

УДК 547. 918:543.422

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ СТРОЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ CUSSONIA PANICULATA

Довгий И. И., Гришконец В. И., Качала В. В., Шаиков А. С.

Тритерпеновые гликозиды – класс вторичных метаболитов, состоящих из агликона и связанных с ним углеводных фрагментов. Агликон – пента- или тетрациклический тритерпеноид связан с одной, двумя, реже тремя углеводными цепями, содержащими от одного до шести моносахаридов. Кроме того, агликон и углеводные фрагменты часто этерифицируются остатками карбоновых кислот [1]. Широкое распространение в растительном мире и разнообразная биологическая активность тритерпеновых гликозидов делает необходимым детальное установление строения этих веществ с целью нахождения зависимостей структура-активность.

Для получения информации о строении тритерпеновых гликозидов используют химические методы: частичный кислотный гидролиз, полный кислотный гидролиз, щелочной и ферментативный гидролиз с последующей идентификацией продуктов с имеющимися заведомо известными веществами [1]. Однако, используя химические методы сложно получить информацию о строении новых агликонов, типах связи моносахаридов, конфигурации аномерных атомов углерода или положении неуглеводных заместителей. В этих случаях доказательство структуры осуществляется физико-химическими методами, из которых наибольшее распространение для установления строения природных веществ получили современные высокоинформативные методики спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Изучаемое растение *Cussonia paniculata* Eckl. et Zeh. относится к семейству аралиевых (*Araliaceae* Juss.), произрастает на Мадагаскаре и в юго-восточной Африке. Выделению и установлению строения ряда тритерпеновых гликозидов, выделенных из листьев этого растения были посвящены наши предыдущие статьи [2, 3, 4]. Целью данной статьи является установление строения новых тритерпеновых гликозидов из листьев этого растения с использованием методов спектроскопии ЯМР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и разделение гликозидов описано нами в [2, 3, 4]. ЯМР-спектры получены на приборе Bruker-500DRX (500 МГц для ^1H и 125 МГц для ^{13}C) в дейтеропиридине. Для двумерных экспериментов HSQC, COSY и TOCSY, HMBC и ROESY использовали пакеты стандартных программ фирмы "Bruker".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение строения углеводных фрагментов.

В качестве углеводных фрагментов в гликозидах из листьев *Cussonia paniculata* с использованием химических методов и отнесением сигналов в одномерных спектрах ЯМР ^{13}C по имеющимся литературным данным были определены часто встречающиеся α -L-арабинопиранозильный, β -D-глюкопиранозил-(1→2)- α -L-арабинопиранозильный, α -L-рамнопиранозил-(1→4)-O- β -D-глюкопиранозил-(1→6)-O- β -D-глюкопиранозильный, β -D-глюкуропиранозильный и β -D-глюкопиранозил-(1→2)-O- β -D-глюкуропиранозильный фрагменты. Однако, как показали химические методы [3] многие гликозиды содержат в своем составе ацильные группы, локализованные по углеводной цепи, связанной с карбоксильной группой агликона. Установление строения этих фрагментов мы рассмотрим на примере гликозидов фракции G, которая была разделена на три гликозида G₁, G₂ и G₃ [2, 3].

В полных кислотных гидролизатах G₁ и G₃ по ТСХ идентифицировали глюкозу, арабинозу, рамнозу и хедерагенин. Прогенины, образующиеся при щелочном гидролизе G₁ и G₃, по ТСХ идентичны 3-O- α -L-арабинопиранозиду хедерагенина [3]. На основании этих данных было предположено, что G₁ и G₃ являются изомерами по положению ацильной группы. По литературным данным [5] в спектрах ЯМР ^{13}C G₁ и G₃ были отнесены сигналы остатка α -L-арабинопиранозы и дизамещенного хедерагенина. Отнесение оставшихся сигналов, принадлежащих углеводному фрагменту по атому С-28 агликона, производилось следующим образом. В спектре ЯМР ^{13}C гликозида G₁ в области аномерных С-атомов были обнаружены еще три сигнала, по которым из спектра HSQC были найдены дублетные сигналы аномерных протонов. Дублеты при 4.99 и 6.19 м.д. с KCCB по 8 Гц принадлежат остаткам глюкопираноз, а дублет при 5.84 с KCCB около 1.5 Гц – остатку рамнопиранозы. Полные отнесения сигналов Н-атомов углеводной части по атому С-28 агликона были осуществлены на основании анализа двумерных спектров COSY и TOCSY. На основании данных протонного спектра и с использованием спектра HSQC было выполнено отнесение сигналов в спектре ЯМР ^{13}C . Сигналы С-атомов при 21.2 и 170.9 м.д. были отнесены к сложноэфирной ацетильной группе. Анализ α - и β -эффектов замещения на Н- и С-атомах углеводной части G₁ в сравнении с незамещенным трисахаридным фрагментом [3] показал наличие О-ацетильной группы по атому С-4 остатка рамнозы. Дополнительно локализация ацетатной группы была подтверждена на основании данных спектра НМВС, в котором наблюдался кросс-пик между Н-4 рамнозы и карбонильным С-атомом остатка уксусной кислоты. Типы связей между углеводными остатками были также подтверждены на основании данных спектра НМВС. Таким образом, G₁ представляет собой новый 3-O- α -L-арабинопиранозил-28-O-(4-O-ацетил- α -L-рамнопиранозил)-(1→4)-O- β -D-глюкопиранозил-(1→6)-O- β -D-глюкопиранозид хедерагенина. Сравнение химических сдвигов сигналов атомов ^{13}C гликозида G₁ с неацетилированным гликозидом G₂ приведено в таблице 1.

Анализ спектра ЯМР ^{13}C гликозида G₃ в области сигналов аномерных С-атомов (95–108 м.д.) после отнесения сигналов 3-O- α -L-арабинопиранозильного фрагмента показал наличие шести сигналов, однако оценка хроматографической подвижности гликозида показала, что он должен содержать три углеводных остатка. Очевидно, что в

G_3 содержатся два изомерных гликозида с различными углеводными фрагментами, имеющими по ацетильной группе, поскольку в спектре наблюдались сигналы двух O -ацетильных групп (метильного и карбонильного C -атомов) при 21.0, 21.2, 171.1 и 171.2 м.д.

Локализация ацетильной группы была подтверждена на основании изучения эффектов замещения, а также данных спектра НМВС, в котором наблюдался кросс-пик между протоном H -2 рамнозы и карбонильным C -атомом одного из остатков уксусной кислоты в одном гликозиде и протоном H -3 рамнозы и карбонильным C -атомом другого остатка уксусной кислоты в изомерном гликозиде. На основании этих данных углеводными фрагментами по атому C -28 агликона являются 2- O -ацетил- и 3- O -ацетил- α - L -рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)- O - β - D -глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)- O - β - D -глюкопиранозильные фрагменты. В итоге гликозиды представляют собой новые 3- O - α - L -арабинопиранозил-28- O -(2- O -ацетил- и 3- O -ацетил- α - L -рамнопиранозил)-(1 \rightarrow 4)- O - β - D -глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)- O - β - D -глюкопиранозиды хедерагенина, обозначенные G_{3a} и G_{3b} . Сопоставление химических сдвигов атомов ^{13}C гликозидов G_{3a} и G_{3b} с неацетилированным гликозидом G_2 приведено в таблице 1.

Установление строения агликонных частей

Большинство агликонов, входящих в гликозиды являются хорошо известными, и их структура была подтверждена сопоставлением сигналов в спектре ЯМР ^{13}C с литературными данными. Однако агликон в изомерных по положению ацетильной группы гликозидах E_{1a} и E_{1b} не был определен по имеющимся литературным данным, и установление его строения производилось следующим образом.

Предварительный анализ спектра ЯМР ^{13}C с АТР-редактированием для E_{1a} и E_{1b} обнаружил, что в самой низкопольной части спектра имеется сигнал при 175.1 м.д., однозначно отнесенный по величине химического сдвига к атому углерода карбоксильной группы. В области сигналов олефиновых C -атомов наблюдались два сигнала при 150.9 и 110.0 м.д. Кроме того, в высокопольной области наблюдались 25 сигналов агликонных C -атомов. На основании вышеуказанных данных удалось предварительно заключить, что агликон имеет карбоксильную группу, одну двойную связь, обычную негликозилированную гидроксильную группу у атома C -3 (δ_c 73.4 м.д.) и еще одну первичную гидроксильную группу (δ_c 67.7 м.д.) предположительно у атома C -23. Сигналы C -атомов двойной связи, а именно четвертичного (по данным АТР-редактирования) при 150.9 м.д. и вторичного (в группе $=CH_2$) при 110.0 м.д., по величинам химических сдвигов вполне соответствуют C -атомам двойной связи в боковой изопрופןильной группе тритерпеноидов лупанового ряда [6]. Это позволило предположить принадлежность агликона к этому ряду. Сопоставление химических сдвигов сигналов агликонных C -атомов с литературными данными для 28- O -гликозидов бетулиновой и 3-эпибетулиновой кислот [7] позволило отнести большинство сигналов C -атомов колец C , D и E и боковой изопрופןильной группы. Оставшиеся сигналы для C -атомов колец A и B удалось отнести путем сопоставления с химическими сдвигами сигналов C -атомов аналогичных колец 28- O -гликозидов 23,27-дигидроксидетулиновой кислоты [6] и хедерагенина [8]. При этом был сделан вывод, что дополнительная гидроксильная группа находится у атома C -23, и агликон представляет собой 3 β ,23-дигидроксилуп-

20(29)-ен-28-овую кислоту или 23-гидроксибетулиновую кислоту. Полные отнесения сигналов Н-атомов агликонной части E_{1a} и E_{1b} были выполнены на основе двумерного спектра HSQC. Анализ двумерных спектров COSY и TOCSY подтвердил правильность отнесения сигналов Н-атомов (по анализу кросс-пиков вицинальных протонов и протонов, образующих изолированные спиновые системы). Кроме того, анализ спектра HMBC по наличию кросс-пиков между сигналами С- и Н-атомов, разделенных несколькими (тремя) связями и спектра ROESY в отношении пространственно сближенных Н-атомов также подтвердил правильность выполненных отнесений. Структуры углеводных фрагментов по атому С-28 в этих гликозидах оказались такими же, как в гликозидах G_{3a} и G_{3b}.

Таблица 1.

Химические сдвиги углеводных фрагментов по С-28 атому углерода агликона

Номер атома	G ₂		G _{3a}		G _{3b}		G ₁	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
	Glc'		Glc''		Glc''		Glc''	
1	95,7	6,15	95,6	6,12	95,5	6,12	95,7	6,19
2	73,8	4,09	73,7	4,08	73,7	4,08	73,9	4,11
3	78,6	4,20	78,4	4,20	78,4	4,20	78,7	4,20
4	70,8	4,28	70,6	4,26	70,7	4,26	70,9	4,26
5	78,0	4,06	77,9	4,04	77,8	4,04	78,1	4,08
6	69,4	4,29 4,62	69,0	4,28 4,59	69,1	4,28 4,59	69,2	4,31 4,64
	Glc'''		Glc'''		Glc'''		Glc'''	
1	104,9	4,95	104,5	4,94	104,7	4,88	104,8	4,99
2	75,3	3,90	75,3	3,88	75,2	3,86	75,5	3,91
3	76,5	4,09	76,2	4,07	76,2	4,02	76,5	4,13
4	78,4	4,30	77,1	4,36	78,0	4,28	77,6	4,40
5	77,1	3,62	77,0	3,59	76,8	3,49	77,3	3,63
6	61,3	4,04 4,17	61,0	4,05 4,23	61,2	4,05 4,14	61,3	4,05 4,18
	Rha'''		Rha'''		Rha'''		Rha'''	
1	102,8	5,75	98,9	5,64	102,4	5,71	102,2	5,84
2	72,5	4,64	74,2	5,75	70,0	4,76	72,5	4,63
3	72,7	4,50	70,3	4,63	76,1	5,77	70,4	4,54
4	73,9	4,29	74,0	4,17	70,7	4,46	76,0	5,78
5	70,4	4,86	70,0	4,95	70,4	4,95	67,5	4,97
6	18,6	1,65	18,3	1,66	18,4	1,64	18,0	1,43

Таким образом, E_{1a} и E_{1b} представляют собой 28-О-(2-О-ацетил- и 3-О-ацетил-α-L-рамнопиранозил)-(1→4)-О-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозиды 23-гидроксибетулиновой кислоты, соответственно. Гликозиды присутствуют во фракции в молярном отношении 1:1, что следует из отношения интегральных интенсивностей сигналов одних и тех же С-атомов в изомерных углеводных фрагментах.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Агликоны тритерпеновых гликозидов, выделенных нами из *Cussonia paniculata*, относятся к β-амириновому (1), α-амириновому (2) и лупановому (3) рядам (табл. 2):

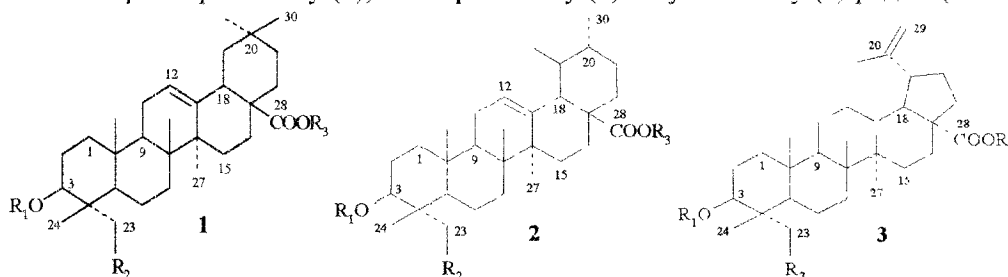


Таблица 2.

Структуры тритерпеновых гликозидов из листьев *Cussonia paniculata*

Гликозид	Тип агликона	R ₁	R ₂	R ₃
B ₁	1	Ara→	H	H
B ₂	2	Ara→	H	H
C	1	Ara→	OH	H
D	1	Glc→ ² Ara→	H	H
*E _{1a}	3	H	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ² ←OAc
*E _{1b}	3	H	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ³ ←OAc
*E _{2a}	1	H	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ² ←OAc
*E _{2b}	1	H	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ³ ←OAc
*F _{1a}	1	Ara→	H	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ² ←OAc
*F _{1b}	1	Ara→	H	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ³ ←OAc
*F _{2a}	2	Ara→	H	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ² ←OAc
*F _{2b}	2	Ara→	H	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ³ ←OAc
*G ₁	1	Ara→	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ⁴ ←OAc
*G ₂	2	H	OH	←Glc ⁵ ←Glc ⁴ ←Rha
*G _{3a}	1	Ara→	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ² ←OAc
*G _{3b}	1	Ara→	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha ³ ←OAc
H ₁	1	Ara→	H	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha
H ₂	2	Ara→	H	←Glc ⁵ ←Glc ⁴ ←Rha
I ₁	1	GlcUA→	H	H
I ₂	1	Ara→	OH	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha
*I _{3a}	1	Glc ¹ → ² Ara→	H	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha ² ←OAc
*I _{3b}	1	Glc ¹ → ² Ara→	H	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha ³ ←OAc
J _{1a}	1	Glc ¹ → ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha ² ←OAc
J _{1b}	1	Glc ¹ → ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha ³ ←OAc
J ₂	1	GlcUA→	OH	←Glc
K	1	Glc ¹ → ² Ara→	H	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha
L ₁	1	Glc ¹ → ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ← ¹ Glc ⁴ ← ¹ Rha
L ₂	1	Glc ¹ → ² GlcUA→	H	←Glc

Примечание: условные обозначения Glc – β-D-глюкопиранозид, Rha – α-L-рамнопиранозид, Ara – α-L-арабинопиранозид, GlcUA – β-D-глюкуронопиранозид; символом (*) обозначены новые гликозиды.

ВЫВОДЫ

С использованием методов одно- и двумерной спектроскопии ЯМР установлено строение тритерпеновых гликозидов из листьев *Cussonia paniculata*.

Список литературы

1. Hostettmann K., Marston A. Saponins. - Cambridge: Cambridge University Press, 1995. - P. 177-197.
2. Довгий И.И., Гришконец В.И. Тритерпеновые гликозиды листьев *Cussonia paniculata* // Учёные записки ТНУ. Биология, химия. - 2005. - Т. 18 (58), №2. - С. 38-42.
3. Довгий И. И., Гришконец В. И., Качала В. В., Шапков А. С. Тритерпеновые гликозиды *Cussonia paniculata*. I. Выделение и установление строения гликозидов А, В₁, В₂, С, D, G₂, Н₁ и Н₂ // Химия природ. соедин. - 2005. - №2. - С. 160-163.
4. Гришконец В. И., Довгий И. И., Качала В. В., Шапков А. С. Тритерпеновые гликозиды *Cussonia paniculata*. II. Ацетилированные гликозиды из листьев *Cussonia paniculata* // Химия природ. соедин. - 2005. - №4. - С. 351-356.
5. Гришконец В. И., Соболев Е. А., Шапков А. С., Чирва В. Я. Тритерпеновые гликозиды *Fatsia japonica*. Выделение и установление структуры гликозидов из листьев // Химия природ. соедин. - 2000. - №5. - С. 395-398.
6. Качала В. В., Столяренко А. С., Гришконец В. И., Шапков А. С. Тритерпеновые гликозиды *Scheffleropsis angkae*. Структура гликозидов L-C₂ и L-I₂ // Химия природ. соедин. - 2000. - №6. - С. 445-447.
7. Kitajima J., Shindo M., Tanaka Y. Two new triterpenoid sulfates from the leaves of *Shefflera octophylla* // Chem. Pharm. Bull. - 1990. - №38. - P. 714.
8. Kizu H., Tomimori T. Studies on the constituents of *Clematis* species. V. On the saponins of root of *Clematis chinensis* Osbeck // Chem. Pharm. Bull. - 1982. - Vol. 30, № 9. - P. 3340-3346.

Поступила в редакцию 01.03.2006 г.