

УДК 547.918

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ЦВЕТОЧНЫХ БУТОНОВ ЛОМОНОСА ВИНОГРАДОЛИСТНОГО *CLEMATIS VITALBA*

Панов Д.А.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: panovda@crimea.edu*

На основании проведенных одно- и двумерных ТСХ анализов, а также с использованием различных методов химического анализа в экстрактах цветочных бутонов ломоноса виноградолистного было идентифицировано 8 фракций тритерпеновых гликозидов хедерагенина и олеаноловой кислоты. Установлено наличие моно- и диацилированных тритерпеновых гликозидов.

Ключевые слова: *Clematis vitalba*, ломонос виноградолистный, *Ranunculaceae*, тритерпеновые гликозиды, гликозиды олеаноловой кислоты и хедерагенина, ацилированные гликозиды.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, в настоящее время из растений получают более трети лекарственных препаратов. Несмотря на успехи в области органического синтеза, структура многих природных веществ настолько сложна, что они практически не поддаются органическому синтезу. В ближайшее время эта ситуация существенно не изменится, и растения еще долго будут единственным источником биологически активных вторичных метаболитов [1].

Среди представителей рода *Clematis* (сем. *Ranunculaceae*) в Крыму наибольшее распространение имеет ломонос виноградолистный *Clematis vitalba* L. Цветы и листья ломоноса народная медицина использует при лечении головной боли, воспалительных заболеваний, как мочегонное, потогонное средство, сильное слабительное, а также для лечения язвы желудка, венерических болезней, костных опухолей, чесотки. Это растение получило широкое распространение в тибетской и китайской медицине как стимулятор иммунной системы, адаптогенное средство, а также как средство при онкопатологиях [2]. Интерес к ломоносу особенно возрос в 70-е годы прошлого столетия в связи с обнаружением в нем тритерпеновых гликозидов, обладающих активностью в отношении злокачественных опухолей [3]. Ранее при исследовании гликозидов ломоноса различными авторами констатировалось наличие тритерпеновых гликозидов [4, 5] и были описаны вещества фенольной природы [6]. Однако к настоящему времени химический состав этого лекарственного растения мало изучен, а исследование гликозидного состава цветочных бутонов вообще не проводилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительным материалом служили свежие и воздушно-сухие цветочные бутоны ломоноса виноградолистного *Clematis vitalba* L., собранные в Ботаническом саду Таврического национального университета им. В.И. Вернадского.

ТСХ-анализ гликозидов выполняли на пластинках "Silufol" ("Kavalier", Чехословакия) и "Sorbfil" (Россия). В качестве нейтральной системы использовали смесь хлороформ-метанол-вода (100:30:5); в качестве кислой – хлороформ-метанол-вода (100:30:5 с добавлением 3–5 % муравьиной кислоты непосредственно перед хроматографированием), и щелочной – хлороформ-метанол-25%-ный водный аммиак (100:30:5), хлороформ-этанол-10%-ный водный аммиак (100:40:7) [7]. Детектирование пятен тритерпеновых гликозидов на хроматограммах осуществляли 10%-ным спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты с последующим нагреванием хроматограмм при 100–120°C [8]. В этих условиях гликозиды олеаноловой кислоты дают красно-розовую окраску, хедерагенин – сине-фиолетовый цвет, а фенольные – желтую.

Двумерный ТСХ-анализ экстрактов проводили на пластинках "Silufol" и "Merck" при использовании в одном направлении нейтральной хроматографической системы растворителей и в перпендикулярном направлении – щелочной системы растворителей. В качестве нейтральной системы использовали смесь хлороформ-метанол-вода (100:30:5); в качестве щелочной – хлороформ-метанол-25%-ный водный аммиак (100:30:5).

Щелочной гидролиз осуществляли путем добавления к экстракту гликозидов 1 мл 10%-ного раствора КОН в смеси вода-метанол (1:1) и нагревания при 100°C в течение 2 ч. Полученный раствор нейтрализовали 1н. водным раствором H₂SO₄ до слабокислой реакции и экстрагировали прогенины бутанолом. Бутанольный экстракт анализировали ТСХ в системе хлороформ-метанол-вода (100:40:7).

Дезацелирование (аммонолиз) проводили добавлением к гликозидному экстракту 1 мл 15%-ного водно-спиртового (1:1) раствора аммиака и выдерживали при 20°C в течение 2–3 ч. Раствор нейтрализовали катионитом КУ-2-8 в H⁺-форме и фильтрат анализировали ТСХ в системе хлороформ-метанол-вода (100:30:5).

Полный кислотный гидролиз осуществляли путем добавления к 1 мг гликозида 0,1 мл диоксана и 0,1 мл 2 н. водного раствора CF₃COOH кислоты и нагревания 2 ч при 100°C. Агликон извлекали 0,5 мл бензола и полученный экстракт анализировали ТСХ в системе бензол-ацетон (4:1) или хлороформ-метанол-25% водный аммиак (100:20:1) с заведомыми образцами агликонов. Сахара в гидролизате идентифицировали ТСХ в системах хлороформ-метанол-аммиак (100:40:10) с заведомыми образцами рамнозы, арабинозы, глюкозы, галактозы, ксилозы и рибозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ цветочных бутонов ломоноса виноградолистного на содержание тритерпеновых гликозидов проводили методом тонкослойной хроматографии (одно- и двумерный варианты) и с использованием различных методов химического анализа. Для этого предварительно цветочные бутоны высушили при комнатной

температуре, а затем тщательно измельчили, экстрагировали 80%-ным водным изопропиловым спиртом [9]. Для удаления различных примесных компонентов, наличие которых негативно сказывается на эффективности разделения гликозидов при ТСХ анализе, экстракты упарили и растворили в *n*-бутаноле, насыщенном водой, а затем промыли дистиллированной водой. Обычно используемый для этого водный раствор аммиака не применяли, так как это могло привести к снятию ацильных групп и потере нативности исследуемых гликозидов.

Результаты проведенного одно- и двумерного ТСХ анализов представлены на рис. 1.

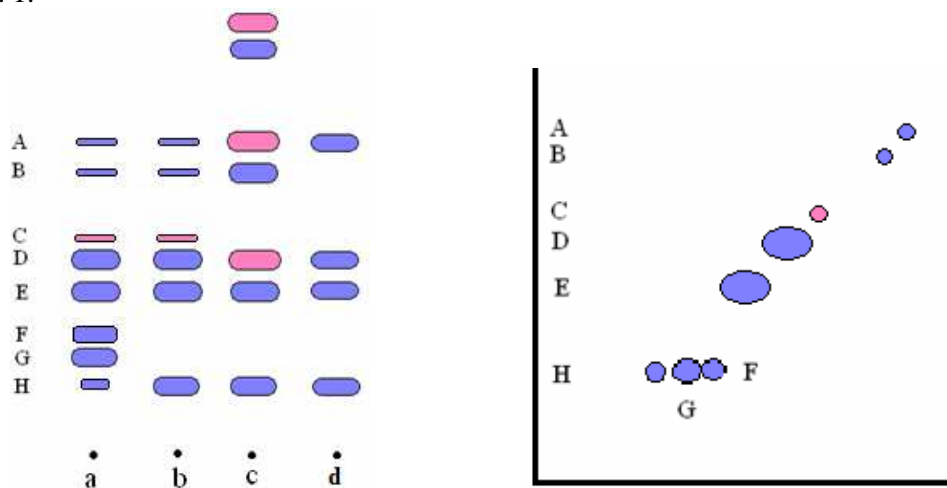


Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма экстрактов цветочных бутонов ломоноса виноградолистного (одно- и двумерный вариант).

"a" – экстракт цветочных бутонов ломоноса виноградолистного;

"b" – экстракт цветочных бутонов ломоноса после аммонолиза;

"c" – экстракт корней ломоноса виноградолистного;

"d" – заведомо известные тритерпеновые гликозиды;

A, B, D, E, F, G, H – фракции тритерпеновых гликозидов хедерагенина;

C – фракция тритерпеновых гликозидов олеаноловой кислоты.

На рис.1 представлены схемы распределения гликозидных фракций после проведенного ТСХ анализа в нейтральной ("a", "c" и "d"), кислой ("a" и "d") и щелочной ("b") системах растворителей. Для интерпретации полученных хроматограмм были использованы в качестве образцов сравнения экстракты корней ломоноса виноградолистного (Рис. 1, "c") и заведомо известные тритерпеновые гликозиды (Рис. 1, "d"), представляющие собой 28-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозид хедерагенина, 28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозид, 3-О-β-D-рибопиранозил-(1→3)-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозид и 3-О-

β -D-глюкопиранозил-(1→4)-O- β -D-рибопиранозил-(1→3)-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид хедерагенина, выделенные ранее [10–14].

Согласно полученным данным в цветочных бутонах ломоноса виноградолистного содержится 8 фракций тритерпеновых гликозидов β -амиринового ряда (Рис. 1, "а"). 7 фракций представлены гликозидами имеющими в качестве агликона хедерагенин (фракции **A**, **B**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**) и одна фракция гликозидов – олеаноловой кислоты (фракция **C**). Фракции **A**, **B** и **C** присутствуют в следовых количествах, а основными являются фракции **D**, **E**, **G**, и **F** (в порядке уменьшения содержания). Данные по агликонному составу подтверждены полным кислотным гидролизом и сравнением полученных агликонов с заведомо известными образцами олеаноловой кислоты и хедерагенина. В экстракте цветочных бутонов *Clematis vitalba* все обнаруженные гликозиды являются нейтральными, так как при хроматографировании в кислой среде никаких изменений не наблюдалось, и хроматограмма идентична таковой в нейтральной среде.

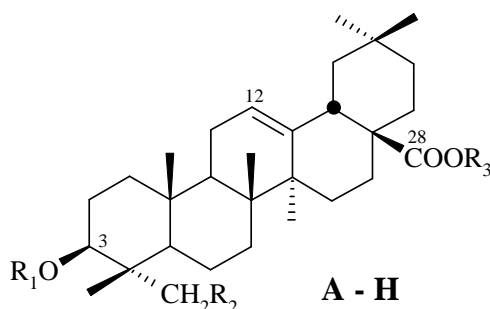
Фракции **B** и **E** идентичны по хроматографической подвижности в различных системах растворителей соответствующим фракциям корней ломоноса и заведомо известным образцам, выделенным ранее из корней ломоноса виноградолистного [15]. Для дополнительной идентификации был проведен щелочной гидролиз и сравнение полученных прогенинов с соответствующими прогенинами, выделенными ранее. Таким образом, фракции **B** и **E** представляют собой 28-O- β -D-глюкопиранозил-эфир 3-O- β -D-рибопиранозил-(1→3)-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид хедерагенина и 28-O- α -L-рамнопиранозил-(1→4)- β -D-глюкопиранозил-(1→6)-O- β -D-глюкопиранозил-эфир 3-O- β -D-рибопиранозил-(1→3)-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид хедерагенина, соответственно.

Фракция **C** на основании совпадения хроматографической подвижности была идентифицирована как 28-O- α -L-рамнопиранозил-(1→4)- β -D-глюкопиранозил-(1→6)-O- β -D-глюкопиранозил-эфир 3-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты. Ранее гликозид аналогичного строения выделялся из ряда растений, например, из *Kalopanax septemlobum* var. *typicum* [16].

Фракции **A**, **D** и **H** идентичны по хроматографической подвижности в различных системах растворителей соответствующим заведомо известным образцам гликозидов, выделенных ранее из стеблей и листьев калопанакса и из корней ломоноса виноградолистного [10, 11, 15]. Таким образом, на основании проведенного анализа можно высказать предположение об их структуре – фракции **A**, **D** и **H** представляют собой 28-O- β -D-глюкопиранозил-эфир 3-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид хедерагенина, 28-O- α -L-рамнопиранозил-(1→4)- β -D-глюкопиранозил-(1→6)-O- β -D-глюкопиранозил-эфир 3-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид и 3-O- β -D-глюкопиранозил-(1→4)-O- β -D-рибопиранозил-(1→3)-O- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-O- α -L-арабинопиранозид хедерагенина, соответственно.

Фракции тритерпеновых гликозидов **F** и **G** не совпали с имеющимися заведомыми образцами, однако дальнейшие исследования выявили их характерные

особенности. Для анализа экстракта цветочных бутонов на наличие ацилированных гликозидов, которые довольно часто встречаются в растениях, как семейства Лютиковых, так и в хемотаксономически родственном семействе Аралиевых, было проведено дезацилирование всего экстракта. Результаты представлены на рис. 1 ("b"). Как видно, фракции гликозидов **F** и **G** (Рис. 1, "a") отсутствуют на хроматограмме. Очевидно, это связано с тем, что данные фракции представлены ацилированными формами тритерпеновых гликозидов, а в условиях мягкого щелочного гидролиза такие группы отщепляются и гликозид приобретает большую полярность и, как следствие, меньшую хроматографическую подвижность. Поэтому можно предположить, что фракции гликозидов **F** и **G** теперь занимают положение фракции **H**, что наглядно видно еще и по большей площади пятна фракции **H** в сравнении с исходным образцом цветочных бутонов (Рис. 1, "a" и "b"). Для подтверждения высказанной гипотезы был проведен двумерный ТСХ анализ в двух различных системах растворителей (в I-м направлении – в нейтральной, во II-м – в щелочной). При этом перед хроматографированием во II-м направлении хроматограмму выдерживали в течение двух часов в парах аммиака для снятия ацильных групп. Полученные данные позволяют однозначно говорить, что фракции гликозидов **F** и **G** представляют собой ацилированные формы гликозида **H**, структура которого описана выше, причем гликозид **F**, по видимому, является его диацилированной формой. Принимая во внимания хемотаксономическую близость двух семейств – Лютиковых и Аралиевых, можно высказать предположение о структуре ацилированных сахарных остатков, как наиболее характерных для гликозидов выделенных из представителей этих двух семейств – $\leftarrow\text{Glc}^6\leftarrow(\text{Glc}^6\leftarrow\text{OAc})^4\leftarrow\text{Rha}$ и $\leftarrow\text{Glc}^6\leftarrow(\text{Glc}^6\leftarrow\text{OAc})^4\leftarrow\text{Rha}^3\leftarrow\text{OAc}$ [10, 17].



	R₁	R₂	R₃	%
A	Rha→ ² Ara→	OH	←Glc	1
B	Rib→ ³ Rha→ ² Ara→	OH	←Glc	1
C	Rha→ ² Ara→	H	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha	3
D	Rha→ ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha	24
E	Rib→ ³ Rha→ ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha	24
F	Glc→ ⁴ Rib→ ³ Rha→ ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ←(Glc ⁶ ←OAc) ⁴ ←Rha ³ ←OAc	20
G	Glc→ ⁴ Rib→ ³ Rha→ ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ←(Glc ⁶ ←OAc) ⁴ ←Rha	22
H	Glc→ ⁴ Rib→ ³ Rha→ ² Ara→	OH	←Glc ⁶ ←Glc ⁴ ←Rha	5

Rha – α-L-Rha_p; **Ara** – α-L-Ara_p; **Rib** – β-D-Rib_p; **Glc** – β-D-Glc_p;

ВЫВОДЫ

1. В цветочных бутонах ломоноса виноградолистного найдено 8 фракций нейтральных тритерпеновых гликозидов.
2. В качестве агликонов были идентифицированы олеаноловая кислота и хедерагенин.
3. Гликозиды содержат характерные для семейства Лютиковые углеводные фрагменты, характерные для гликозидов и других органов ломоноса.
4. Установлено наличие в цветочных бутонах моно- и диацилированных тритерпеновых гликозидов.

Список литературы

1. DiCosmo F. Plant cell culture secondary metabolism / F. DiCosmo, M. Misawa. – Boca Raton, Fla. : CRC Press, 1996. – 232 p.
2. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование : Семейства Hydrangeaceae - Haloragaceae / АН СССР, Ботан. ин-т им. В. Л. Комарова; [Сост. С. Я. Тюлин и др.]; Отв. ред. П. Д. Соколов. – Т. 2., Л.: «Наука», 1987. – 328 с.
3. Мельников В.Н. Химическое исследование гликозидов ломоноса виноградолистного: автореф. дис. ... канд. хим. наук. / В.Н. Мельников. – Черновцы, 1974. – 18 с.
4. Chirva V.Ya. Ribose in the triterpene glycosides of *Clematis vitalba* / V.Ya. Chirva, P.K. Kintya, V.N. Mel'nikov // Chemistry of Natural Compounds. – 1971. – Vol. 7, № 3 – P. 284–286.
5. Kintya P.K. Structure of vitalboside D from *Clematis vitalba* / P.K. Kintya, V.M. Mel'nikov, V.Ya. Chirva // Chemistry of Natural Compounds. – 1974. – Vol. 10, № 6. – P. 833.
6. Yesilada E. *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects / E. Yesilada, E. Kupeli // Journal of Ethnopharmacology. – 2007. – Vol. 110, № 3. – P. 504–515.
7. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / Пер. с словац. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец ; [Под. ред. В.Г. Березкина]. – М. : Мир, 1980. – 621 с.
8. Hostettmann K. Saponins / K. Hostettmann, A. Marston. – Cambridge : Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
9. Деканосидзе Г.Е. Исследование тритерпеновых гликозидов. Установление строения и синтез / Г.Е. Деканосидзе, В.Я. Чирва, Т.В. Сергиенко, Н.И. Уварова. – Тбилиси : Мецниереба, 1982. – 151 с.
10. Гришкoveц В.И. Тритерпеновые гликозиды *Kaloranax septemlobum* I. Гликозиды А, В, С, F, G1, G2, I2, H и J из листьев *Kaloranax septemlobum* var. *maximowiczii*, интродуцированного в Крыму / В.И. Гришкoveц, Д.А. Панов, В.В. Качала, А.С. Шашков // Химия природ. соедин. – 2005. – № 2. – С. 156–159.
11. Панов Д.А. Тритерпеновые гликозиды *Kaloranax septemlobum* VII. Минорные гликозиды стеблей *Kaloranax septemlobum* var. *maximowiczii* и *Kaloranax septemlobum* var. *tyricum* / Д.А. Панов, В.И. Гришкoveц, В.В. Качала, А.С. Шашков // Химия природ. соедин. – 2006. – № 1. – С. 49–53.
12. Kizu H. Studies on the constituents of *Clematis* species. VI. The constituents of *Clematis stans* Sieb. et Zucc. / H. Kizu, H. Shimana, T. Tomimori // Chem. Pharm. Bull. – 1995. – Vol. 43, № 12. – P. 2187–2194.
13. Kawata Y. Studies on the constituents of *Clematis* species. VII. Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis terniflora* DC. var. *robusta* Tamura / Y. Kawata, H. Kizu and T. Tomimori // Chem. Pharm. Bull. – 1998. – Vol. 46, № 12. – P. 1891–1900.
14. Triterpenoid saponins from *Clematis chinensis* / [B. Shao, G. Qin, R. Xu, et al] // Phytochemistry. – 1995. – Vol. 38, № 6. – P. 1473–1479.
15. Зайцев Г.П. Тритерпеновые гликозиды *Clematis*. I. Гликозиды из корней *Clematis Vitalba* / Г.П. Зайцев, Д.А. Панов, В.Я. Чирва // Химия природ. соедин. – 2011. – № 2. – С. 281–282.

16. Панов Д.А. Тритерпеновые гликозиды *Kalopanax septemlobum* VI. Гликозиды из листьев *Kalopanax septemlobum* var. *turicum*, интродуцированного в Крыму / Д.А. Панов, В.И. Гришконец, В.В. Качала, А.С. Шашков // Химия природ. соедин. – 2006. – № 1. – С. 40–43.
17. Saponins from leaves of *Kalopanax pictus* (Thunb.) Nakai, Harigiri: structures of kalopanax-saponins JLa and JLb / [C.J. Shao, R. Kasai, K. Ohtani, et al] // Chem. Pharm. Bull. – 1990. – Vol. 38 (4). – P. 1087–1089.

Панов Д.О. Тритерпенові глікозиди квіткових бутонів ломоносу виноградолистного *Clematis vitalba* / Д.О. Панов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25(64), № 4. – С. 264-270.

На підставі проведених одно-і двовимірних ТШХ аналізів, а також з використанням різних методів хімічного аналізу в екстрактах квіткових бутонів ломоноса виноградолистного було ідентифіковано 8 фракцій тритерпенових глікозидів хедерагеніну і олеанолової кислоти. Встановлено наявність моно-і діацильованих тритерпенових глікозидів.

Ключові слова: *Clematis vitalba*, ломонос виноградолистний, *Ranunculaciae*, тритерпенові глікозиди, глікозиди олеанолової кислоти та хедерагеніну, ацильовані глікозиди.

Panov D.A. Triterpenoid saponins from *Clematis vitalba* flower buds / D.A. Panov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 4. – P. 264-270.

On the basis of one- and two-dimensional TLC analysis, as well as using a variety of chemical analysis methods, in extracts of *Clematis vitalba* flower buds 8 fractions of triterpene glycosides hederagenin and oleanolic acid were identified. The presence of mono- and diacylated triterpene glycosides was confirmed.

Keywords: *Clematis vitalba*, *Ranunculaciae*, triterpene glycosides, oleanene glycoside, oleanolic acid, hederagenin, acylated glycosides.

Поступила в редакцію 24.11.2012 г.