

## АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

УДК 547.92.057

С. М. АДЕКЕНОВ<sup>1</sup>, А. М. АЛЬМАГАМБЕТОВ<sup>1</sup>, О. В. ГУЛЯКЕВИЧ<sup>2</sup>, В. Н. ЖАБИНСКИЙ<sup>2</sup>,  
А. М. КОЖАНОВА<sup>1</sup>, Б. И. ТУЛЕУОВ<sup>1</sup>, Б. К. ТУЛЕУОВА<sup>1</sup>, Г. ХАБДОЛДА<sup>1</sup>, В. А. ХРИПАЧ<sup>2</sup>СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ЭКДИСТЕРОИДОВ В РАСТЕНИЯХ  
*SILENE FRUTICULOSA* (PALL.) SCHISCHK<sup>1</sup>Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Республика Казахстан,<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 26.11.2013)

В настоящее время особо актуальны поиск и изучение новых видов растений, содержащих полиоксистероиды [1], что обусловлено широким спектром фармакологического действия этого важного класса природных соединений [2]. Перспективными являются растения родов Лихнис (*Lychnis* L.), смолевка (*Silene* L.) сем. Гвоздичных (*Caryophyllaceae* Juss.) и серпуха (*Serratula* L.), левзея (*Rhaponticum* Adans.) сем. Астровых (*Asteraceae* Dumort.), многие представители которых содержат широкий набор полиоксистероидов.

Несмотря на уникальность и богатое разнообразие местной флоры (более 6000 видов), работы по химии, технологии и фармакологии фитоэкдистероидов до 2005 г. в Казахстане не проводились. Учитывая острую необходимость разработки оригинальных отечественных адаптогенных, анаболических и тонизирующих средств, в последние годы начаты активные систематические исследования растений республики, перспективных в качестве сырья для получения экдистерона (20-гидроксиэкдизона) – действующего начала многих адаптогенных препаратов [3].

Цель настоящей работы – изучение экдистероидного профиля смолевки кустарничковой *Silene fruticulosa* (Pall.) Schischk, которая встречается на всей территории Казахстана в природных местообитаниях.

Высушенные на воздухе растения экстрагировали водным этанолом и далее полученный экстракт подвергали очистке от неполярных компонентов путем промывки смесью петролейного эфира с этилацетатом. Очистку от водорастворимых примесей осуществляли путем экстракции растворенной в воде экдистероидной фракции изобутанолом. Полученную смесь экдистероидов наносили на колонку с силикагелем, элюируя ступенчатым градиентом хлороформа с метанолом. Элюат из колонки порциями по 30 мл собирали в отдельные пробирки (первые 19 пробирок, содержащие только растворитель, были отброшены), которые объединили в 8 фракций, основываясь на данных ТСХ-анализа (таблица). Для всех фракций **Ф-1** – **Ф-8** были записаны <sup>1</sup>H ЯМР и масс-спектры, на основании которых фракции **Ф-1** – **Ф-4**, **Ф-6** были исключены из дальнейшего рассмотрения как не содержащие стероидов. Фракция **Ф-8** содержала индивидуальное соединение, структура которого доказана путем сравнительного анализа его <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C ЯМР-спектров. Они обнаружили полную идентичность с соответствующими спектрами, полученными для аутентичного образца экдистерона.

Дальнейшая работа с фракциями **Ф-5** и **Ф-7** предполагала их дополнительную очистку, однако повторная хроматография на силикагеле с использованием других растворителей не дала желаемых результатов. Решением проблемы стало ацетилирование фракций **Ф-5** и **Ф-7** с последующим выделением ацетатов и анализом последних методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. Достоинством такого подхода является возможность записи ЯМР-спектров образую-

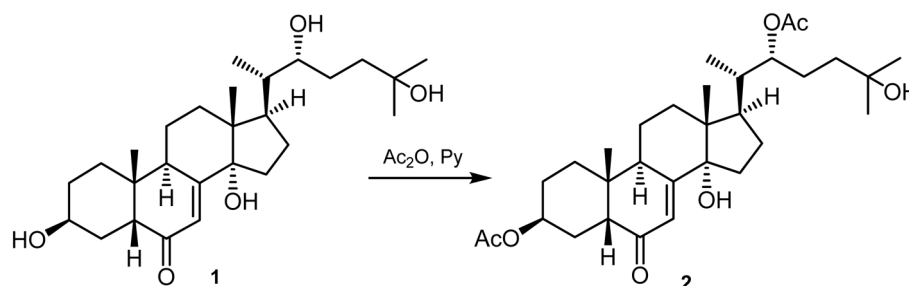
щихся ацетатов в дейтерохлороформе, что существенно облегчает их анализ (в большинстве случаев приемлемые спектры нативных экидистероидов могут быть записаны только в дейтеропиридине или дейтерометаноле, что ограничивает их диагностическую ценность).

Ацелирование фракции **Ф-5** ее обработкой уксусным ангидридом в пиридине в присутствии 4-*N,N*-диметиламинопиридина (DMAP) с последующей хроматографической очисткой привели к получению индивидуального соединения **2**. Наличие в его <sup>1</sup>H ЯМР спектре сигналов с δ 3.09 (м) и δ 5.84 (д, *J* = 1.9 Гц), принадлежащих соответственно протонам при С-9 и С-7, подтверждает присутствие в молекуле характерной для экидистероидов Δ<sup>7</sup>-6-кетогруппировки [1]. Синглеты с δ 2.04 и 2.05 в совокупности с однопротонными сигналами при 4.87 и 5.05 м. д. указывают на наличие в молекуле двух ацелированных вторичных гидроксильных групп. Величины химических сдвигов и мультиплетность сигналов указывают на их вероятное положение при С-3 (β-ОАс) и С-22 (β-ОАс) [4,5]. В <sup>13</sup>C ЯМР спектре соединения **2** в области δ 60–85 имеются сигналы четырех атомов углерода, смежных с гидроксильными (эфирными) группами. Это подтверждает наличие дополнительно двух третичных гидроксильных групп.

#### Результаты хроматографического разделения экстракта *Silene fruticulosa* (Pall) Schischk

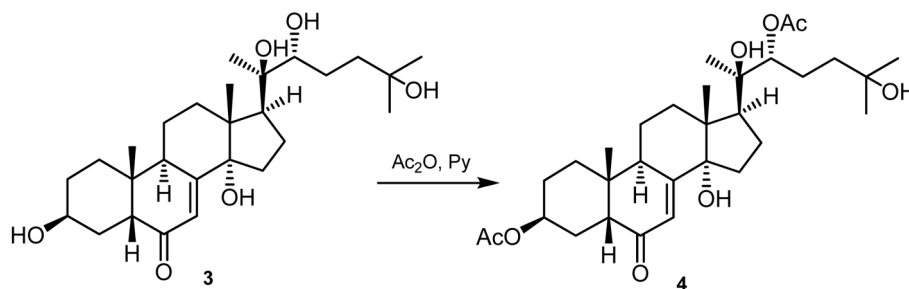
Фракция	Пробирки	Вес фракции, мг	R <sub>f</sub> в системе CHCl <sub>3</sub> -MeOH=4:1
<b>Ф-1</b>	20–27	54,0	–
<b>Ф-2</b>	28–32	16,3	–
<b>Ф-3</b>	33–39	27,7	–
<b>Ф-4</b>	40–46	40,9	–
<b>Ф-5</b>	47–49	60,8	0,50
<b>Ф-6</b>	50–51	12,6	0,4–0,5
<b>Ф-7</b>	52–56	52,2	0,44
<b>Ф-8</b>	57–62	117,6	0,22–0,47

Масс-спектр соединения **2** содержит пик молекулярного иона [M]<sup>+</sup> (*m/z* 532) и пики ионов [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, [M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, [M-АсОН+H]<sup>+</sup> и [M-H<sub>2</sub>O-АсОН+H]<sup>+</sup>, отвечающие отщеплению от протонированного молекулярного иона атомов воды и/или уксусной кислоты. Совокупность полученных спектральных данных позволила сделать предположение, что соединение **2** является 3,22-диацетатом 2-дезоксизекдизона. Анализ хромато-масс-спектрометрических данных фракции **Ф-5** до ее ацелирования показал наличие в смеси трех продуктов, причем в масс-спектре основного соединения присутствовал малоинтенсивный пик с *m/z* 448 ([M]<sup>+</sup>), а также пики с *m/z* 431 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100) и 413 ([M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 13). Данный факт является аргументом в пользу наличия в исходной смеси 2-дезоксизекдизона **1**, обнаруженного впервые в папоротнике *Blechnum minus* [6].



Ацелирование в аналогичных условиях фракции **Ф-7** также дало после хроматографической очистки индивидуальный маслообразный продукт. Его <sup>1</sup>H ЯМР спектр в области 3–6 м. д. оказался почти идентичен спектру диацетата **2**, что в дополнении к двум синглетам при δ 2.06 и 2.12 являлись указанием на наличие в молекуле соединения **4** двух ацетильных групп при С-3 и С-22. В отличие от диацетата **2**, в <sup>13</sup>C ЯМР спектре нового соединения **4** в области δ 60–85 (область гидроксильных групп или их эфиров) наблюдались не четыре, а пять сигналов, т. е. данное

соединение содержало три третичных гидроксильных группы. Сравнительный анализ спектров соединений **2** и **4** в области  $\delta$  0.9–1.3 показал, что сигналу 21-метильной группы в спектре диацетата **2** (0.93, д,  $J = 6.7$  Гц) отвечает синглет с  $\delta$  1.27 в спектре соединения **4**. Данный факт подтверждает наличие гидроксильной группы при С-20 в молекуле диацетата **4**. Масс-спектр данного соединения содержит протонированный пик молекулярного иона  $[M+H]^+$  ( $m/z$  549) и набор пиков, отвечающих элиминированию воды и/или уксусной кислоты. Основываясь на совокупности данных ЯМР- и масс-спектров, полученному соединению приписана структура **4**. Анализ хромато-масс-спектрометрических данных фракции **Ф-7** до ее ацетилирования показал наличие в масс-спектре основного соединения пика с  $m/z$  465 ( $[M+H]^+$ , 37), а также дегидратационных пиков с  $m/z$  447 ( $[M-H_2O+H]^+$ , 14) и 429 ( $[M-2H_2O+H]^+$ , 100). Данный факт является аргументом в пользу наличия в исходной смеси 2-дезоксидкестерона **3**, выделенный впервые из речного рака *Jacus lalandei* [7].



Таким образом, проведенное исследование показало, что надземные части смолевки кустарничковой *Silene fruticulosa* (Pall.) Schischk содержат экидистерон в качестве основного экидестероида (содержание 2.4 г/кг сухой массы), а также 2-дезоксидкестерон (0.45 г/кг) и 2-дезоксидкестерон (0.11 г/кг).

### Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ( $\delta$ , м. д.,  $J$ , Гц) записаны на приборе Bruker Avance DRX-500 (Германия) для растворов в  $CDCl_3$ . Химические сдвиги определяли относительно остаточных сигналов хлороформа. Масс-спектры получены на масс-спектрометре LCQ Fleet (Thermo Electron Corporation, США) в режиме химической ионизации при атмосферном давлении. Спектры положительных ионов анализировали при помощи программы Xcalibur. ТСХ осуществляли на хроматографических пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (VWR, Art. 7734).

**Выделение экидестероидсодержащей фракции *Silene fruticulosa* (Pall.) Schischk.** Высушенные на воздухе надземные части смолевки кустарничковой *Silene fruticulosa* (Pall.) Schischk сем. *Caryophyllaceae* Juss. (1.5 кг, собраны 20.08.2011 г. в фазу цветения на территории Карагандинской области Улытауского района) экстрагировали четырехкратно 70 %-ным водным этанолом путем нагревания на водяной бане. Полученный этанольный экстракт обрабатывали смесью петролейного эфира и этилацетата в соотношении 2:1 для удаления неполярных компонентов, оставшуюся водорастворимую часть экстрагировали изобутанолом. Изобутанольные экстракты объединяли, затем изобутанол отгоняли досуха под вакуумом. Получили сумму экидестероидов с сопутствующими веществами в виде густой зеленой сиропобразной массы в количестве 108.2 г.

**Хроматографическое разделение экидестероидсодержащей фракции.** Экстракт (3.5 г) растворяли в смеси хлороформ–метанол (150 мл, 1:1) в ультразвуковой бане. Полученный раствор с небольшой взвесью нерастворимого вещества смешивали с силикагелем и растворитель упаривали. Остаток наносили на колонку с силикагелем, элюируя смесью хлороформ – метанол (50:1 → 1:1). Элюат из колонки порциями по 30 мл собирали в отдельные пробирки (первые 19 пробирок были отброшены как не содержащие вещества), которые объединяли в 8 фракций, основываясь на данных ТСХ-анализа (таблица).

**Ацетилирование фракции **Ф-5**.** Раствор маслообразного продукта **Ф-5** (50 мг) и DMAP (2 мг) в пиридине (1 мл) и  $Ac_2O$  (0.5 мл) выдерживали при 40–45 °С в течение 5 ч. Затем растворитель

упаривали в вакууме, остаток наносили на колонку с SiO<sub>2</sub>. Элюировали смесью CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:1→30:1). Получено 26.2 мг (22*R*)-2β,22-диацетокси-5β-холест-7-ен-6-он-14α,25-диола **2** в виде масла. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.66 (с, 3H, 18-Me), 0.93 (д, *J* = 6.7 Гц, 3H, 21-Me), 0.97 (с, 3H, 19-Me), 1.21 (с, 3H, 26-Me), 1.23 (с, 3H, 27-Me), 2.04 (с, 3H, OAc), 2.05 (с, 3H, OAc), 2.35 (дд, *J* = 12.6, 3.9 Гц, 1H, C<sub>5</sub>-H), 3.09 (м, 1H, C<sub>9</sub>-H), 4.87 (д, *J* = 10.1 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 5.05 (уш. с, 1H, C<sub>3</sub>-H), 5.84 (д, *J* = 1.9 Гц, 1H, C<sub>7</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.39, 15.69, 20.50, 21.36, 21.91, 23.94, 25.36, 25.43, 28.93, 29.48, 29.89, 30.78, 31.90, 36.38, 39.01, 40.34, 47.31, 51.64, 67.66, 70.72, 77.20, 84.70, 121.28, 164.44, 170.46, 170.98, 203.01. MS (APCI<sup>+</sup>) *m/z* (%): 532.8 ([M]<sup>+</sup>, 15), 515.1 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100), 497.2 ([M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 46), 473.3 ([M-AcOH+H]<sup>+</sup>, 64), 455.6 ([M-H<sub>2</sub>O-AcOH+H]<sup>+</sup>, 95).

**Ацетилирование фракции Ф-7.** Раствор маслообразного продукта **Ф-7** (50 мг) и DMAP (2 мг) в пиридине (1 мл) и Ac<sub>2</sub>O (0.5 мл) выдерживали при 40–45 °С в течение 5 ч. Затем растворитель упаривали в вакууме, остаток наносили на колонку с SiO<sub>2</sub>. Элюировали смесью CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:1→30:1). Получено 6.5 мг (22*R*)-2β,22-диацетокси-5β-холест-7-ен-6-он-14α,20,25-триола **4**. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.86 (с, 3H, 18-Me), 0.98 (с, 3H, 19-Me), 1.21 (с, 3H, 26-Me), 1.23 (с, 3H, 27-Me), 1.27 (с, 3H, 21-Me), 2.06 (с, 3H, OAc), 2.12 (с, 3H, OAc), 2.32 – 2.43 (м, 1H, C<sub>5</sub>-H), 3.11 (с, 1H, C<sub>9</sub>-H), 4.80 – 4.90 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H), 5.08 (уш. с, 1H, C<sub>3</sub>-H), 5.86 (д, *J* = 2.1 Гц, 1H, C<sub>7</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.46, 20.53, 21.14, 21.38, 23.92, 24.75, 25.35, 28.87, 29.12, 29.68, 30.01, 31.27, 31.72, 36.42, 40.24, 47.69, 49.49, 51.70, 67.59, 70.60, 77.21, 79.54, 84.87, 121.56, 164.32, 170.46, 172.48, 202.87. MS (APCI<sup>+</sup>) *m/z* (%): 549.1 ([M+H]<sup>+</sup>, 41), 531.6 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100), 513.1 ([M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 36), 471.4 ([M-H<sub>2</sub>O-AcOH+H]<sup>+</sup>, 8), 453.4 ([M-2H<sub>2</sub>O-AcOH+H]<sup>+</sup>, 26).

## Литература

1. Ахрем А. А., Ковганко Н. В. Экидистероиды: химия и биологическая активность. Минск: Наука и техника, 1989.
2. Lafont R., Dinan L. // J. Insect. Sci. 2003. Vol. 3. P. 7.
3. Тулеуов Б. И. Стероидные соединения растений и лекарственные препараты на их основе. Поиск, химическая модификация и практические аспекты применения. Караганда: Гласир, 2009.
4. Bathori M., Girault J. P., Kalasz H., Mathe I., Lafont R. // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1997. Vol. 16. P. 327–336.
5. Suksamrarn A., Yingyongnarongkul B. // Tetrahedron. 1997. Vol. 53. P. 3145–3154.
6. Chong Y. K., Galbraith M. N., Horn D. H. S. // J. Chem. Soc. D. 1970. P. 1217–1218.
7. Galbraith M. N., Horn D. H. S., Middleton E. J., Hackney R. J. // Chem. Commun. (London). 1968. P. 83–85.

S. V. ADEKENOV, A. M. ALMAGAMBETOV, O. V. GULYAKEVICH, V. N. ZHABINSKII, A. M. KOZHANOVA,  
B. I. TULEUOV, B. K. TULEUOVA, G. KHABDOLDA, V. A. KHRIPACH

## COMPOSITION AND CONTENT OF ECDYSTEROIDS IN *SILENE FRUTICULOSA* (PALL.) SCHISCHK

### Summary

The ecdysteroid profile of *Silene fruticulosa* (Pall.) Schischk growing in Kazakhstan has been investigated. It has been shown that the plant contained ecdysterone (2.4 g/kg of dry weight), 2-deoxyecdysone (0.45 g/kg) and 2-deoxyecdysterone (0.11 g/kg).