



003463480

На правах рукописи

A. Prart

Рогачев Артем Дмитриевич

**Фитохимическое исследование
Rhododendron adamsii Rehder**

02.00.10 — биоорганическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

12.11.2009

Новосибирск — 2009

**Работа выполнена в Новосибирском институте органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН**

Научный руководитель: д.х.н., с.н.с. Салахутдинов Нариман Фаридович

Официальные оппоненты: д.х.н., профессор Базарнова Наталья Григорьевна
к.х.н. Харитонов Юрий Викторович

Ведущая организация: Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

Защита состоится «27» февраля 2009 г. в 10⁰⁰ на заседании диссертационного
совета Д 003.045.01 при Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 8.

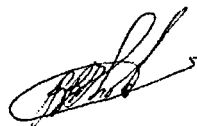
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН.

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «16» февраля 2009г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат химических наук, доцент



Коваль В. В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Исследование природных метаболитов, в частности, веществ растительного и микробного происхождения — одна из важнейших задач фитохимии. Поиск новых природных источников, исследование их качественного и количественного химического состава, препаративное выделение основных растительных метаболитов для фармакологических испытаний и последующих химических трансформаций является актуальной задачей.

Объектом нашего исследования является рододендрон Адамса *Rhododendron adamsii* Rehder семейства вересковых (Ericaceae). Это растение широко применяется в народной медицине в качестве стимулирующего и тонизирующего средства, при сердечных заболеваниях, отеках сердечного происхождения, в качестве мочегонного средства, а также при простудных заболеваниях. Еще в середине прошлого века было обнаружено, что экстракты рододендрона Адамса проявляют ценные фармакологические свойства, однако его химический состав ранее детально не исследовался.

Целью данной работы является исследование химического состава листьев и стеблей *Rh. adamsii*, количественное определение содержащихся в них веществ, выделение ряда индивидуальных компонентов из экстрактов растения, химическая модификация доступных метаболитов и оценка биологической активности некоторых полученных соединений.

Научная новизна. В результате настоящей работы впервые проведено систематическое исследование качественного и количественного химического состава листьев и стеблей рододендрона Адамса. Предложена схема выделения (экстракционная последовательность растворителей), позволяющая провести достаточно эффективное извлечение и разделение низкомолекулярных метаболитов данного растения.

Изучен компонентный состав полярных и липофильных экстрактов *Rh. adamsii*. Подробно исследован химический состав и идентифицированы основные компоненты эфирных масел листьев и стеблей этого растения и проведен сравнительный анализ с составом эфирных масел родственных ему рододендронов: даурского (*Rh. dauricum*) и золотистого (*Rh. aureum*). Показано, что при сходстве в наборе базовых компонентов эфирные масла рододендронов различаются по своим макрокомпонентам.

Впервые определен качественный состав и массовое содержание жирных кислот листьев и стеблей *Rh. adamsii*. Установлено, что среди свободных кислот в ли-

стях растения преобладает бегеновая, а в стеблях — линолевая кислоты. В связанном состоянии в листьях растения наибольшим относительным содержанием обладает линоленовая, в стеблях — линолевая кислоты. Впервые в представителе рода *Rhododendron* обнаружены кислоты, содержащие циклопропановый фрагмент. Наряду с жирными кислотами, определено количественное содержание практически важных тритерпеновых метаболитов — урсоловой и олеаноловой кислот.

Из полярных экстрактов листьев и стеблей рододендрона Адамса получены и охарактеризованы 4 флавоноида, мажорные для данного растения (мирицетин, кверцетин, дигидрокверцетин и рутин), и впервые определено их массовое содержание. Рутин и дигидрокверцетин в *Rh. adamsii* были обнаружены впервые. Из листьев растения также были выделены и охарактеризованы мио-инозитол и ацетамид.

Впервые из листьев *Rhododendron adamsii* Rehd. выделены три соединения, принадлежащие классу пренилированных фенолов: даурихромоновая кислота, метиловый эфир каннабигерорциновой кислоты, а также новое, ранее не описанное соединение — 1-(3-метилбутаноил)-1a,4a,7-триметил-1,1a,1a¹,2,3,4,4a,9b-октагидроциклобута[kl]ксантен-9-ола. Исследовано бромирование, бензоилирование и ацилирование метилового эфира каннабигерорциновой кислоты, а также бромирование и бензоилирование октагидроциклобутахсантена, в результате чего получено 6 новых соединений.

Практическая значимость работы состоит в разработке эффективной схемы выделения веществ, в том числе ранее не описанных, из листьев и стеблей рододендрона Адамса и выявления соединений с ценными фармакологическими свойствами. Новое соединение, являющееся производным циклобутаоктагидрохсантена, обладает гипотермическим и коагулирующим действием. Проведенное исследование вносит значительный вклад в изучение качественного и количественного химического состава растений рода *Rhododendron*, в частности, рододендрона Адамса.

Апробация работы. Основные результаты обсуждались на семинарах Отдела природных и биологически активных веществ, молодежных конкурсах научных работ НИОХ СО РАН. Отдельные части работы были доложены на IV и V Всероссийских конференциях «Химия и технология растительного сырья» (г. Сыктывкар, 2006; г. Уфа, 2008), III Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и технологии растительного сырья» (г. Барнаул, 2007), Всероссийской научной конференции

«Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, 2007), а также международной конференции «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» (Алма-Ата, 2007).

Публикации. По материалам диссертации в рецензируемых журналах опубликовано 3 работы.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (118 наименований). Работа содержит 38 рисунков, 6 схем и 24 таблицы.

Основное содержание работы

Литературный обзор, представленный в работе, посвящен обобщению и анализу данных о химическом составе растений рода *Rhododendron*, а также результатам биологических испытаний выделенных из этих растений суммарных экстрактов и индивидуальных соединений. Анализ литературы показал, что растения рода *Rhododendron* являются перспективным источником биологически активных веществ, обладающих широким спектром полезных свойств. В частности, рододендрон Адамса обладает общеукрепляющим, тонизирующим, стимулирующим, противовоспалительным, адаптогенным, гипотензивным и др. эффектами, однако его химический состав ранее детально не исследовался.

Подготовка и экстракция сырья

Известно, что некоторые вторичные метаболиты растений могут накапливаться в отдельных частях растения (листья, стебли, почки, корни и т.д.). Для корректного установления химического состава растения уже на этапе подготовки его к экстракции необходимо провести тщательную сортировку сырья, т.е. разделить между собой все части растения и проводить экстракцию каждой из них индивидуально. По этой причине мы исследовали химический состав листьев и стеблей рододендрона Адамса по отдельности. Для максимально полного извлечения веществ из растительного сырья мы измельчали его до размера частиц 0.1-0.5 мм.

Экстракцию измельченного сырья мы проводили в аппарате Сокслета. Преимуществом использования именно непрерывного экстрактора является то, что экстракция всегда осуществляется чистым растворителем при его многократной циркуляции. В этом случае максимально полно проявляется селективность растворителя, заключающаяся в извлечении даже малорастворимых в нем компонентов. Экстракция

растительного сырья методом настаивания потребует большое количество растворителя, а процесс будет проходить в течение продолжительного времени.

В качестве способа извлечения мы использовали экстракцию рядом растворителей с постепенным увеличением полярности и элюотропной силы, согласно следующим принципам: ряд растворителей должен быть составлен в порядке увеличения их полярности, но с учетом селективности каждого экстрагента:

- | | |
|----------------------|----------------|
| 1) Гексан | 7) Ацетонитрил |
| 2) Нефрас | 8) Изопропанол |
| 3) Толуол | 9) Метанол |
| 4) Бензол | 10) 80% Этанол |
| 5) Хлористый метилен | 11) 40% Этанол |
| 6) Ацетон | 12) Вода |

Эту последовательность мы применили для параллельной экстракции листьев и стеблей *Rhododendron adamsii* Rehder, в ходе которой выяснилось, что экстрактивные вещества составляют более половины массы экстрагируемого сырья.

Отдельно стоит отметить, что при экстракции листьев ацетоном произошло практически селективное извлечение одного компонента (пик №4 на рис. 1а).

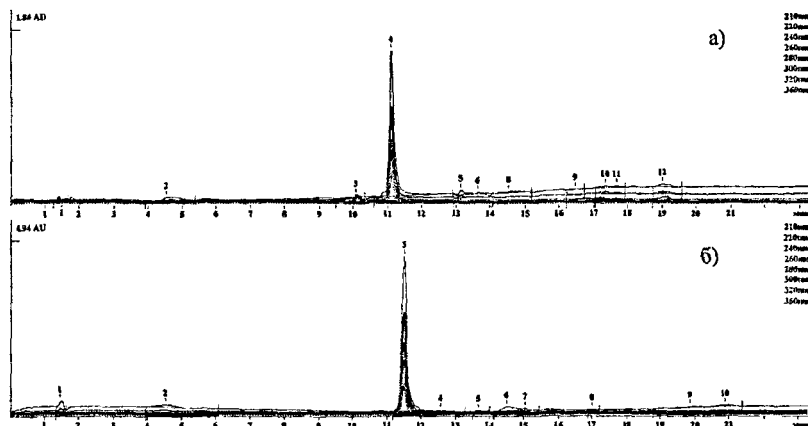


Рис. 1. Хроматограмма ацетонового экстракта листьев (а) и мирицетина (б)

По хроматографическим характеристикам, таким, как время удерживания и спектральные отношения пика, мы установили, что этим веществом является флавоноид мирицетин. На рис. 1а, б приведены хроматограммы экстракта СДЗ-1-ацетон и мирицетина, а в табл. 1 указаны спектральные отношения соответствующих пиков.

Табл. 1. Спектральные отношения миррицетина, пика №4 ацетонового экстракта, а также основного пика их смеси (рассчитаны относительно поглощения на 210 нм)

Проба	220/210	240/210	260/210	280/210	300/210	320/210	360/210
Экстракт	0.620	0.337	0.425	0.183	0.190	0.218	0.459
Миррицетин	0.635	0.331	0.423	0.176	0.182	0.207	0.463
Смесь экстракта и миррицетина	0.632	0.333	0.427	0.178	0.184	0.210	0.458

Таким образом, была предложена схема выделения (экстракционная последовательность растворителей), позволяющая провести эффективное извлечение и разделение низкомолекулярных метаболитов рододендрона Адамса.

Сравнительный анализ химического состава эфирных масел листьев и стеблей *Rhododendron adamsii*, *Rh. aureum* и *Rh. dauricum*

Мы провели анализ эфирных масел (ЭМ) листьев и стеблей рододендрона Адамса, а также, для сравнения, двух родственных ему рододендронов — золотистого (*Rh. aureum*) и даурского (*Rh. dauricum*).

В эфирном масле *Rh. adamsii* можно выделить компоненты, присутствующие как в листьях, так и в стеблях растения: α - и β -пинены, β -мирцен, цис- β -оцимен, изоледен, аромадендрен, гумулен, β -фарнезен, γ -муролен, β -селинен, леден, α -фарнезен, δ -кадинен, транс-неролидол, шпатуленол, β -элеменон, гермакрон. Эфирное масло стеблей растения содержит гермакрен Д и гермакрен Б, которые отсутствуют в ЭМ листьев. Практически во всех образцах ЭМ листьев и стеблей *Rh. adamsii* обнаружен 4-фенил-2-бутанон, содержание которого составляет от 3 до 13%, а также родственный ему 4-фенил-2-бутанол (от 1.9 до 7.4%). Обнаружено, что относительное содержание компонентов ЭМ как листьев, так и стеблей образцов растения, собранных в разные годы, различается; также наблюдались изменения в химическом составе эфирных масле при хранении сырья. Так, например, заметно увеличивается доля транс-неролидола (1, рис. 2) в ЭМ как листьев (с 18.2% до 29.4%), так и стеблей (с 9.6% до 15.7%).

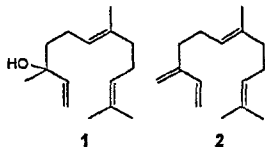


Рис. 2. Структурные формулы транс-неролидола (1) и β -фарнезена (2)

Одновременно с этим уменьшалось относительное содержание таких макро-

компонентов ЭМ как β -фарнезен, α -пинен, гумулен и некоторых других. Вероятно, транс-неролидол образуется в ходе химических трансформаций, которым подвергается структурно близкий ему β -фарнезен (2, рис. 2) при хранении сырья. Сырье при хранении также меняет свой запах, что подтверждает изменение химического состава летучих компонентов.

Компоненты ЭМ стеблей *Rh. dauricum* идентифицированы полностью, в эфирном масле листьев данного растения определены соединения, составляющие около 92% масла. В отличие от *Rh. adamsii*, макрокомпоненты ЭМ листьев и стеблей *Rh. dauricum* различны. В эфирном масле стеблей свежесобранного растения преобладают α -пинен и лимонен, доля каждого из которых составляет больше 19%. Эти и некоторые другие соединения практически отсутствуют в ЭМ листьев, а наибольшее содержание здесь имеют кариофиллен (28.3%), гумулен (15.0%), кариофиллен- α -оксид (6.1%) и некоторые другие вещества. Такие результаты свидетельствуют о том, что листья и стебли *Rh. dauricum* могут заметно отличаться по своему химическому составу, поэтому при его исследовании необходимо сортировать сырье на отдельные части растения.

В своей работе мы проанализировали составы эфирных масел двух образцов (№1 и №2) рододендрона золотистого (*Rh. aureum*). В эфирных маслах как листьев, так и стеблей обоих образцов были обнаружены α -калакорен, сквален, каламен и нонановая кислота. ЭМ листьев и стеблей образца №1 содержали карвакрол, 1,6-диметилнафталин, аг-куркумен, дегидроолопанон, н-хенейкозан и некоторые другие вещества, которые отсутствовали в ЭМ образца №2. В свою очередь, макрокомпонентами ЭМ листьев образца №2 являются каларен, карвакрол, сквален, бакхарис оксид, фриделин и алканы C29, C31 и C36. В эфирном масле стеблей образца №2 больше всего содержится α -кадинола (10.52%), гексановой кислоты (6.3%), бакхарис оксида (4.64%) и сквалена (3.4%). Исследованные образцы рододендрона золотистого заметно отличались по химическому составу эфирных масел. Возможно, это обусловлено тем, что *Rh. aureum* не является эфирносом (содержание ЭМ в исследованных образцах составляет от 0.02% до 0.09%), а также разными температурными режимами хранения исследованного сырья.

Сравнение химического состава полученных нами эфирных масел с химическим составом масел рододендронов даурского, Ледебуря, сихотинского и остроко-

нечного [Белоусов М. В. и др., *Химия растительного сырья*, 2000, 3, 45] показывает, что все они схожи между собой по набору основных соединений, но отличаются по своим макрокомпонентам. Так, большую часть ЭМ *Rh. adamsii* составляют β -фарнезен, аромандрен и транс-неролидол, масла *Rh. aureum* — карвакрол, α -кадинол и некоторые алканы, *Rh. dauricum* — лимонен. Мажорными компонентами эфирных масел *Rh. mucronulatum* являются кариофиллен и гумулен, *Rh. ledebouri* — борнил-ацетат и гермакрен Д, а масла *Rh. sichotense* — палюстрол. Возможно, эфирные масла могут служить химическими маркерами для межвидовой дифференциации растений внутри одного рода *Rhododendron*.

Качественный состав и количественное содержание жирных кислот в листьях и стеблях *Rh. adamsii*

При исследовании жирных кислот (ЖК) листьев и стеблей *Rh. adamsii* методами ГХ и ГХ/МС оказалось, что присутствие в этом растении большого количества летучих компонентов терпенового ряда усложняет хроматограмму. Это препятствует идентификации и определению количественного содержания ЖК (в виде метиловых эфиров), особенно если содержание какого-либо компонента не превышает 1%. Мы обнаружили, что после гидродистилляции растительного сырья, т.е. удаления из него эфирного масла, состав суммарного липидного экстракта значительно упрощается. В результате разрешение пиков на газовой хроматограмме полученного экстракта значительно улучшается, что позволяет не просто идентифицировать соединения по масс-спектрам, но и определить содержание даже их следовых количеств. Мы осуществляли выделение липидных экстрактов и содержание жирных кислот в рододендроне Адамса по схеме, приведенной на рис. 3.

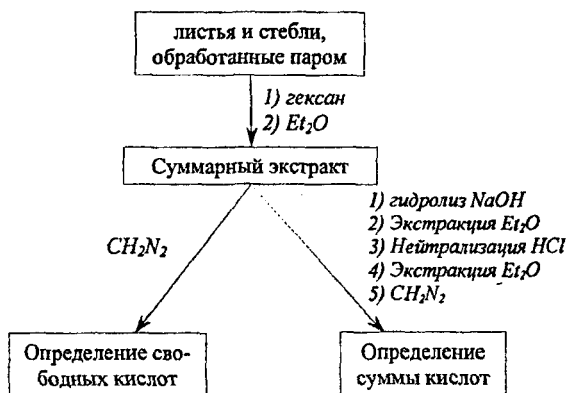


Рис. 3. Схема определения количественного содержания жирных кислот в листьях и стеблях *Rh. adamsii*

По данным ГХ и ГХ/МС, в листьях и стеблях *Rh. adamsii* в свободном виде присутствуют практически все кислоты с числом атомов углерода от 12 до 30, включая нечетные, в том числе изо-жирные кислоты. Доля свободных кислот от массы листьев составляет 3.6%, а стеблей – 1.2%, суммарное содержание жирных кислот в листьях составляет 6.2%, в стеблях – 2.4% от массы сырья. В свободном виде в листьях рододендрона Адамса наибольшее относительное содержание имеет бегеновая кислота (C22, 1.9%). Содержание остальных кислот находится в интервале 0.1 – 1.0%, некоторые кислоты (C13-изо, C15-изо и др.) присутствуют в следовых количествах (табл. 2). В стеблях как среди свободных, так и среди этерифицированных кислот мажорной является линолевая кислота (C18:2). Совместно с линоленовой кислотой (C18:3) они составляют основную массу всех кислот стеблей растения. Помимо указанных, можно отметить повышенное содержание кислот с четным числом атомов углерода от C16 до C24; содержание остальных составляет 1% и менее.

Впервые в представителе рода *Rhododendron* были обнаружены две кислоты, имеющие циклопропановый фрагмент, — цис-циклопропан-9,10-гексадекановая (3) и цис-циклопропан-9,10-октадекановая (4, рис. 4).

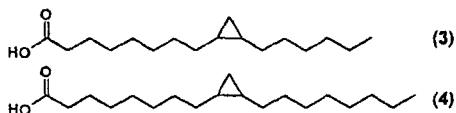


Рис. 4. Жирные кислоты с циклопропановым фрагментом, выделенные из *Rh. adamsii*

Их относительное содержание составляет 0.2% и 0.5% массы липидов листьев и 0.2% и 0.1% липидного экстракта стеблей соответственно. Обнаружена также нонандиовая кислота, а среди ароматических кислот — 4-гидрокси-, 3-метокси-4-гидрокси- и 3,4-диметоксикоричные кислоты. Они находятся в основном в этерифицированном виде, а их суммарное содержание не превышает 1% массы всех кислот.

Табл. 2. Времена удерживания и относительное содержание (масс. %) метиловых эфиров жирных кислот в экстрактах листьев и стеблей *Rh. adamsii* по данным ГЖХ

Время, мин	Часть растения Определяемые кислоты (в виде метиловых эфиров)	Листья		Стебли	
		своб. (1а)	сумм. (1б)	своб. (2а)	сумм. (2б)
13.80	Изолауриновая (C12)	0.2	0.2	0.2	0.3
14.23	Лауриновая (C12)	0.2	0.6	0.2	0.3
14.50	Нонандиовая (C9)	0.3	0.1	0.3	0.2
14.95	Изотридекановая (C13)	<0.1	0.6	<0.1	0.3
16.05	Изомиристиновая (C14)	<0.1	0.2	<0.1	0.3
16.44	Миристиновая (C14)	0.1	1.3	0.1	0.4
17.10	Изопентадекановая (C15)	<0.1	0.5	-	<0.1
17.47	Пентадекановая (C15)	0.3	0.1	0.1	0.1
18.26	Пальмитолеиновая (C16:1 (7)*)	0.1	0.8	<0.1	0.7
18.47	Пальмитиновая (C16)	0.5	9.2	1.1	5.9
19.06	Изомаргариновая (C17)	0.1	0.8	-	0.1
19.18	Цис-циклопропан-9, 10-гексадекановая (C17)	0.1	0.2	-	0.2
19.40	Маргариновая (C17)	<0.1	0.3	<0.1	0.2
19.99	Изоолеиновая (C18)	0.2	1.3	0.1	-
20.04	Линолевая (C18:2 (9, 12))	0.5	8.2	2.4	31.0
20.11**	Линоленовая (C18:3 (9, 12, 15))	0.9	12.6	1.3	15.1
20.11**	Олеиновая (C18:1 (9))	следы	1.9	0.5	3.9
20.30	Стеариновая (C18)	0.4	2.8	0.5	1.5
20.86	Изононадекановая (C19)	0.4	3.2	<0.1	1.0
21.00	Цис-циклопропан-9,10-октадекановая (C19)	-	0.5	-	0.1
21.17	Нонадкановая (C19)	0.4	0.4	0.2	0.1
21.80	C20:1 (11)	0.3	0.6	-	0.6
22.00	Арахидиновая (C20)	0.3	2.5	0.6	2.0
22.50	Изогенойкозановая (C21)	0.2	0.7	<0.1	0.4
22.80	Генойкозановая (C21)	0.3	0.3	0.1	0.3
23.39	Эруковая (C22:1 (13))	0.3	0.2	-	0.2
23.57	Бегеновая (C22)	1.9	3.1	0.8	1.3
24.31	Трикозановая (C23)	1.2	0.6	0.8	0.2
25.03	Лигноцериновая (C24)	1.0	3.1	1.4	1.2
25.96	Пентакозановая (C25)	1.3	0.2	-	-
26.67	Церотиновая (C26)	0.4	0.5	1.2	0.4
28.49	Монтановая (C28)	0.8	<0.1	-	-
29.87	Мелиссовая (C30)	<0.1	<0.1	-	-
	Всего:	12.6	57.7	11.9	68.3

* В скобках указано положение двойной связи C=C.

** Олеиновая и линоленовая кислоты вышли в одном газохроматографическом пике. Их суммарное содержание определено методом ГЖХ, а мольное соотношение оценено по масс-спектрометрическим данным.

Количественное определение урсоловой и олеаноловой кислот в некоторых представителях семейства Ericaceae

Продолжая исследования химического состава рододендрона Адамса, мы определили содержание важных тритерпеновых метаболитов – урсоловой (УК, 5) и олеаноловой (ОК, 6) кислот (рис. 5), которые являются характерными для растений семейства вересковых.

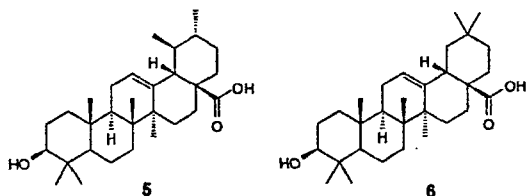


Рис. 5. Урсоловая (5) и олеаноловая (6) кислоты

Мы разработали методику определения количественного содержания этих кислот и апробировали ее не только на рододендроне Адамса, но и на других представителях семейства Ericaceae – ягодах красники (*Vaccinium praestans*) и клюкве (*Oxycoccus palustris*).

Количественное содержание суммы тритерпеновых кислот мы определяли методом ВЭЖХ, предварительно установив коэффициент массовой экстинкции урсоловой кислоты, а соотношение количества урсоловой кислоты к олеаноловой кислоте — методом ГХ и ГХ/МС. Схема, по которой велось определение, приведена на рис. 6.



Рис. 6. Схема определения количественного содержания тритерпеновых кислот в растительном сырье

Содержание УК и ОК в *Rh. adamsii* не превышает 0.1% (табл. 3), а соотношения УК/ОК для листьев и стеблей близки. В краснике (*Vaccinium praestans*) общее содержание этих кислот выше, чем в клюкве (*Oxycoccus palustris*), причем доля урсоловой кислоты также больше в *Vaccinium praestans*. В результате проделанной работы была показана возможность применения тандемной (ВЭЖХ – ГХ) методики для определе-

ния УК и ОК. Впервые было определено содержание УК и ОК в краснике и показано, что эта ягода может служить перспективным сырьем для их выделения.

Табл. 3. Данные по количественному содержанию урсоловой и олеаноловой кислот в исследованном сырье

Сырье	исследованном сырье			
	<i>Rhododendron adamsii</i> листья	<i>Rhododendron adamsii</i> стебли	<i>Vaccinium praestans</i>	<i>Oxycoccus palustris</i>
Соотношение УК/ОК	2.2	2.5	4.7	4.1
Массовая доля УК и ОК в сырье, %	0.09	0.04	0.4	0.3

Количественное содержание основных флавоноидов листьев и стеблей *Rhododendron adamsii*

Для извлечения суммы флавоноидов из *Rh. adamsii* мы применяли многократную экстракцию 70%-м водным этанолом с контролем полноты извлечения по ВЭЖХ. Данные аналитических хроматограмм полученных экстрактов мы использовали для определения нативных флавоноидов, суммарное содержание агликонов устанавливали после кислотного гидролиза экстрактов (рис. 7).



Рис. 7. Схема количественного определения флавоноидов методом ВЭЖХ

Методом ВЭЖХ сравнением со стандартными веществами мы показали, что мажорными флавоноидами листьев и стеблей *Rh. adamsii* являются мирицетин (7), кверцетин (8), а также впервые обнаруженные в этом растении дигидрокверцетин (ДГК, 9) и рутин (10).

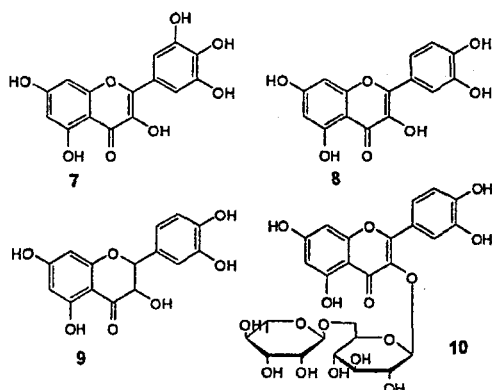


Рис. 8. Мажорные флавоноиды *Rh. adamsii*: миритетин (7), кверцетин (8), дигидрокверцетин (ДГК, 9), рутин (10)

В листьях и стеблях рододендрона Адамса миритетин присутствует в основном в свободном, а не гликозилированном состоянии, а его суммарное содержание не превышает 1.1% (табл. 4). Содержание рутина (кверцетин-3-рамнозилглюкозида), определенное методом ВЭЖХ, составляет не более 1.1% и 0.8% от массы листьев и стеблей соответственно. Содержание нативного кверцетина в листьях и стеблях растения составляет около 0.2% и 0.3% соответственно. После кислотного гидролиза содержание этого флавоноида увеличивается за счет распада его гликозидов, в основном, рутина. Мы полагаем, что помимо рутина в *Rh. adamsii* присутствуют также другие гликозиды кверцетина, в частности, авикулярин (кверцетин-3- α -L-арабинозид), гиперозид (кверцетин-3-галактозид) и изокверцитрин (кверцетин-3-глюкозид), обнаруженные в этом растении ранее [Мирович В. М. и др., *Материалы междунар. совещания «Физиолого-биохимические аспекты изучения лекарственных растений»*, Новосибирск, Изд-во СО РАН, 1998, с. 40].

Образец	Флавоноиды и их содержание, мас. %			
	М	К	Р	ДГК
НГ (листья)	1.66±0.06	0.17±0.01	1.08±0.05	0.40±0.02
Г (листья)	1.13±0.04	1.01±0.04	-	0.33±0.04
НГ (стебли)	1.10±0.04	0.30±0.01	0.77±0.03	1.70±0.01
Г (стебли)	1.06±0.04	0.98±0.06	-	2.46±0.11

Примечания: 1) НГ – не гидролизованный экстракт; Г – гидролизованный экстракт;
2) М – миритетин, К – кверцетин, Р – рутин, ДГК – дигидрокверцетин.

Суммарное содержание дигидрокверцетина в листьях растения составляет около 0.3% от массы сырья. Содержание нативного ДГК в листьях и стеблях рододендрона

рона Адамса составляет не более 0.3% и 1.7% по массе соответственно, а его определение методом ВЭЖХ осложняется другими соединениями, имеющими близкое время удерживания. После гидролиза вклад мешающих веществ уменьшается, и спектральные отношения приближаются к стандартным. Суммарное содержание ДГК в стеблях после гидролиза оказалось неожиданно высоким и составило около 2.5% от массы сырья.

Мио-инозитол и ацетамид в листьях *Rh. adamsii*

При хранении изопропанольного экстракта листьев рододендрона Адамса из концентрированного раствора выпали бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде. После повторной кристаллизации были получены монокристаллы вещества, исследованные методом РСА. Сравнением параметров ячейки полученных кристаллов с Кембриджской базой данных было показано, что выделенным веществом является мио-инозитол (11, рис. 9).

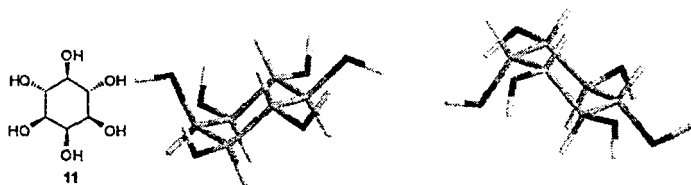


Рис. 9. Структурная формула мио-инозитола (11) и упаковка его молекул в кристалле

Из бензольного экстракта после многократных рехроматографий на обращенно-фазном сорбенте был выделен ацетамид, содержание которого составляет около 0.1% от массы сырья.

Некоторые пренилированные производные фенолов *Rhododendron adamsii*

Из гексанового экстракта листьев растения колоночной хроматографией на силикагеле был выделен метиловый эфир каннабигерорциновой кислоты 12 (рис. 10), содержание которого составляет не менее 1% массы сырья. Он является пренилированным производным метилового эфира орселлиновой кислоты, ранее выделявшейся только из грибов и лишайников. Наряду с соединением 12, из гексанового экстракта рододендрона Адамса был получен 1-(3-метилбутаноил)-1а,4а,7-триметил-1,1а,1а¹,2,3,4,4а,9b-октагидроциклобута[kl]ксантен-9-ол 13 (рис. 10), в литературе нами не найденный.

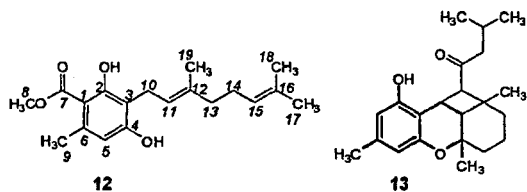


Рис. 10. Структурные формулы метилового эфира каннабигероциновой кислоты **12** и каннабиолола **13**

Строение соединений **12** и **13** было установлено на основании данных спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C с привлечением спектров двойного резонанса ^1H - ^1H и спектров ^{13}C , записанных в режиме J-модуляции, с внерезонансным облучением протонов, а также двумерных спектров ^{13}C - ^1H корреляции на прямых константах и двумерных и одномерных спектров ^{13}C - ^1H корреляции на дальних константах спин-спинового взаимодействия. Указанное расположение заместителей в ароматическом кольце эфира **12** подтверждено также расчетами значений химических сдвигов атома водорода H^5 в спектре ЯМР ^1H и атомов углерода C^1 - C^6 в спектре ЯМР ^{13}C , проведенных с учетом аддитивного влияния заместителей. Транс-замещение связи C^{11} - C^{12} сделано на основании химических сдвигов атомов углерода C^{13} и C^{19} в спектре ЯМР ^{13}C .

В масс-спектре соединения **13** наблюдается слабый молекулярный ион $[\text{M}^+]$ 342 и интенсивный осколок с m/z 175, соответствующий фрагменту $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2$, показанному на рис. 10 жирными линиями; абсолютная конфигурация хиральных центров этого соединения пока не определена.

Из бензольного экстракта листьев рододендрона Адамса мы выделили даурихроменовую кислоту **14** (рис. 11), впервые найденную в рододендроне даурском *Rh. dauricum* [Pat.

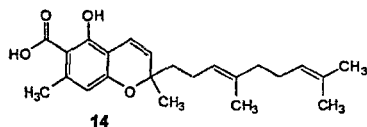


Рис. 11. Даурихроменовая кислота (**14**)

0057028080 Japan, 1982]. Это соединение проявляет анти-ВИЧ активность [Y. Kashiwada et al., *Tetrahedron*, 2001, 57, 1559]. Сигналы спектра ЯМР ^1H выделенного соединения имели значения хим. сдвигов, близкие к значениям, описанным в литературе, а его молекулярная масса, определенная методом ВЭЖХ/МС, равна 370. Наличие карбоксильной группы было подтверждено метилированием исходного соединения, в результате чего, по данным ВЭЖХ/МС, увеличивается молекулярная масса продукта реакции ($M = 384$) и его время удерживания на обращенно-фазном сорбенте.

Авторы работы [Y. Kashiwada et al., *Tetrahedron*, 2001, 57, 1559] впервые опи-

связают рододаурихромановую кислоту **15**, которую они сначала обнаружили в рододендроне даурском, а затем синтезировали из даурихроменовой кислоты **14**, облучая ультрафиолетом гексановый раствор последней (схема 1).

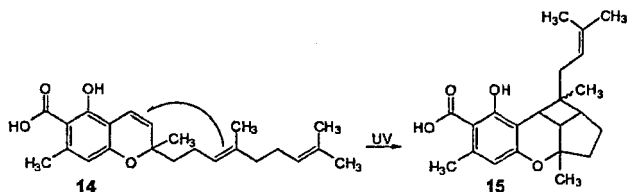


Схема 1

Учитывая сходство строения выделенного нами соединения **13** с рододаурихромановой кислотой **15**, мы полагаем, что оно образуется в *Rh. adamsii* из вещества **16** (схема 2), которое можно отнести к классу даурихроменов.

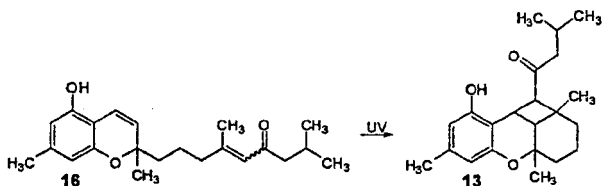


Схема 2

Так же, как и вещество **13**, соединение **16** в литературе не описано, но из рододендрона Адамса и других природных объектов ни нами, ни другими группами исследователей оно выделено не было.

Для соединений **12** и **13**, выделенных из рододендрона Адамса, проведены фармакологические исследования*, в ходе которых установлено, что соединение **13** усиливает гипотермический эффект L-Дофа (снижает температуру тела мышей), а также сокращает среднее протромбиновое время свертывания. Соединение **12** в вышеуказанных тестах, а также в экспериментах по определению антиоксидантной, гепатопротекторной (модель токсического CCl_4 гепатита) и противовоспалительной активности (модель гистаминового воспаления) эффекта не проявило.

Мы изучили некоторые химические превращения выделенных нами соединений **12** и **13**. При взаимодействии ксантена **13** с *n*-Br-фенацилбромидом в сухом ацетоне в присутствии карбоната калия происходила реакция по гидроксильной группе с образованием соответствующего замещенного производного **13a**. При обработке

* Описанные эксперименты были проведены сотрудниками Лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН под руководством д.б.н. Толстиковой Т. Г.

вещества **13** диоксандибромидом происходит замещение атомов водорода ароматического кольца с образованием дибромпроизводного **13b** (рис. 12). Соединение **13b** при взаимодействии с *n*-Вг-фенацилбромидом, аналогично исходному веществу **13**, образует производное **13c** с выходом около 65%. При растворении соединения **13** в 5%-м водном растворе гидроксида натрия и последующем добавлении хлористого бензоила к полученному раствору при охлаждении происходит образование соответствующего эфира бензойной кислоты **13d**. По данным анализа реакционной смеси методом ВЭЖХ, реакция полностью протекает за 3.5-4 часа при комнатной температуре. Масс-спектры производных **13a-d** имеют одинаковый вид: в них присутствует молекулярный ион M^+ слабой интенсивности и интенсивный осколок, соответствующий фрагменту $C_{11}H_8O_2X_2R$.

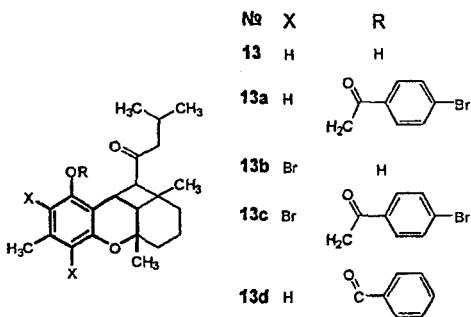


Рис. 12. Ксантоен **13** и его производные **13a-d**

Взаимодействие метилового эфира **12** с бромом приводит к образованию сложной смеси продуктов, близких по строению, что было обнаружено анализом реакционной смеси методом ВЭЖХ. Обработкой метилового эфира **12** избытком хлористого ацетила и хлористого бензоила были получены производные **12a, b** (схема 3) с выходом 89% и 31% соответственно.

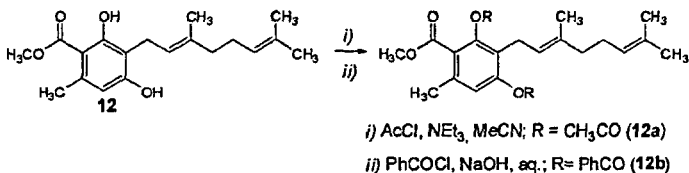


Схема 3

Все соединения, полученные нами в результате химической трансформации выделенных из рододендрона Адамса веществ **12** и **13**, ранее описаны не были.

Выводы

- 1 Впервые проведено систематическое исследование качественного и количественного химического состава рододендрона Адамса *Rh. adamsii* Rehder. Предложена экстракционная последовательность растворителей, позволяющая достаточно эффективно извлекать метаболиты данного растения.
- 2 Исследован химический состав и определено количественное содержание эфирного масла в листьях и стеблях *Rh. adamsii*, а также, для сравнения, *Rh. aureum* и *Rh. dauricum*. Установлено, что основными компонентами масел являются моно- и сесквитерпены и терпеноиды, среди которых в рододендроне Адамса преобладают β -фарнезен, аромадендрен и транс-неролидол. Показано, что эфирные масла исследованных рододендронов различаются по своим макрокомпонентам.
- 3 Впервые исследован качественный состав и определено массовое содержание жирных кислот листьев и стеблей *Rh. adamsii*, которое составило 6.2% и 2.4% соответственно. Установлено, что среди свободных кислот в листьях растения преобладает бегеновая, а в стеблях - линолевая кислоты (относительное содержание 1.9% и 2.4% соответственно). В связанном состоянии в листьях растения наибольшим относительным содержанием обладает линоленовая (12.6%), в стеблях - линолевая (31.0%) кислоты. Впервые в представителе рода *Rhododendron* обнаружены кислоты с циклопропановым фрагментом (относительное содержание 0.1-0.5%).
- 4 В листьях и стеблях рододендрона Адамса определено массовое содержание урсоловой и олеаноловой кислот, которое составило 0.09% и 0.04% соответственно.
- 5 Методом ВЭЖХ показано, что основными флавоноидами рододендрона Адамса являются мирицетин, кверцетин, дигидрокверцетин и рутин, и определено их массовое содержание. Установлено, что в листьях растения преобладают мирицетин и кверцетин, а в стеблях - дигидрокверцетин (1.1%, 1.0% и 2.5% от массы сырья соответственно). Впервые в рододендроне Адамса обнаружены дигидрокверцетин и рутин, а также мио-инозитол и ацетамид.
- 6 Впервые из *Rhododendron adamsii* Rehder выделены три соединения, принадлежащие классу пренилированных фенолов: даурихромоновая кислота, метиловый эфир каннабигерорциновой кислоты, впервые обнаруженный в природном источнике, а также новое соединение - 1-(3-метилбутаноил)-1a,4a,7-триметил-1,1a,1a¹, 2,3,4,4a,9b-октагидроциклобута[kl]ксантен-9-ол, - которое проявляет гипотерми-

ческую и коагулирующую активность. Для метилового эфира каннабигерорциновой кислоты и впервые обнаруженного ксангенола была проведена химическая модификация, в результате которой получено 6 новых соединений.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Рогачев, А. Д., Фоменко, В. В., Сальникова, О. И., Покровский, Л. М., Салахутдинов, Н. Ф. Сравнительный анализ химического состава эфирных масел листьев и стеблей *Rhododendron adamsii*, *Rh. aureum* и *Rh. dauricum* // *Химия природ. соединений*. – 2006. – № 4. – С. 344-347.
2. Рогачев, А. Д., Комарова, Н. И., Морозов, С. В., Фоменко, В. В., Салахутдинов, Н. Ф. Фитохимическое исследование рододендрона Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. Количественное определение урсоловой и олеаноловой кислот в некоторых представителях семейства Ericaceae // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2007. – Т. 15. – № 5. – С. 571-574.
3. Рогачев, А. Д., Морозов, С. В., Вялков, А. И., Фоменко, В. В., Салахутдинов, Н. Ф. Фитохимическое исследование рододендрона Адамса *Rhododendron adamsii* Rehd. Количественное содержание жирных кислот в листьях и стеблях // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2007. – Т. 15. – № 5. – С. 575-579.

Формат бумаги 60x84 1/16. Объем 1 печ. л.
Тираж 100 экз.

Отпечатано на ротапринте Новосибирского института
органической химии СО РАН им. Н. Н. Ворожцова.
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 9.