

НОВИЙ СТЕРОЇДНИЙ ГЛІКОЗИД СУПЛІДЬ *ALLIUM CYRILLII*

Н.В.Толкачова, О.С.Шашков*, В.Я.Чирва**

Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр, Україна,
98648, Україна, АР Крим, м. Ялта, сел. Нікіта. E-mail: tolkacheva_n@mail.ru

* Інститут органічної хімії ім. М.Д.Зелінського РАН, Росія

** Таврійський національний університет ім. В.І.Вернадського, Україна

Ключові слова: супліддя *Allium cyrillii* Ten.; стероїдні глікозиди; комбінації двовимірних спектрів TOCSY і COSY

Стероїдні глікозиди є великим класом природних сполук із групи сапонінів, які привертають увагу дослідників завдяки широкому спектру біологічної активності та екологічній безпеці. Перспективними в плані пошуку сапоніновмісних видів є рослини роду *Allium*, які виростають у Криму. У результаті дослідження стероїдних глікозидів суплідь *Allium cyrillii* Ten. виділено новий спіростаноловий глікозид. Дані ¹H- та ¹³C ЯМР-спектрів свідчать про те, що сполука є похідною ряду спіростану. Після кислотного гідролізу за допомогою ТШХ шляхом порівняння з наперед відомими зразками моносахаридів було ідентифіковано тільки глюкозу. Хімічні зсуви всіх протонів вуглеводного залишку були встановлені за допомогою комбінації двовимірних спектрів TOCSY і COSY. ¹³C-хімічні зсуви сигналів їхніх відповідних атомів однозначно співвіднесені за допомогою двовимірного спектра HSQC. З'ясування положення гідроксильних груп при С-2 і С-6 атомах аглікону було виконано шляхом аналізу хімічних зсувів сигналу С-атома порівняно з літературними даними для незаміщених агліконних частин та з урахуванням значних позитивних α-ефектів гідроксилювання і невеликих, зазвичай негативних, β-ефектів. Аналіз спектрів ЯМР ¹³C виділеної сполуки та 24-гідроксипохідних засвідчив, що сигнал С-24 зазнає парамагнітного зміщення на +10,8 м.ч. Також спостерігається сильнопольний зсув сигналів С-23 і С-25. Кореляція між сигналом аномерного протона глюкози та С-24 аглікону у спектрі HMBC підтверджує місце приєднання залишку глюкози до аглікону. Таким чином, глікозид, виділений із суплідь *Allium cyrillii*, являє собою (24S,25S)-5α-спиростан-2α,3β,6β,24-тетраол-24-О-β-D-глюкопіранозид і є новою сполукою.

NEW STEROIDAL GLYCOSIDE OF *ALLIUM CYRILLII* RACEMES

N.V.Tolkachova, O.S.Shashkov, V.Ya.Chyryva

Key words: *Allium cyrillii* Ten. racemes; steroidal glycosides; combination of two-dimensional TOCSY and COSY spectra

Steroidal glycosides are the vast class of natural compounds from the group of saponins that attract attention of researchers due to the wide spectrum of their biological activity and ecological safety. Plants from *Allium* genus growing in the Crimea are promising as to search of species with saponins. As a result of research of steroidal glycosides of *Allium cyrillii* Ten. racemes a new spirostanol glycoside has been isolated. The ¹H- and ¹³C-NMR spectral data testify that this compound is a derivative of spirostan series. After acidic hydrolysis with the help of TLC only glucose has been identified by comparing to the samples of monosaccharides known beforehand. The chemical shifts of all protons of the carbohydrate residue have been determined by means of combination of two-dimensional TOCSY and COSY spectra. The ¹³C-chemical shifts of signals of their corresponding atoms are simply taken by means of the HSQC spectrum. The hydroxy groups position at C-2 and C-6 atoms of aglycone have been determined by the analysis of chemical shifts of C-atom signal comparing to the literary data for unsubstituted for aglycon parts and taking into account considerable positive α-effects of hydroxylation and little, usually negative, β-effects. Analysis of NMR ¹³C spectra of the compound isolated and 24 hydroxy derivative has shown that the signal of C-24 undergoes paramagnetic displacement in +10.8 ppm. The strong field change of signals of C-23 and C-25 also takes place. Correlation between the signal of the anomeric proton of glucose and C-24 aglycone in the HMBC spectrum confirms the site of addition of the glucose residue to aglycone. Thus, the glycoside isolated from *Allium cyrillii* racemes is (24S,25S)-5α-spirostan-2α,3β,6β,24-tetraol-24-O-β-D-glucopyranoside and it is a new compound.

НОВЫЙ СТЕРОИДНЫЙ ГЛИКОЗИД СОПЛОДИЙ *ALLIUM CYRILLII*

Н.В.Толкачёва, А.С.Шашков, В.Я.Чирва

Ключевые слова: соплодия *Allium cyrillii* Ten.; стероидные гликозиды; комбинации двумерных спектров TOCSY и COSY

Стероидные гликозиды являются обширным классом природных соединений из группы сапонинов, которые привлекают внимание исследователей благодаря широкому спектру биологической активности и экологической безопасности. Перспективными в плане поиска сапониновых видов являются растения рода *Allium*, произрастающие в Крыму. В результате исследования стероидных гликозидов соплодий *Allium cyrillii* Ten. выделен новый спиростаноловый гликозид. Данные ¹H- и ¹³C ЯМР-спектров свидетельствуют о том, что соединение является производным ряда спиростана. После кислотного гидролиза с помощью ТСХ путем сравнения с заранее известными образцами моносахаридов была идентифицирована только глюкоза. Химические сдвиги всех протонов углеводного остатка были установлены с помощью комбинации двумерных спектров TOCSY и COSY. ¹³C-химические сдвиги сигналов их соответствующих атомов однозначно отнесены с помощью двумерного спектра HSQC. Установление положения гидроксильных групп у С-2 и С-6 атомов агликона было выполнено путем

анализа химических сдвигов сигнала С-атома в сравнении с литературными данными для незамещенных агликонных частей и с учетом значительных положительных α -эффектов гидроксирования и небольших, обычно отрицательных, β -эффектов. Анализ спектров ЯМР ^{13}C выделенного соединения и 24-гидроксипроизводных показал, что сигнал С-24 испытывает парамагнитное смещение на +10,8 м.д. Также имеет место сильнополюсный сдвиг сигналов С-23 и С-25. Корреляция между сигналом аномерного протона глюкозы и С-24 агликона в спектре НМВС подтверждает место присоединения остатка глюкозы к агликону. Таким образом, гликозид, выделенный из соплодий *Allium syrii*, представляет собой (24S,25S)-5 α -спиростан-2 α ,3 β ,6 β ,24-тетраол-24-О- β -D-глюкопиранозид и является новым соединением.

Стероїдні глікозиди є великим класом природних сполук із групи сапонінів, які привертають увагу дослідників завдяки широкому спектру біологічної активності та екологічній безпеці [1].

Екстракти з різних рослин, які належать до родин *Amaryllidaceae*, *Dioscoreaceae*, *Alliaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, що містять стероїдні глікозиди, використовуються в традиційній медицині як протипухлинні, фунгіцидні, контрацептивні, антивірусні та цитотоксичні засоби [2-6]. Відомо також, що ці сполуки знижують рівень холестерину в крові та мають антиоксидантну активність [7, 8]. Крім того, стимулювання росту і фітоімунітету рослин стероїдними глікозидами дозволяє розглядати ці речовини як природні адаптогени [9].

Перспективними в плані пошуку сапоніновмісних видів є рослини роду *Allium*, які виростають у Криму, до того ж у літературі дані про стероїдні глікозиди більшості видів кримської цибулі відсутні. Саме тому вивчення хімічної структури стероїдних глікозидів представників родини *Alliaceae* є актуальним.

Продовжуючи вивчення стероїдних глікозидів цибулі Кирила (збільшеної) *Allium syrii* Ten. [10, 11], ми виділили із суплідь 0,015 г хроматографічно чистого глікозиду спіростанолового ряду. Після кислотного гідролізу за допомогою ТШХ шляхом порівняння з наперед відомими зразками моносахаридів було ідентифіковано тільки глюкозу.

Спектр сполук містить 27 сигналів атомів Карбону аглікону (табл. 1): 4 метильних (13,5; 14,9; 16,6; 17,6), 8 метиленових, 20 метинових та 3 четвертинних (37,7; 40,9; 111,6) атомів.

Дані ^1H - та ^{13}C ЯМР-спектрів свідчать про те, що сполука є похідною ряду спіростану, величина ^{13}C хімічного зсуву для атома С-22 дорівнює 111,6 м.ч. Величини хімічних зсувів С-5 (δ 48,5) С-9 (54,8) і С-19 (17,6) свідчать про *цис*-сполучення кілець А і В.

У спектрі ПМР глікозиду в області сильного поля чітко вирізняються сигнали чотирьох метильних груп: δ 0,79 (3H, s, Me-18), 1,43 (3H, s, Me-19), 1,14 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, Me-27) і 1,07 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, Me-21), відповідно. Також є один сигнал аномерного протона з δ 4,91 (1H, d, $J = 7,8$ Hz). Хімічні зсуви всіх протонів вуглецевого залишку були встановлені за допомогою комбінації двовимірних спектрів TOCSY і COSY. ^{13}C -хімічні зсуви сиг-

налів їхніх відповідних атомів однозначно співвіднесені за допомогою двовимірного спектра HSQC. Ці дані, наведені в табл. 2, свідчать про наявність одного залишку β -D-глюкопиранози.

У НМВС-спектрі спостерігається кореляція між сигналом атома Гідрогену при δ 1,14 м.ч. (Me-27) та значеннями сигналів атомів Карбону С-24 (81,5), С-25 (38,2) і С-26 (65,1). Хімічні зсуви дублета CH_3 -27, а також двох сигналів метиленових протонів з δ 3,57 (1H, H-26a) і 3,63 (1H, H-26e) однозначно вказують на екваторіальну орієнтацію CH_3 -27. Таким чином, аглікон належить до спіростанів (25S)-ряду. Крім того, 25S-конфігурація підтверджується значеннями хімічних зсувів С-20, С-21, С-23, С-24, С-25 і С-27 в порівнянні з літературними даними [12, 13]. 5 α -Конфігурацію було визначено за допомогою кореляції між сигналом атома Гідрогену при δ 1,43 м.ч. (Me-19) та значеннями сигналів атомів Карбону при δ (м.ч.) 37,7 (С-10), 54,8 (С-9), 48,5 (С-5) і 48,1 (С-1) у двовимірному спектрі НМВС. Резонансний сигнал при 4,01 м.ч. у спектрі ПМР відповідає протонів при С-24, який діаксіально взаємодіє з протоном при С-25, а також діаксіально та аксіально-екваторіально – з протонами при С-23. Це підтверджується величина-

Таблиця 1

Хімічні зсуви атомів вуглецю глікозиду

| С-атом | Хімічний зсув | С-атом | Хімічний зсув |
|--------|---------------|--------|---------------|
| 1 | 48,1 | 18 | 16,6 |
| 2 | 73,2 | 19 | 17,6 |
| 3 | 77,4 | 20 | 42,2 |
| 4 | 35,0 | 21 | 14,9 |
| 5 | 48,5 | 22 | 111,6 |
| 6 | 70,4 | 23 | 40,9 |
| 7 | 40,9 | 24 | 81,5 |
| 8 | 30,0 | 25 | 38,2 |
| 9 | 54,8 | 26 | 65,1 |
| 10 | 37,7 | 27 | 13,5 |
| 11 | 21,5 | | |
| 12 | 40,2 | Glc-1 | 106,5 |
| 13 | 40,9 | 2 | 75,7 |
| 14 | 56,3 | 3 | 78,7 |
| 15 | 32,1 | 4 | 71,7 |
| 16 | 81,6 | 5 | 78,1 |
| 17 | 62,9 | 6 | 62,9 |

Таблиця 2

Наявні кореляції в спектрах HSQC і HMBC глікозиду

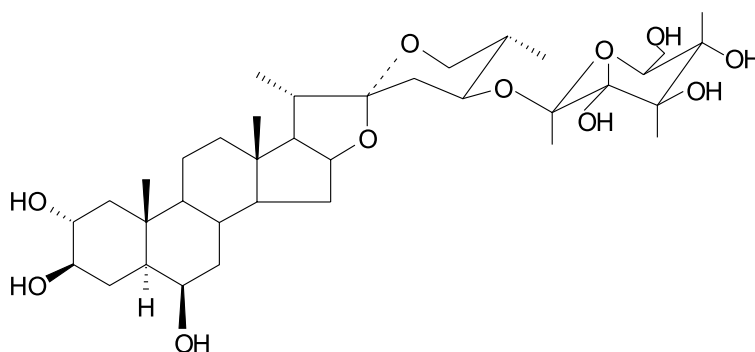
| № атома | δ_H HSQC | HMBC | № атома | δ_H HSQC | HMBC |
|---------|-----------------|----------------|---------|-----------------|------------------|
| 1a | 2,27 dd | C-2, 3, 5, 10 | 16 | 4,54 m | C-13, 17 |
| 1b | 1,36 m | C-2, 9, 10, 19 | 17 | 1,80 t | C-13, 16, 18, 21 |
| 2 | 4,18 m | | 18 | 0,79 s | C-12, 13, 14, 17 |
| 3 | 3,96 m | C-2 | 19 | 1,43 s | C-1, 5, 9, 10 |
| 4a | 2,54 q | C-3, 5 | 20 | 1,94 m | C-17, 21, 22 |
| 4b | 2,10 m | C-2, 3, 5, 10 | 21 | 1,07 d | C-17, 20, 22 |
| 5 | 1,41 m | C-1, 4, 9, 10 | 22 | | |
| 6 | 4,08 m | C-8, 10 | 23e | 2,64 dd | C-22, 24, 25 |
| 7a | 2,02 m | | 23a | 1,95 t | C-22, 24 |
| 7b | 1,22m | C-5 | 24 | 4,01 m | C-25, C-1 Glc |
| 8 | 2,19 m | | 25 | 1,91 m | C-23, 24 |
| 9 | 0,82 m | C-12, 14 | 26e | 3,63 dd | C-22, 24, 25 |
| 10 | | | 26a | 3,57 t | C-24 |
| 11a | 1,65 m | C-9 | 27 | 1,14 d | C-24, 25, 26 |
| 11b | 1,44 m | C-19 | 1'-Glc | 4,91 d | C-24 |
| 12a | 1,68 m | | 2' | 4,07 m | C-1', 3' |
| 12b | 1,12 m | C-13, 17, 18 | 3' | 4,22 m | C-2', 4' |
| 13 | | | 4' | 4,27 m | C-3', 5', 6' |
| 14 | 1,13 m | C-13, 17, 18 | 5' | 3,87 m | C-2' |
| 15a | 2,04 m | C-13,17 | 6'a | 4,52 m | C-4' |
| 15b | 1,38 m | C-14, 16 | 6'e | 4,39 dd | C-5' |

ми КССВ Н-23: 1,95 (1H, t, $J = 12,2$ Hz, Н-23а) і 2,64 (1H, dd, $J = 4,7, 12,2$ Hz). Отже, протон при С-24 є аксіальним, а хіральний центр С-24 має S-конфігурацію.

З'ясування положення гідроксильної групи при С-2 атомі аглікону було виконано шляхом аналізу хімічних зсувів сигналу С-атома порівняно з літературними даними [14, 15] для незаміщених агліконних частин та з урахуванням значних позитивних α -ефектів гідроксилування (до 10 м.ч.) і невеликих, зазвичай негативних, β -ефектів. $2\alpha,3\beta$ -Конфігурації визначені на підставі аналізу констант спин-спінової взаємодії протонів при атомах С-2 і С-3 з протонами при сусідніх С-атомах.

У ^{13}C ЯМР-спектрі глікозиду атом С-3, який має вторинну гідроксильну групу, резонує за 77,4 м.ч., що дозволяє говорити про відсутність вуглецевого залишку, зв'язаного з агліконом через цю гідроксигрупу (схема).

Раніше було показано, що в цибулях виявлені 24-гідроксипохідні (25S)-рускогеніну [16], юккагеніну [15], анзурогеніну А [13], а також 24-O- β -D-глюкопіранозиди: каратавіозид F [17], сапонін з *A. giganteum* [18], chinenside VI [19], сапоніни 9, 10 [12] та анзурозид [13]. Внаслідок порівняння цих спектрів ЯМР глікозиду та зазначених сапонінів виявлено, що величини хімічних зсувів атомів вуглецю, які утворюють кільце F, є прак-



Схема

тично ідентичними. Крім того, аналіз спектрів ЯМР ^{13}C виділеної сполуки та 24-гідрокси-підних засвідчив, що сигнал С-24 зазнає парамагнітного зміщення на +10,8 м.ч. Також спостерігається сильнополюсний зсув сигналів С-23 і С-25 на 1,0 і 1,8 м.ч., відповідно. Кореляція між сигналом аномального протона глюкози (δ 4,91) та С-24 аглікону (δ 81,5) у спектрі НМВС підтверджує місце приєднання вуглецевого залишку до аглікону. Отже, молекула глюкози в глікозиді приєднується до гідроксигрупи при С-24.

Таким чином, глікозид, виділений із суплідь *Allium cyrillii*, являє собою (24S,25S)-5 α -спіростан-2 α ,3 β ,6 β ,24-тетраол-24-О- β -D-глюкопіранозид і є новою сполукою.

Експериментальна частина

Об'єктом дослідження слугував сапонін, виділений з суплідь *Allium cyrillii* Тен. (род. *Alliaceae*), зібраного на північно-східному схилі гори Паратильмен у 2011 р.

Свіжозібрані та подрібнені супліддя (850 г) тричі екстрагували 70%-ним етиловим спиртом. Екстракцію проводили шляхом нагрівання сировини на водяній бані зі зворотним холодильником протягом трьох годин. Отриманий екстракт випарювали на роторному випаровувачі за 50°C до водного залишку, з якого добували суму стероїдних глікозидів *n*-бутиловим спиртом. Бутанольний екстракт випарювали до сухого залишку. ТШХ проводили в системах хлороформ-метанол-вода (65:35:7) та хлороформ-метанол (7:3). Для хроматографії використовували силікагельні пластинки Sorbfil АФ-В, товщина шару – 110 мкм. Хроматограми обприскували реактивом Ерліха [20] та реактивом Санье [21], після чого нагріва-

ли до 120°C. Кислотний гідроліз виконували таким чином: 10 мг чистого глікозиду нагрівали за 110°C в 5 мл 1%-ного розчину сульфатної кислоти в етиловому спирті впродовж 2 год. Після охолодження гідролізат розводили водою та екстрагували аглікон хлороформом. Екстракт промивали водою до нейтральної реакції та концентрували у вакуумі до сухого залишку. Водний залишок нейтралізували аніонітом і упарювали. Моносахариди ідентифікували в системі бутанол-ацетон-вода 4:5:1. Лужний гідроліз проводили шляхом обробки 10 мг глікозиду 10 мл 10%-ного розчину NaOH протягом 2 год за 50°C. Гідролізат нейтралізували катіонітом, промивали метанолом та упарювали. ТШХ-аналіз проводили в системі розчинників етанол-амоніак-вода (1:1:2), пров'язник – 0,05%-ний розчин бромкрезолу.

Колонкову хроматографію було проведено при використанні колонки 100 мм із фазою Supelcosean C18 (150-200 мкм, Supelco). ВЕРХ-розділення проводилося на хроматографі Agilent 1100, обладнаному детектором за світлорозсіюванням (ELSD) та колонкою Zorbax SB-C18 (150 \times 2,1 мм). ЯМР-експерименти здійснювалися зі зразками, розчиненими в 0,6 мл дейтеропіридину (400 МГц для ^1H ; 100 МГц для ^{13}C) на приладі Varian AS 400, стандарт – ТМС.

Висновки

Із суплідь цибулі Кирила *Allium cyrillii* Тен. було виділено новий стероїдний глікозид спіростанового ряду. На підставі хімічних та спектральних методів було встановлено, що сполука має структуру (24S,25S)-5 α -спіростан-2 α ,3 β ,6 β ,24-тетраол-24-О- β -D-глюкопіранозиду, раніше не описану в літературі.

Література

1. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н. и др. *Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана.* – Кишинев: Штиинца, 1987. – 142 с.
2. Васильева И.С., Пасешниченко В.А. // *Прикладная биохим. и микробиол.* – 1995. – Т. 31. – С. 238-242.
3. Берсукер И.Б., Димогло А.С., Чобан И.Н. и др. // *Хим.-фарм. журн.* – 1983. – №12. – С. 1467-1471.
4. Yang C.-R., Zhang Y., Jacob M.R. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2006. – Vol. 50, №5. – P. 1710-1714.
5. Mskhiladze L., Legault J., Lavoie S. et al. // *Molecules.* – 2008. – Vol. 13. – P. 2925-2934.
6. Oleszek W., Marston A. // *Phytochemical Society of Europe.* – 2000. – Vol. 45. – P. 241-254.
7. Кинтя П.К., Бурцева С.А., Ковальчук Л.П. и др. // *Хим.-фарм. журн.* – 1982. – №1. – С. 95-97.
8. Sauvare Y., Baissac Y., Leconte O. // *Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y. – London: Plenum Press.* – 1996. – Vol. 405. – P. 37-46.
9. Васильева И.С., Удалова Ж.В., Зиновьева С.В., Пасешниченко В.А. // *Прикладная биохим. и микробиол.* – 2009. – Т. 45, №5. – С. 517-526.
10. Толкачева Н.В., Шашков А.С., Чирва В.Я. // *Химия природ. соедин.* – 2012. – №2. – С. 243-246.
11. Толкачева Н.В., Зайцев Г.П., Качала В.В. и др. // *Ученые записки ТНУ, Серия «Биология, химия».* – 2011. – Т. 24 (63), №2. – С. 390-395.
12. Mimaki Y., Kuroda M., Fukasawa T., Sashida Y. // *Chem. Pharm. Bull.* – 1999. – Vol. 47. – P. 738-743.

13. Воллернер Ю.С., Кравец С.Д., Шашков А.С. и др. // *Химия природ. соедин.* – 1989. – №4. – С. 505-510.
14. Morita T., Ushiroguchi T., Hayashi N. et al. // *Chem. Pharm. Bull.* – 1988. – Vol. 36. – P. 3480-3486.
15. Воллернер Ю.С., Абдуллаев Н.Д., Горовиц М.Б., Абубакиров Н.К. // *Химия природ. соедин.* – 1983. – №6. – С. 736-740.
16. Кравец С.Д., Воллернер Ю.С., Шашков А.С. и др. // *Химия природ. соедин.* – 1987. – №6. – С. 843-849.
17. Воллернер Ю.С., Абдуллаев Н.Д., Горовиц М.Б., Абубакиров Н.К. // *Химия природ. соедин.* – 1984. – №1. – С. 69-73.
18. Kawashima K., Mimaki Y., Sashida Y. // *Phytochemistry.* – 1991. – Vol. 30, №9. – P. 3063-3067.
19. Jiang Y., Wang N.-L., Yao X.-S., Kitanaka S. // *Studies in Plant Sci.* – 1999. – Vol. 6. – P. 201-211.
20. Kiyosawa S., Huton M. // *Chem. Pharm. Bull.* – 1968. – Vol. 16. – P. 1162-1164.
21. Sannie M., Lapin H. // *Bull. Soc. Chem. France.* – 1957. – Vol. 10. – P. 1237-1241.

Надійшла до редакції 25.04.2013 р.