомом кислорода гликозидной связи. Ион Z_1 присутствовал в масс-спектрах только рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)-глюкопиранозидов (рутинозидов), а не рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-глюкопиранозидов (неогеспериозидов). Отсутствие интенсивного иона Y^* , связанного с отрывом внутреннего углеводного остатка, в масс-спектрах всех выделенных из *Hedysarum setigerum* флавоноидов указывает на то, что агликоны представлены флавонами или флавонолами, но не флаванонами, в спектрах которых ион Y^* основной (рис. 5).

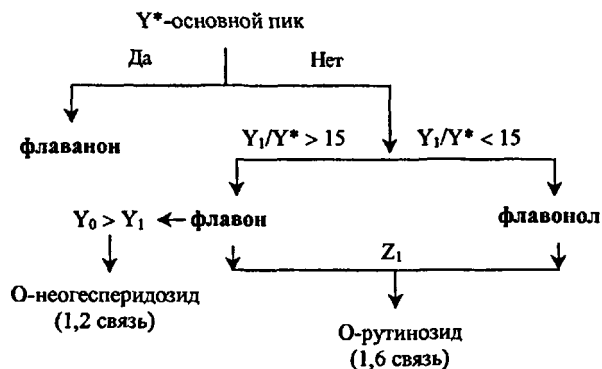


Рис. 5. Установление строения агликоновой части в O-гликозидах флавоноидов методом FAB⁺

Учитывая относительные интенсивности пиков ионов в соотношении Y_1/Y^* (рис. 5), удалось проследить закономерности, способствующие установлению принадлежности агликонов флавоноидных гликозидов к флаванам (необудоффицид, роифолин, линарин, диосмин) и флавонолам (рутин). Закономерность в установлении межгликозидной связи ($Y_0 > Y_1$) во флавоновых гликозидах наблюдалась лишь только

в случае роифолина, но не лиарина и диосмина, возможно это может быть связано с метоксилированием в кольце В.

MALDI⁺ масс-спектры были получены для изорамнетина, авикулярина, роифолина, лиарина и диосмина. В масс-спектрах флавоноидов наблюдали молекулярные ионы $[M+H]^+$ и их аддукты со щелочными металлами $[M+Na(K)]^+$, а также осколочные ионы, образующиеся при отрыве молекул COг и CO от молекулярного иона. В MALDI⁺ масс-спектре изорамнетина присутствовало большее число фрагментных ионов (отрыв кольца В по пути VI), по сравнению с его FAB⁺ масс-спектром. В MALDI⁺ масс-спектре монозида кверцетина - авикулярина, наблюдали меньшее число осколочных ионов по сравнению с его FAB⁺ масс-спектром, хотя как в том, так и в другом спектре присутствовали ионы Y₀, Z₁ и фрагментный ион, образующийся при расщеплении по пути II или VII. Таким образом, при FAB⁺ и MALDI⁺ ионизации гликозидов флавоноидов происходит фрагментация агликоновой части с распадом γ-пирового кольца С и отщеплением кольца В. Фрагментация углеводной части в гликозидах флавоноидах определяется строением агликоновой части и порядком присоединения углеводов между собой.

3. Идентификация- **9'-O-β-D-глюкопиранозид** 4,9,4',9'-тетрагидрокси-3,3'-**диметокси-β8, α8', β7'-циклолигнана [(+)-изоларицирезинол-9'-O-β-D-глюкопиранозид]**

Из бутанольной фракции с применением колоночной хроматографии на декстрановых гелях (Sephadex LH-20-100 и G-10) выделили соединение XV. Хроматографическое поведение его на силикагелевых пластинках Sorbfil в системе 70:12:1 (CHCl₃:MeOH:H₂O) позволило предположить, что это вещество является гликозидом.

В HR-FAB масс-спектре соединения XV наблюдали пик молекулярного иона m/z 545.2003, соответствующий брутто-формуле **C₂₆H₃₄O₁₁Na**. На монозидный характер этого соединения указывал присутствующий в его FAB масс-спектре осколочный ион m/z 342 **[M+Na-162-H₂O-Na]**, образующийся в результате отрыва от молекулярного иона остатка гексозы, молекулы воды и иона натрия. Абсорбционные максимумы исследуемого соединения в УФ-спектре лежат при 230 и 283 нм. Характер поглощения в УФ-области свидетельствует о наличии в системе сопряженных двойных связей.

При анализе 1D (^{13}C , ^1H , АРТ) и 2D (HSQC) ЯМР спектров (табл. 2) соединения XV сделали вывод о том, что в его структуре содержатся два бензольных кольца (полосы поглощения в ИК-спектре 1516, 1454 см^{-1}). В спектре ЯМР ^1H протоны одного кольца наблюдали в виде двух дублетов при 6.18 (H-5) и 6.65 (H-2) м.д. с пара-КССВ 0.7 Гц, следовательно, оно имеет 1, 3, 4, 6-замещение. Протоны другого бензольного кольца проявлялись в спектре в виде трех сигналов (АВС-система), каждый интенсивностью в один протон при 6.78 м.д. (H-2¹, КССВ 1.9 Гц), 6.73 м.д. (H-5¹, КССВ 8.1 Гц) и 6.62 м.д. (H-6¹, КССВ 8.1, 1.9 Гц). Значит, второе ароматическое кольцо имеет 1', 3', 4'-замещение. Также в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H наблюдали резонансные сигналы двух ароматических метоксильных групп при 56.36 (3.80) и 56.45 (3.81) м.д. (полоса поглощения в ИК-спектре 2856 см^{-1}). Кроме того, в структуре соединения XV присутствуют три метановые группы при 39.47 (H-8, 2.03), 45.88 (H-8', 1.86) и 47.87 (H-7, 4.07) м.д., а также три метиленовые группы при 33.87 (2H-7, 2.83), 65.15 (2H-9, 3.70) и 69.45 (2H-9' 3.29 и 4.06) м.д., две последние судя по величине ХС связаны с атомами кислорода. Сигнал аномерного протона в спектре ЯМР ^1H наблюдали при 4.13 м.д. (H-Г", J=7.7 Гц). Значение его КССВ и величины ХС атомов углерода углеводного остатка в спектре ЯМР ^{13}C соответствовали литературным данным для β -D-глюкопираноза.

Таблица 2

Ш и 2D ЯМР спектральные данные соединения XV (δ , м.д., J/Гц)

| Атом | ^{13}C | ^1H | COSY | COLOC (C→H) | NOESY |
|------|-----------------|---------------|---------------|-------------|---------------------|
| 1 | 129.13 | | | H 5, 2H 7 | |
| 2 | 112.35 | 6.65 (д, 0.7) | H 5, 7, 7' | H 2, 2H 7 | H 7, OMe-3 |
| 3 | 147.12 | | | H 5, OMe-3 | |
| 4 | 145.09 | | | H 2 | |
| 5 | 117.36 | 6.18 (д, 0.7) | H 2, 7, 7' | H 5 | H 2', 6', 7' |
| 6 | 134.35 | | | H 2, 2H 7 | |
| 7 | 33.87 | 2.83 (м) | H 2, 5, 8, 7' | 2H 7 | H 2, 8, 9, 8' |
| 8 | 39.47 | 2.03 (м) | H 7, 9, 8' | 2H 7 | H 7, 9, 7' |
| 9 | 65.15 | 3.70 (м) | H 8 | | H 7, 8, 8', 9' |
| 1' | 138.66 | | | H 5' | |
| 2' | 114.27 | 6.78 (д, 1.9) | H 7' | H 2' | H 5, 7', 8', OMe-3' |

Таблица 2 (продолжение)

| | | | | | |
|--------|--------|----------------------|-------------------|--------------|-----------------------|
| 3' | 148.88 | | | H 5', OMe-3' | |
| 4' | 145.78 | | | H 2', 6' | |
| 5' | 116.06 | 6.73 (д., 8.1) | H 6' | | H 6' |
| 6' | 123.11 | 6.62 (дд., 8.1, 1.9) | H 5' | H 2' | H 5, 5', 7, 8' |
| 7' | 47.87 | 4.07 (м) | H 2, 5, 7, 2', 8' | | H 5, 8, 2', 6', 8' |
| 8' | 45.88 | 1.86 (уш. т., 10.2) | H 8, 7', 9' | 2H 7 | H 7, 9, 2', 6', 7, 9' |
| 9' | 69.45 | 4.06 и 3.29 (м) | H 8' | | H 9, 8', 1" |
| 1" | 105.17 | 4.13 (д., 7.7) | H 2" | | H 9' |
| 2" | 75.16 | 3.21 (м) | H 1", 3" | | |
| 3" | 78.08 | 3.47 (м) | H 2", 4" | | |
| 4" | 71.62 | 3.30 (м) | H 3", 5" | | |
| 5" | 77.85 | 3.66 (м) | H 4", 6" | | |
| 6" | 62.72 | 3.63 и 3.81 (м) | H 5" | | |
| OMe-3' | 56.36 | 3.80 (с) | | | H 2' |
| OMe-3 | 56.45 | 3.81 (с) | | C 3 | H 2 |

На основании 2D ЯМР спектров COSY, NOESY и COLOC (табл. 2) соединение XV отнесли к карбоциклическим лигнанам, тетрагидронафталинового типа. В двухмерном ЯМР корреляционном спектре ^{13}C - ^1H COLOC протоны 2H-7 (2.83 м.д.) имели кросс-пики с атомом углерода C-7 (33.87 м.д.), а также с атомами углерода через две (C-1 129.13, C-8 39.47 м.д.) и три связи (C-2 112.35, C-6 134.35, C-8' 45.88 м.д.) (табл. 2). Полученные данные позволили нам - сделать заключение о том, что циклогексановое кольцо конденсировано с 1, 3,4,6-замещенным бензольным кольцом. Данные спектра COSY (таб. 2) не только не противоречили информации полученной из спектра COLOC, но и подтверждают предложенную тетрагидронафталиновую структуру соединения XV, а также однозначно свидетельствуют о том что, второе бензольное кольцо, имеющее 1', 3', 4'-замещение, присоединяется по 7 положению в циклогексановом кольце. Последний факт подтверждается также спектром NOESY, в котором присутствуют кросс-пики протонов H-2',6' с протоном H-7'.

Местоположение заместителей в молекуле соединения XV, а также пространственное расположение заместителей в циклогексановом кольце сделали на основании спектров NOESY (рис. 6, табл. 2) и COLOC (табл. 2). Протоны двух метоксильных групп (3.81 и 3.80 м.д.) в спектре COLOC имели кросс-пики с атомами

углерода C-3 (147.12 м.д.) и C-3' (148.88 м.д.), а в спектре NOESY с протонами H-2 (6.65 м.д.) и H-2' (6.78 м.д.), соответственно. Следовательно, метоксильная группа при 3.81 (56.45 м.д.) расположена в 3 положении, а при 3.80 (56.36 м.д.) - в 3' положении (табл. 2).

Определенную трудность представляло установление пространственного расположения заместителей в циклогексановом кольце, а также место присоединения остатка p-D-глюкозы в молекуле. Сложность решения поставленной задачи заключалась в том, что H-T и один протон H-9' агликоновой части, а также аномерный протон глюкозы H-1", имели очень близкие химические сдвиги и частично перекрывались. Только на основании спектра HSQC мы смогли выяснить значения химических сдвигов выше указанных протонов, что позволило нам однозначно интерпретировать спектр NOESY. Резонансные сигналы этих трех протонов наблюдали в спектре в следующем порядке: H-9' (4.06 м.д.), H-7' (4.07 м.д.), а затем аномерный протон глюкозы H-1" (4.13 м.д.). В спектре NOESY протоны 2H-7 (2.83 м.д., ушх) имели кросс-пики с протонами 2H-9 (3.70 м.д., м). Один из протонов (2H-7) давал кросс-пик с протоном H-8' (1.86 м.д.), а другой - с протоном H-8 (2.03 м.д.), но оба не давали кросс-пики с протоном H-T (4.07 м.д.). Следовательно, один из протонов H-7 сближен в пространстве с протоном H-8', а другой - с протоном H-8, но оба не располагаются рядом с протоном H-T. Характер сигнала в спектре ЯМР ¹H протона H-8' (уш. т., J=10.2 Гц), а также его пространственное взаимодействие с протонами 2H-9, 2H-9' (3.29, 4.06 м.д.), H-T и протонами кольца C H-2' (6.78 м.д.), H-6' (6.62 м.д.) (рис. 6, табл. 2), свидетельствуют о том, что протоны H-8' и H-T имеют аксиальное положение в циклогексановом кольце. Вопрос о пространственном расположении протона H-8 решили следующим образом. Так как из *данных* NOESY спектра следовало, что протон H-T находится в аксиальном положении, а наличие у него кросс-пики с протоном H-8 свидетельствует об их пространственной сближенности, следовательно, протон H-8 также находится в аксиальном положении.

Таким образом, протоны H-8, H-8', H-T имеют аксиальное, а объемные заместители (**CH₂OH-9, кольцо C, CH₂O-9'**) - экваториальное расположение в циклогексановом кольце. При рассмотрении моделей Дрейдinга вышеописанные взаимодействия протонов в пространстве реализуются в случае, если циклогексановое кольцо В имеет конформацию полукресла (рис. 6).

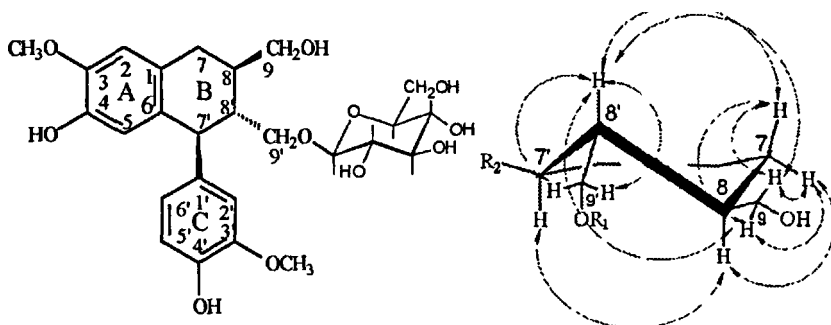
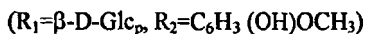


Рис. 6. Наблюдаемые ЯЭО в NOESY спектре соединения XV



Расположение остатка $\beta\text{-D}$ -гликопиранозы в соединении XV также выяснили из NOESY спектра. Аномерный протон глюкозы H-1'' (4.13 м.д.) давал кросс-пики с протонами 2H-9' (3.29, 4.06 м.д.), следовательно, глюкоза присоединяется по 9' положению в молекуле (рис. 6, табл. 2). Рассмотренные расположения заместителей в циклогексановом кольце возможны для двух оптических изомеров. Действительно, в литературе описаны оба этих изомера: (+)-изоларицирезинол-9'-O- $\beta\text{-D}$ -гликопиранозид и (-)-изоларицирезинол-9'-O- $\beta\text{-D}$ -гликопиранозид.

Физико-химические константы выделенного нами соединения XV ($T_{пл}$ 137-138°C, α_D +61.5°) соответствуют таковым для (+)-изоларицирезинол-9'-O-(3-O-гликопиранозида ($T_{пл}$ 137-138°C, α_D +46.1°). Сравнение спектра ЯМР ^{13}C выделенного нами соединения XV с литературными данными для обоих изомеров подтвердило, что оно является (+)-изомером. Таким образом, соединение XV идентифицировали как **9'-O- $\beta\text{-D}$ -гликопиранозид 4,9,4',9'-тетрагидрокси-3,3'-диметокси- $\beta\text{8},\alpha\text{8}',\beta\text{7}'$ -циклолигнана** [(+)-изоларицирезинол-9'-O- $\beta\text{-D}$ -гликопиранозид].

Из всего многообразия растительного мира циклолигнан тетрагидронафталинового типа - изоларицирезинол, и его гликозиды наиболее характерны для класса хвойных растений, хотя в настоящее время появляются сообщения о их выделении из древесных растений класса двудольных, в частности изоларицирезинол-9'-O- $\beta\text{-D}$ -гликопиранозида из коры дерева *Slemmadenia minima*. В наземной части травянистых растений этот гликозид изоларицирезинола обнаружен

в *Sauropus androgynus* и нами в *H. setigerum*, которые также относятся к классу двудольных. Ранее соединения класса лигнанов из растений рода *Hedysarum* не выделялись.

4. Гидроксibenзойные кислоты

Из бутанольной фракции водно-метанольного экстракта *Я. setigerum* в результате многократной колоночной хроматографии на силикагеле и сефадексе G-10 выделили два соединения XXI и XXII, имеющие вид белых игольчатых кристаллов. По данным ИК-, ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии их идентифицировали как п-гидроксibenзойную (XXI) и протокатеховую (XXII) кислоты.

5. Идентификация берберина

В процессе хроматографического деления бутанольной фракции на полиамидном сорбенте получили фракции, содержащие вещество XIII. В результате колоночной хроматографии на силикагеле из них выделили ярко-желтое кристаллическое соединение XIII, которое хорошо растворимо как в малополярных (хлороформ), так и в полярных растворителях (ацетон, вода, метанол). Интенсивный желтый цвет соединения и полосы поглощения (λ_{max} 350, 429 нм) в видимой области спектра предполагают наличие в его структуре системы сопряженных двойных связей. В HR-EI спектре этого соединения наблюдали пик молекулярного иона m/z 337.1240, который соответствует брутто-формуле $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4$, а нечетное число молекулярной массы предполагает наличие атома азота в структуре соединения XIII.

Из спектров ЯМР ^{13}C и АРТ выяснили, что в молекуле этого соединения содержится 20 атомов углерода (табл. 3). Два атома углерода при 57.14 и 61.99 м.д. принадлежали метоксильным группам, а три атома углерода при 26.38 (C-5), 55.26 (C-6) и 102.12 м.д. входили в состав метиленовых групп, последняя из которых, исходя из величины ХС, является диоксиметиленовой. На присутствие этой группы указывает осколочный ион при m/z 45 (100) в EI масс-спектре. Остальные 15 атомов углерода по значениям их ХС отнесли к атомам углерода конденсированных ароматических систем (полосы поглощения в ИК-спектре 1634, 1601, 1568, 1505, 1479, 1458 cm^{-1}). Так как из них девять атомов углерода четвертичные, а шесть - третичные, следует предположить что, в структуре соединения XIII присутствуют три конденсированных ароматических кольца. В спектре ЯМР ^1H сигналы двух ароматических протонов наблюдали при 8.02 (H-12) и 8.16 (H-11) м.д. в виде

дублетов с КССВ в 8 Гц, а два протона при 7.07 (H-4) и 7.78 (H-1) м.д. проявлялись в виде синглетов (табл. 3). Два слабopольных синглета (8.94 (H-13) и 9.88 (H-8) м.д.) отнесли к протонам азотсодержащей гетероциклической ароматической системы.

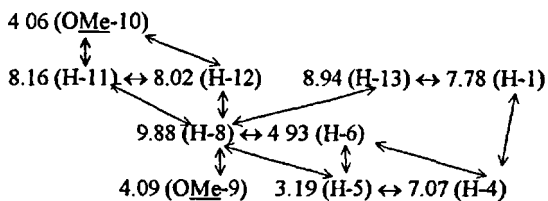
Таблица 3

1D и 2D ЯМР спектральные данные соединения XIII (δ , м.д., J/Гц)

| Атом | ^{13}C | APT | ^1H | COSY | TOCSY | HMBC (H \rightarrow C) |
|----------------------|-----------------|-----------------|----------------|--------------|------------------------------|--------------------------|
| 1 | 105.50 | CH | 7.78 (с) | H 13 | H 4, 13 | C-2, 3, 4a, 14 |
| 2 | 147.72 | | | | | |
| 3 | 149.85 | | | | | |
| 4 | 108.47 | CH | 7.07 (с) | H 5 | H 1, 5, 6 | C-2, 3, 5, 14a |
| 4a | 130.72 | | | | | |
| 5 | 26.38 | CH ₂ | 3.19 (уш.с) | H 4, 6 | H 4, 6, 8 | C-4a |
| 6 | 55.26 | CH ₂ | 4.93 (уш.с) | H 5, 8 | H 4, 5, 8 | C-4a |
| 8 | 145.48 | CH | 9.88 (с) | H 6, 12, 13 | H 5, 6, OMe-9, 11, 12, 13 | C-6, 8a, 9, 12a, 14 |
| 8a | 121.46 | | | | | |
| 9 | 143.72 | | | | | |
| 10 | 150.44 | | | | | |
| 11 | 126.79 | CH | 8.16 (д., 8.0) | OMe-10, H 12 | H 8, OMe-10, 12 | C-9, 10, 12a |
| 12 | 123.62 | CH | 8.02 (д., 8.0) | H 8, 11 | H 8, OMe-10, 11 | C-8a, 10, 13 |
| 12a | 133.05 | | | | | |
| 13 | 120.25 | CH | 8.94 (с) | H 1, 8 | H 1, 8 | C-8a, 12, 14, 14a |
| 14 | 137.51 | | | | | |
| 14a | 120.48 | | | | | |
| O-CH ₂ -O | 102.12 | CH ₂ | 6.16 (с) | | | C-2, 3 |
| OMe-9 | 61.99 | CH ₃ | 4.09 (с) | H 11 | H 11, 12 | C-9 |
| OMe-10 | 57.14 | CH ₃ | 4.06 (с) | | H 8 | C-10 |

Дальнейшее выяснение структуры углеродного скелета молекулы и расположение функциональных групп сделали с применением 2D ЯМР спектроскопии.

Из спектров ЯМР ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) установили последовательность взаимодействия протонов между собой (δ , м.д.):



Совокупность вышеприведенных данных, а также принимая во внимание данные спектра ЯМР ^1H - ^{13}C (HMBC, табл. 3), позволили нам сделать вывод о том, что соединение XIII является алкалоидом протоберберинового типа.

Местоположение заместителей в молекуле - двух метоксильных и одной диоксиметиленовой групп определили с помощью спектра ЯМР HMBC (табл. 3) и гомотерного эффекта Оверхаузера (NOESY, табл. 3, рис. 7). Наличие кросс-пиков протонов диоксиметиленовой группы в HMBC спектре с атомами углерода C-2 (147.72 м.д.) и C-3 (149.85 м.д.) свидетельствует о ее расположении в кольце А при этих атомах углерода. Протоны метоксильных групп (4.09 и 4.06 м.д.) имели кросс-пики с атомами углерода C-9 (143.72 м.д.) и C-10 (150.44 м.д.) в HMBC спектре, а в NOESY спектре - с протонами H-8 (9.88 м.д.) и H-11 (8.16 м.д.), H-12 (8.02 м.д.), соответственно. Следовательно, обе метоксильные группы расположены в кольце D: первая в положении 9, а вторая в положении 10. Исходя из вышеприведенных данных, соединение XIII идентифицировали как 5,6-дигидро-9,10-диметокси-бензо[*g*]-2,3-бензодиоксо[5,6*a*]хинолизиниум(берберин).

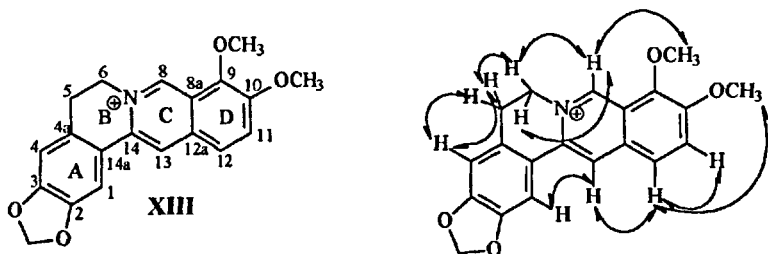


Рис. 7. Наблюдаемые ЯЭО в NOESY спектре соединения XIII

6. Качественный и количественный состав стериннов *H. setigerum*

Из хлороформного экстракта методом флеш-хроматографии выделили фракцию стериннов (0.09 % от веса сухого сырья). Методом ГЖХ-МС во фракции в

виде ацетатных производных идентифицировали: Р-ситостерин (69.2 %), стигмастерин (14.1 %), кампестерин (11.7 %), стигмастанол (4.2 %).

7. Биологическая активность вторичных метаболитов *Я. setigerum*

Химическое исследование копеечника щетинистого было предпринято в связи с тем, что имелись сведения о применении его в современной практической народной медицине для лечения тяжелых, считающихся трудноизлечимыми, инфекций хламидиоза и вирусного гепатита С. В настоящее время борьба с этими инфекциями малоуспешна и требует больших (десятки тысяч рублей) затрат со стороны больного на приобретение лекарств. Решение проблемы создания эффективных лечебных препаратов — одна из важнейших задач химико-фармацевтической науки.

В результате литературного поиска установили, что 7 из 12, идентифицированных нами в копеечнике щетинистом, флавоноидов проявляют противовирусную активность (кверцетин, изорамнетин, 3-метоксикемпферол, кверцитрин, рутин, линарин, диосмин), причем рутинозидный остаток защищает клетку от инвазии вируса. Водные растворы хлорида берберина обладают непрямыми антихламидийными свойствами, подавляя развитие хламидий иммуностимуляцией организма.

Полученные данные дают нам основание полагать, что на основе идентифицированных в составе наземной части копеечника щетинистого представителей разных классов соединений мы в дальнейшем можем создать эффективный препарат для борьбы с вирусными инфекциями.

Выводы

1. Впервые изучен химический состав наземной части копеечника щетинистого (*Hedysarum setigerum* Turcz. ex Fisch. Et Meyer). Хроматографическими методами (аналитическая и препаративная хроматография на силикагеле, полиамиде, сервацэле, сефадексах) выделено и идентифицировано шестнадцать индивидуальных соединений: из них двенадцать флавоноидов, один лигнан, один алкалоид и две фенолокислоты. Идентификация всех соединений проведена химическими (получение производных) и спектральными методами: ID и 2D ЯМР спектроскопией, масс-спектрометрией высокого (HR-EI и HR-FAB) и низкого (EI, FAB, MALDI) разрешения, а также ИК- и УФ-спектроскопией.

Четыре стерина идентифицированы методами ГЖХ и хромато-масс-спектрометрией их ацетатных производных.

2. Установлено, что флавоноидный состав копеечника щетинистого представлен гидроксированными и метоксилированными агликонами флавонолов и их гликозидами. В изученном виде растения идентифицированы 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавоны (кверцетин), **3-O- α -L**-арабинофуранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона (авикулярин), **3-O- α -L**-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона (кверцитрин), **3-O- α -L**-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона (рутин) ранее обнаруженные в других видах рода *Hedysarum*,
3. Из растений рода *Hedysarum* впервые выделены и идентифицированы следующие флавоноиды: 5,7,4-тригидрокси-3-метоксифлавоны (3-метоксикемпферол), 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3'-метоксифлавоны (изорамнетин); **3-O- α -L**-арабинофуранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона (кемпферол-3-O-арабинофуранозид), **7-O- α -L**-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-глюкопиранозид 5,7,4'-тригидроксифлавона (роифолин), **7-O- α -L**-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-глюкопиранозид 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавона (лоницерозид); **7-O- α -L**-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид 5,7-дигидрокси-4'-метоксифлавона (линарин), **7-O- α -L**-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид 5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксифлавона (диосмин), и **7-O- α -L**-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)-[α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)]- β -D-глюкопиранозид 5,7-дигидрокси-4'-метоксифлавона (необудоффицид). Выделение необудоффицида из изучаемого растения является вторым примером обнаружения этого соединения в природе.
4. Из растений рода *Hedysarum* впервые препаративно выделены представители класса алкалоидов и лигнанов. Идентифицирован алкалоид протоберберинового типа - 5,6-дигидро-9,10-диметокси-бензо[g]-2,3-бензодиоксо[5,6a]хинолизиниум (берберин). Обнаружен карбоциклический лигнан, тетрагидронафталинового типа - **9'-O- β -D**-глюкопиранозид 4,9,4',9'-тетрагидрокси-3,3-диметокси- **β 8, α 8', β 7'**-циклолигнана [(+)-изоларицирезинол-**9'-O- β -D**-глюкопиранозид].
5. Выделены и идентифицированы п-гидроксибензойная и протокатеховая кислоты. Изучен качественный и количественный состав стериновой фракции растения.

Идентифицированы стигмастерин, β -ситостерин, кампестерин и стигмастанол. Кампестерин и стигмастанол обнаружены в растениях этого рода впервые.

6. Изучены FAB⁺ и MALDI⁺ масс-спектры выделенных агликонов и гликозидов флавоноидов. Показано, что отсутствие интенсивного иона, характерного для отрыва внутреннего углеводного остатка (ион Y*) в FAB⁺-масс-спектрах гликозидов флавоноидов, позволяет провести отнесение агликона к группам флавонов или флавонолов. Методом ЯМР подтверждено, что наличие или отсутствие в FAB⁺-масс-спектрах осколочных ионов, соответствующих отрыву терминального углеводного остатка вместе с гликозидным атомом кислорода или без него (ионы Z₁ и Y₁), позволяет определить порядок связи 1-6 или 1-2 в биозидах флавоноидов.
7. Выявлены компоненты растения, обуславливающие противовирусное действие копеечника щетинистого, на основе которых планируется создание средства для борьбы с вирусными инфекциями.

Основные публикации по теме диссертации

1. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И. Исследование химического состава копеечника щетинистого (*Hedysarum setigerum*) - перспективного лекарственного растения, обладающего противовирусными свойствами // Интеграция фундаментальной науки и высшей школы в устойчивом развитии Сибири: Материалы докладов конф. молодых ученых Иркутского научного центра СО РАН и вузов Иркутска. - Иркутск, 2001. - С. 81-84.
2. Неретина О.В., Федоров С.В., Громова А.С., Луцкий В.И., Елькин Ю.Н. Флавоноиды *Hedysarum setigerum* // Химия природы, соедин. - 2002. - № 2. - С. 161. [Chem.Nat.Compnd. - 2002. - 38. - № 2. - P. 194-195 (EngLTransl.)]
3. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И., Семенов А.А. Гликозиды метоксилированных флавонов надземной части *Hedysarum setigerum* < Turcz. Ex Fisch Et Meyll Растит, ресурсы. - 2002. - вып. 1. - С. 82-85.
4. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И. Исследование химического состава копеечника щетинистого (*Hedysarum setigerum*) // Химия и технология растительных веществ: Материалы II Всероссийской конференции. - Казань, 2002. - С. 62.

5. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И., Семенов А.А., Ушаков И.А., Макарьева Т.Н. Вторичные метаболиты *Hedysarum sehgerum* II Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений: Материалы международной научной конференции. - Алматы, Казахстан, 2003. - С. 169.
6. Neretina O.V., Gromova A.S., Lutsky V.I., Semenov A.A., Ushakov I.A., Makar'eva T.N., Noel L. Owen Secondary metabolites from *Hedysarum sehgerum* II Chem.Nat.Comp. - 2004. - 40. - №1. - P.91-92.

Формат 60x84 1/16.
Бумага типографская. Печать офсетная. Усл. печ. л. **1,0**
Уч.-изд.л. **1,0** Тираж **100** экз. Зак. **278**

ИД №06506 от 26.12.2001
Иркутский государственный технический университет
664074, Иркутск, ул. Лермонтова, 83

№ - 98 90