

54

A 82

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

Г.М.Фролова

ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОЗИДОВ
ЭЛЕУТЕРОКОККА КОЛОЧЕГО (*ELEUTHEROCOCCUS SENTICOSUS* MAXIM.)

Владивосток
1971

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

На правах рукописи

Г.М.Фролова

ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОЗИДОВ
ЭЛЕУТЕРОКОККА КОЛОЧЕГО (*ELEUTHEROCOCCUS SENTICOSUS* MAXIM.)

Химия природных и физиологически
активных веществ № 02.079

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Владивосток
1971

ВЛАДИВОСТОК
1971

СК
Работа выполнена в Институте биологически активных веществ Дальневосточного научного центра АН СССР.

Научный руководитель - кандидат химических наук, старший научный сотрудник Ю.С.ОВОДОВ

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Н.К.Абубакиров,
кандидат химических наук
О.Б.Максимов

Ведущее предприятие - Институт органической химии (г. Иркутск)

Автореферат разослан ²⁵ марта 1971 г.

Защита диссертации состоится "___" апреля 1971 г. на заседании секции химических наук Объединенного Ученого Совета Дальневосточного научного центра АН СССР.

Отзывы в двух экземплярах просим направлять по адресу: Владивосток-22, Институт биологически активных веществ ДВНЦ АН СССР, Ученому секретарю.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Дальневосточного научного центра АН СССР.

Ученый секретарь совета
к.х.н.

Н.И.Уварова

Центральная научная
БИБЛИОТЕКА
Академии наук Киргизской ССР

54
A82

Среди лекарственных растений Дальнего Востока особое место занимает представители уникального семейства аралиевых, отличающиеся высокой физиологической активностью. Некоторые растения этого семейства, благодаря своим исключительным тонизирующим и стимулирующим свойствам, с успехом используются как стимуляторы центральной нервной системы.

Широким спектром физиологического действия обладают препараты из корней и листьев еще одного представителя семейства аралиевых, элеутерококка кольчатого (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.), запасы которого на Дальнем Востоке огромны. Фармакологическое изучение показало, что биологической активностью указанных препаратов, в основном, обладают их гликозидные фракции, химическое исследование которых ранее не проводилось.

Систематическое химическое изучение растений семейства аралиевых показало, что эти растения интересны не только своей высокой биологической активностью, но и разнообразием гликозидов, входящих в их состав.

По характеру гликозидов, входящих в состав корней указанных растений, все семейство аралиевых можно разбить на три группы. Особую группу составляет женьшень, корни которого содержат гликозиды тетрациклических тритерпенов даммаранового ряда. Различные виды атрактылы и калопанака семиплодный представляют вторую группу аралиевых: в корнях этих растений при-
2 зак. 7868

сутствуют гликозиды пентацимических тритерпенов-олеаноловой кислоты и хедерагенина. Наконец, в состав третьей группы входят акантопанакс скученноцветковый и заманиха высокая. В корнях этих растений обнаружены в качестве основных компонентов гликозидных фракций фенольные гликозиды.

В связи с этим, изучение химического строения гликозидов элеутерококка колючего представляет несомненный принципиальный интерес, так как позволит найти место этих соединений в ряду гликозидов других растений семейства аралиевых, а так же подойти к выяснению связи между структурой гликозидов и их биологической активностью.

Целью настоящей работы явилось изучение строения гликозидов, выделенных из корней и листьев элеутерококка колючего. Предварительное исследование показало, что в состав гликозидной фракции корней этого растения входит, главным образом, биогенетически связанная группа фенольных соединений, а в листьях элеутерококка содержатся преимущественно тритерпеновые гликозиды.

Обсуждению полученных результатов в работе предшествует литературный обзор, посвященный рассмотрению основных вопросов структурной химии фенолпропаноидов, кумаринов и лигнанов. В данном обзоре основное внимание обращено на физико-химические методы исследования этих соединений, поскольку эти методы широко использовались в данной работе. Приведены также результаты структурного изучения этого класса природных гликозидов. Кроме того, кратко рассмотрены итоги исследования тритерпеновых гликозидов олеаноловой кислоты.

I. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОЗИДОВ КОРНЕЙ ЭЛЕУТЕРОКОККА

Для получения суммарной гликозидной фракции, а затем и индивидуальных гликозидов, широко использовались распределительная и адсорбционная хроматография. Суммарная гликозидная фракция, свободная от фенольных веществ и резервных сахаров, была получена в результате препаративного хроматографического разделения на окиси алюминия. Она содержала 8 гликозидов, названных нами в порядке увеличения полярности "элеутерозидами" А, В, В₁, С, D, Е, F и G. В процессе исследования была разработана другая схема получения суммарной гликозидной фракции, исключая препаративную хроматографию на окиси алюминия. В основе этой схемы лежит модифицированная методика получения сирингина.

Суммарная гликозидная фракция была разделена на индивидуальные компоненты с помощью адсорбционной хроматографии на силикагеле с использованием градиентной элюции смесями хлороформа и метанола. В хроматографически однородном состоянии выделены элеутерозиды А, В, В₁, С и Е, которые затем очищались перекристаллизацией.

Следует отметить, что содержание гликозидов В, В₁ и Е, как правило, значительно превышает содержание остальных элеутерозидов, причем, элеутерозиды В и В₁, в основном, аккумулируются в коре корней и стеблей, в то время как элеутерозид Е - в сердцевине. Количество элеутерозидов А и С колеблется очень сильно, и в некоторых партиях сырья нам не удалось об-

наружить эти гликозиды. Содержание алеутерозидов D, F и G слишком мало для их систематического изучения.

Интересно отметить, что в корнях алеутерококка не содержится тритерпеновых гликозидов, обнаруженных в других представителях семейства аралиевых.

Некоторые цветные реакции, а также первые спектроскопические данные позволили разделить все гликозиды на две группы. Это гликозиды ароматической природы, к которым можно отнести алеутерозиды B, B₁ и E, и гликозиды неароматической природы - алеутерозиды A и C.

Алеутерозид B (I), т.пл. 188-190°C / α /_D²⁰ - 21°, при гидролизе разбавленными кислотами образует глюкозу, причем, количественное определение глюкозы свидетельствует о присутствии одного моносахаридного остатка. Характерные полосы в ИК-спектре (1520, 1590 см⁻¹), а также общий вид УФ-спектра (λ max 265 мкм; $\lg \epsilon$ 4,31) и ЯМР-спектра (синглет при δ 6,6 мл) говорят об ароматическом характере соединения. Щелочной плава I приводит к получению галловой и сиреневой кислот, что свидетельствует о наличии в молекуле I сирингилового радикала. Строение этого радикала подтверждается данными ЯМР-спектроскопии.

Алеутерозид B (I) интенсивно поглощает бром, следовательно, в его молекуле присутствует кратная связь. Аналитическое гидрирование указывает на наличие одной двойной связи, а гидрирование в мягких условиях в среде водного этанола при комнатной температуре на Pt/C позволяет предположить, что двойная связь находится в сопряжении с кратными связями аромати-

ческого кольца.

Гликозид (I) гидролизуется как кислотами, так и щелочными агентами. Образующийся при этом генин отличается крайне высокой лабильностью. Все попытки получить нативный генин не привели к желаемому результату. При обработке I β -гликозидазой образуется, по крайней мере, три вещества, которые претерпевают изменения под действием света, воздуха и влаги, поэтому выделить их в нативном состоянии также не удалось. Во избежание дальнейшего превращения генина, продукты ферментолита I ацетилировали и подвергали хроматографическому разделению на силикагеле, в результате чего был выделен диацетат синапового спирта, идентифицированный с помощью данных ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Это позволяет предположить, что I представляет ранее найденный в природе сирингин - 4- β -гликозид синапового спирта. В связи с этим, из коры сирени был выделен заведомый образец сирингина. Действительно, по хроматографическому поведению, по константам и по характеру УФ-, ИК- и ЯМР-спектров оба соединения оказались идентичными.

Алеутерозид B₁ (II), т.п. 218°C, / α /_D²⁰ + 80°, флуоресцирует в ультрафиолетовом свете. В щелочной среде дает яркую желтую окраску, характерную для всех кумаринов, которая исчезает при подкислении. При кислотном и ферментативном гидролизе II образует генин, т.пл. 148-149°C, сильно флуоресцирующий в УФ-свете, и глюкозу.

Общий вид ИК-спектра указывает на наличие кумариновой системы в молекуле II. В ЯМР-спектре генина квадруплет при δ max. 7868

δ 6,2 и 7,6 мд. подтверждает присутствие кумариновой системы с незамещенным α -пировым кольцом. Остальные сигналы свидетельствуют о наличии в бензольном ядре исследуемого кумарина трех заместителей: двух метоксильных и одной гидроксильной групп, что находится в соответствии с аналитическими данными гликозида и его генина. Из кумаринов с такими заместителями выбор в пользу изофраксидина был сделан на основании данных УФ-спектров. УФ-спектр генина обнаруживает один максимум (λ_{\max} 345 мкм; $lg \epsilon$ 3,65). В щелочной среде наблюдается заметный bathochromный сдвиг и увеличение молярного коэффициента поглощения (λ_{\max} 400 мкм; $lg \epsilon$ 4,38). Кривые поглощения генина и изофраксидина по расположению полос поглощения в нейтральной и щелочной средах сходны между собой.

Аналитические данные указывают на то, что II представляет собой моногликозид, причем, остаток глюкозы присоединен к единственному гидроксигруппе при С-7 генина. Удельное вращение свидетельствует об α -конфигурации гликозидной связи.

Таким образом, на основании приведенных данных II является 7- α -гликозидом изофраксидина. 7- β -гликозид изофраксидина, $[\alpha]_D^{20} - 42^\circ$, был ранее выделен из ветвей *Calycantus occidentalis*.

Элеутерозид Е (III), т. пл. 247°C , $[\alpha]_D^{20} - 33^\circ$, по своему хроматографическому поведению близок акантозиду D -ди- β -D-гликозиду (-)-сирингарезинола, гликозиду коры акантопавса скученноцветкового. На идентичность гликозидов указывает также близость аналитических данных самого гликозида и его полного ацетата и данные ИК-спектров.

Элеутерозид Е (III) легко гидролизуется кислотами и щелочами. При этом в качестве единственного моносахарида образуется глюкоза. Мягкий кислый гидролиз III и акантозида D приводит к образованию одинаковых генинов. Общий вид УФ-спектров (λ_{\max} 234, 271 мкм; $lg \epsilon$ 4,2; 3,6) также указывает на идентичность этих соединений.

Известно, что ферментативный гидролиз акантозида D приводит к нативному генину, (-)-сирингарезинолу, в то время как эпи-форма получается в более жестких условиях гидролиза. Stereoхимия этих эпимеров была четко определена с помощью ЯМР-спектроскопии, которая в настоящее время является основным методом определения абсолютной конфигурации лигнанов ряда 2,6-дифенил-3,7-диоксабицикло-/3,3,0/-октана. При ферментативном гидролизе III получен генин, имеющий диэкваториальную конфигурацию ароматических колец, о чем свидетельствует данные ЯМР-спектроскопии.

Таким образом, на основании приведенных данных можно сделать вывод, что генином элеутерозида Е является (-)-сирингарезинол.

Элеутерозид А (т. пл. 295°C , $[\alpha]_D^{20} - 35^\circ$) и элеутерозид С (т. пл. 140°C , $[\alpha]_D^{20} + 186^\circ$) по хроматографическому поведению, по константам и по данным ИК-спектроскопии идентичны, соответственно, даукостерину и этил- α -D-галактозиду. Структура последнего подтверждается также данными ЯМР-спектра.

II. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОЗИДОВ ЛИСТЬЕВ ЭЛЕУТЕРОКОККА

Предварительное хроматографическое исследование метанольного экстракта показало, что в листьях отсутствуют фенольные гликозиды, обнаруженные в корнях растения. Помимо пигментных веществ, они содержат гликозиды тритерпеновой природы, при кислом гидролизе которых образуется один и тот же генин, т. пл. 287-288°C, $[\alpha]_D^{20} + 67^\circ$. Последний по свойствам, константам и характеру ИК- и масс-спектров идентичен заведомому образцу олеаноловой кислоты. В связи с этим, исследуемые гликозиды были названы по мере увеличения полярности "олеанолозидами" H_0 , H_1 и H_2 .

Разработан способ выделения суммарной гликозидной фракции, основанный на различной растворимости этих гликозидов в воде. Для получения индивидуальных олеанолозидов была использована распределительная хроматография на силикагеле с градиентной элюирующей смесью хлороформа и метанола. В результате получены: олеанозид H_0 , представляющий собой смесь очень близких по своему хроматографическому поведению соединений - олеанозид H_{01} (IV) и олеанозид H_{02} (У); олеанозид H_1 (VI), т. пл. 200-202°C, $[\alpha]_D^{20} - 21^\circ$, и олеанозид H_2 (VII), т. пл. 217°C, $[\alpha]_D^{20} - 18^\circ$.

Для определения качественного моносахаридного состава был проведен гидролиз олеанолозидов с последующим выделением индивидуальных моносахаридов. Идентификации полученных моносахаридов проводили с помощью хроматографии на бумаге (БХ)

и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) соответствующих триметилсилиловых эфиров. В результате было показано, что в состав IV и У входят остатки L-рамнозы и L-арабинозы; VI и VII содержат, кроме того, остатки D-глюкозы.

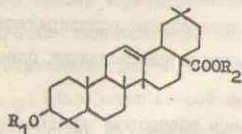
Из данных элементарного анализа гликозидов и их полных ацетатов, а также из значений молекулярных весов, определенных по выходу генина, следует, что IV и У являются биозидами, а VI и VII пентазидами олеаноловой кислоты. Количественное определение моносахаридов с помощью ГЖХ показало, что в состав VI и VII остатки арабинозы, рамнозы и глюкозы входят в приблизительном отношении 1:2:2. Эти данные служат подтверждением того, что указанные олеанолозиды являются пентазидами олеаноловой кислоты.

При обработке VI и VII метанольным раствором диазметана с последующим гидролизом образующихся соединений была обнаружена олеаноловая кислота, в то время как IV и У в аналогичных условиях образуют метиловый эфир олеаноловой кислоты. Эти данные указывают на то, что в VI и VII одна из углеводных цепей связана O-ацилгликозидной связью с генином, в отличие от IV и У, где присутствует свободная карбоксильная группа.

В результате избирательного щелочного расщепления O-ацилгликозидной связи олеанолозида H_1 (VI) и олеанолозида H_2 (VII) были получены, соответственно, олеанозид H_{01} (Ib), т. пл. 238-240°C, $[\alpha]_D^{20} + 9,7^\circ$, и олеанозид H_{02} (Y), т. пл. 220-221°C, $[\alpha]_D^{20} + 8,5^\circ$, что доказано сравнением хроматографического поведения, констант и результатами кислотного гидро-

лиза, и олигосахариды, состоящие из остатков L-рамнозы и D-глюкозы. Из этих данных вполне очевидно, что VI и VII отличаются от IV и V, соответственно, тем, что у них с карбоксильной группой генина связаны O-ацилглюкозидной связью трисахарида, в состав которых входят остаток рамнозы и два остатка глюкозы.

Таким образом, из вышеизложенных данных вытекает следующее частичное строение олеанолозидов:



- IV R₁=Ar, Rha; R₂=H.
- V R₁=Ar, Rha; R₂=H.
- VI R₁=Ar, Rha; R₂=G1, G1, Rha.
- VII R₁=Ar, Rha; R₂=G1, G1, Rha.

Для получения первых сведений о характере связей между углеводными остатками было проведено периодатное окисление олеанолозидов с последующим восстановлением боргидридом калия. При гидролизе полученных соединений наблюдается полный распад моносахаридных остатков, что указывает на отсутствие 1,3-гликозидных связей и разветвлений в углеводных цепях указанных гликозидов.

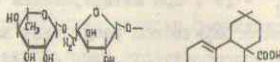
Дальнейшая информация о полном строении углеводной цепи олеанолозидов была получена путем идентификации метилированных моносахаридов, образующихся при гидролизе продуктов исчерпывающего метилирования. Наилучшие результаты метилирования были достигнуты при применении метода Куна с дополнительным

метилированием по методу Пурди. В результате были получены полностью метилированные олеанолозиды H_I (VIII), $[\alpha]_D^{20} - 11,5^\circ$, и H₂ (IX), $[\alpha]_D^{20} - 19^\circ$. При метилировании смеси IV и V и последующем хроматографическом разделении на силикагеле были выделены метилированные олеанолозиды H_{O1} (X), $[\alpha]_D^{20} + 4,2^\circ$, и H_{O2} (XI), $[\alpha]_D^{20} + 23^\circ$.

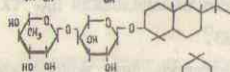
Идентификацию метилированных моносахаридов проводили путем сравнения констант и хроматографического поведения с заводскими образцами (BX и ГЖХ соответствующих метилгликозидов), а также с помощью реакции дополнительного метилирования и деметилирования. Структуры метилированных производных глюкозы были подтверждены также следующими превращениями: восстановлением боргидридом натрия и периодатным окислением образующегося метилированного полимола. В результате было показано, что в состав X и XI входит 2,3,4-три-O-метил-L-рамноза, кроме того, в гидролизате X обнаружена 2,3-ди-метил-L-арабиноза, в отличие от гидролизата XI, содержащего 3,4-ди-O-метил-L-арабинозу. Гидролизаты VIII и IX имеют в своем составе 2,3,4-три-O-метил-L-рамнозу, 2,3,4- и 2,3,6-три-O-метил-D-глюкозу и отличаются только содержанием производных арабинозы: гидролизат VIII, подобно X, содержит 2,3-ди-O-метил-L-арабинозу, а гидролизат IX, подобно XI, содержит 3,4-ди-O-метил-L-арабинозу.

Из полученных данных и результатов расчета молекулярного вращения по правилу Клайна следует, что олеанолозиды H_{O1} и H_{O2} различаются характером связи между моносахаридными остатками, и строение их может быть отобразено следующими структурами:

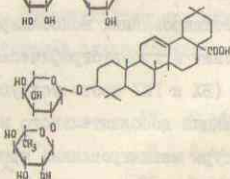
IVa



IVб



У



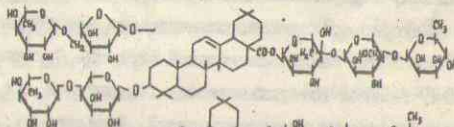
Поскольку размер окисного кольца 2,3-ди-О-метил- L-арабинозы определить не удалось, строение IV может быть представлено одной из двух возможных структур IVa или IVб. Но принимая во внимание близость хроматографического поведения и значений удельного вращения IV и У и учитывая присутствие в последнем арабоспиранозы, по-видимому, для IV следует предпочесть структуру IVб. Таким образом, олеанолозид H_{OI} (IV) представляет собой мубенин В, ранее выделенный из корней *Stauntonia hexaphylla*.

При сравнении метилированных моносахаридов, образующихся при гидролизе метилированных олеанолозидов H_I (VIII) и H_2 (IX), с одной стороны, и при гидролизе метилированных олеанолозидов H_{OI} (X) и H_{O2} (XI), соответственно, с другой, можно установить, что в состав метилированного трисахариды, связанного с карбоксильной группой генина, должны входить остатки 2,3,4-три-О-

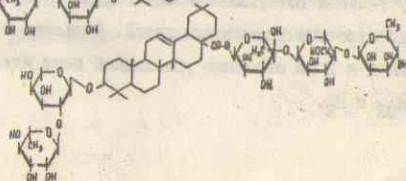
-метил- L-рамнозы, 2,3,4- и 2,3,6-три-О-метил- D-глюкозы. Для определения последовательности расположения метилированных производных глюкозы было проведено восстановительное расщепление О-ацетилгликозидной связи алмогидридом лития. Метилированные олеанолозиды H_I (VIII) и H_2 (IX) образуют один и тот же восстановленный метилированный трисахарид, при гидролизе которого были идентифицированы 2,3,4-три-О-метил- L-рамноза, 2,3,6-три-О-метил- D-глюкоза и 2,3,4-три-О-метилюксит. Отсутствие среди продуктов гидролиза 2,3,4-три-О-метил- D-глюкозы и одновременное наличие 2,3,4-три-О-метил-сорбита однозначно указывает на то, что остаток 2,3,4-три-О-метил- D-глюкозы связан О-ацетилгликозидной связью с карбоксильной группой генина.

На основании этих данных и результатов расчета молекулярного вращения по правилу Клайна олеанолозиды H_I (VI) и H_2 (VII) имеют следующее строение:

VI



VII



Олеанолозид H_2 идентичен ранее описанному хедерасапониу В, гликозиду из корней *Hedera helix*.

♦♦♦♦

Гликозиды корней элеутерококка колючего представляют собой биогенетически связанную группу фенольных соединений, родоначальником которой является сирингин (элеутерозид В). Гликозид изофраксидина (элеутерозид В₁) и дигликозид (-) - сирингарезинола (элеутерозид Е) представляют собой продукты дальнейшего превращения сирингина и, в частности, синапового спирта, являющегося его генином. По составу и строению элеутерозидов элеутерококка колючий близок акантопанаксу скученноцветковому и заманихе высокой.

Интересной особенностью листьев элеутерококка является наличие в них тритерпеновых гликозидов, в то время как фенольные гликозиды практически отсутствуют. К сожалению, листья других растений семейства аралиевых пока не изучались, тем не менее, гликозиды листьев элеутерококка имеют много общего с тритерпеновыми гликозидами, выделенными из корней растений этого семейства. Так, олеанолозид Н₂ полностью идентичен ранее описанному хедерасапониу В, пентазиду из плеча обыкновенного. Подобно арализидам, олеанолозиды элеутерококка представляют собой гликозиды олеаноловой кислоты. С калопапанаксапониами, генином которых является хедерагенин, их объединяет близость строения углеводных цепей. В частности, калопапанаксапонины А и В по строению углеводной цепи идентичны олеанолозидам Н₀₂ и Н₂.

ВЫВОДЫ

1. Разработана схема выделения индивидуальных гликозидов из корней элеутерококка колючего. В результате получено пять гликозидов, названных элеутерозидами А, В, В₁, С и Е.

2. Установлено строение элеутерозидов и показано, что они являются представителями разных классов природных соединений. Элеутерозид А идентичен даукостерину, элеутерозид С представляет собой α -этил- D-галактозид. Основные элеутерозиды В, В₁ и Е составляют биогенетически связанную группу фенольных гликозидов: сирингина, α -гликозида изофраксидина и дигликозида (-) - сирингарезинола, соответственно. По составу и строению элеутерозидов элеутерококка колючий близок акантопанаксу скученноцветковому и заманихе высокой.

3. Из листьев элеутерококка выделены гликозиды олеаноловой кислоты, названные олеанолозидами Н₀₁, Н₀₂, Н₁ и Н₂. Установлено их полное строение и показано структурное родство хедерасапониу В из плеча обыкновенного, арализидам из аралии манчурской и калопапанаксапониам из калопапанакса семилопатного.

Основной материал диссертации опубликован в следующих работах:

1. Ю.С.Оводов, Г.М.Фролова, Л.А.Елякова, Г.Б.Еляков, Изв. АН СССР, Серия хим., 1965, 2065.
2. Ю.С.Оводов, Р.Г.Оводова, Г.М.Фролова, IX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Наука, М. 1965, I4, стр. 10.
3. Ю.С.Оводов, Г.М.Фролова, М.Д.Нефедова, Г.Б.Еляков, ХПС, 1967, 63.
4. Ю.С.Оводов, Г.М.Фролова, А.К.Дзизенко, В.И.Литвиненко, Изв. АН СССР, Серия хим., 1969, 1370.
5. В.Ф.Лапчик, Г.М.Фролова, Ю.С.Оводов, Раст. ресурсы, 5, 455 (1969).
6. Г.М.Фролова, Ю.С.Оводов, Тезисы II Всесоюзного биохимического съезда, Ташкент, 1969, сек. 18, стр. 54.
7. Г.М.Фролова, Ю.С.Оводов, Н.И.Супрунов, ХПС, 1971, в печати.
8. Г.М.Фролова, Ю.С.Оводов, ХПС, 1971, в печати.

ВЛАДИВОСТОК ПОЛИГРАФКОМБИНАТ
ВД 02148 ЗАК.7868 ТИР.250 28/III-70 г.