

На правах рукописи



ДРЕНИН АЛЕКСЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

ФЛАВОНОИДЫ И ИЗОФЛАВОНОИДЫ ТРЕХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ
РОДОВ TRIFOLIUM L. И VICIA L.

02.00.10 – Биоорганическая химия, химия природных и физиологически
активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

СУРГУТ – 2008

Работа выполнена на кафедре химии ГОУ ВПО «Сургутского государственного университета ХМАО-Югры»

Научный руководитель: доктор химических наук,
профессор
Ботиров Эркин Хожиакбарович

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор
Зибарева Лариса Николаевна

кандидат химических наук,
доцент
Цырлина Елена Марковна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Уфимский государственный нефтяной
технический университет»

Защита диссертации состоится 23 января 2009 г. в 14⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 002.001.01 в Институте органической химии УНЦ РАН по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, зал заседаний; e-mail: chemorg@anrb.ru, факс: (347) 2356066.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН.

Автореферат разослан «23» декабря 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук, профессор



Ф.А. Валеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. В настоящее время все больший интерес фармакологов привлекают вещества, относящиеся к классу флавоноидов и изофлавоноидов. Эти соединения обладают высокой биологической активностью и, что особенно ценно, низкой токсичностью. Многочисленные исследования показывают, что препараты, созданные на основе этих веществ, являются высокоэффективными противоопухолевыми средствами, обладают антиоксидантными свойствами, снижают риск заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Особый интерес в качестве источников соединений указанных классов представляют растения семейства Fabaceae (бобовые), в частности – представители родов *Trifolium* L. и *Vicia* L., богатые флавоноидами и изофлавоноидами.

На основе экстрактов клевера лугового создан ряд биологически активных добавок, обладающих широким спектром фармакологического действия («Атекроклефит», «Кардиин», «Red Clover Plus»). Общий недостаток этих БАДов в том, что они созданы на основе спиртовых экстрактов, химический состав которых изучен поверхностно, а действующие вещества зачастую не выявлены. В то же самое время, лекарственные средства, созданные на основе индивидуальных биологически активных соединений, обладают гораздо более ценными лечебными свойствами.

Поэтому изучение химического состава растений, содержащих флавоноиды и изофлавоноиды, разработка способов их получения с целью создания новых эффективных лекарственных препаратов является актуальной задачей.

Работа выполнена в рамках Федеральной программы «Участник молодежного научно-инновационного движения» (госконтракт №5644р/8090).

Цель и задачи работы. Целью данной работы было изучение фенольных соединений растений семейства Fabaceae L. территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры.

В рамках поставленной цели решались следующие задачи:

- выделение и получение в индивидуальном виде флавоноидов из растений *Trifolium pratense* L. (клевер луговой), *Trifolium lupinaster* L. (клевер люпиновидный), *Vicia subvillosa* (Ledeb.) Trautv (горошек волосистый);
- идентификация и установление химического строения выделенных веществ;
- подготовка полученных веществ к фармакологическим испытаниям.

Научная новизна. Из указанных выше растений выделено 18 веществ, относящихся к изофлавонам, птерокарпанам, флавонам, флавонолам, а также один циклический полиол; с помощью современных химических и физико-химических методов установлена структура 5 новых природных соединений; флавоноиды *Trifolium lupinaster* L. исследованы впервые; из клевера лугового и клевера люпиновидного впервые выделен (+)-пинитол.

Практическая значимость. Впервые были исследованы фенольные соединения растений территории Ханты-Мансийского автономного округа - Югры. Для выделенных изофлавоноидов формонетина, ононина и генистина сотрудниками лаборатории фармакологии Института химии растительных веществ АН РУз установлена гиполипидемическая и гипохолестеринемическая активность, превосходящая таковую официального лекарственного препарата «Гемфеброзил». Также для этих соединений была установлена ингибирующая активность по отношению к Na^+, K^+ -АТФ-азе.

В ходе данных исследований обнаружены новые источники (+)-пинитола, обладающего антидиабетическими и гипогликемическими свойствами и запатентованного в США в качестве лекарственного средства.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены на VII Международном симпозиуме по химии природных соединений (Ташкент, 2007 г.), на III Всероссийской научной конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2007 г.), на VI Всероссийском научном семинаре «Химия и медицина» (Уфа, 2007 г.), на Всероссийской конференции «Органическая химия для медицины «ОРХИМЕД-2008» (Черноголовка, 2008 г.), на VII и VIII Открытой окружной конференции «Наука и инновации XXI» века (Сургут, 2006 и 2007 гг.).

Публикации. По результатам работы опубликованы 3 статьи в журнале, рекомендованном ВАК, и тезисы 5 докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальную часть и выводы. В тексте содержится 13 таблиц и 30 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 140 ссылок.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.х.н., профессору, Ботирову Эркину Хожиакбаровичу за постоянное внимание, поддержку и ценные консультации, оказанные при выполнении данной работы.

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для выделения индивидуальных природных соединений из растительного сырья мы применяли разнообразные методы: экстракцию этанолом с последующим разделением на близкие по полярности фракции обработкой упаренного и разбавленного водой экстракта гексаном, хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом, разделение полученных фракций на хроматографических колонках с силикагелем, перекристаллизацию выделенных соединений. Структуры выделенных веществ устанавливали методами ИК-, УФ-, ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C-спектроскопии, масс-спектрометрии, спектроскопии кругового дихроизма, а также на основании результатов химических превращений.

В результате нам удалось выделить 19 веществ, 5 из которых оказались новыми соединениями (табл. 1).

Таблица 1.

Соединения, выделенные из изученных растений

Название растения	Выделенные вещества
<i>Trifolium pratense</i> L.	формонетин, <u>формонетин-7-O-β-D-галактопиранозид</u> ¹ , <u>инермин-3-O-β-D-галактопиранозид</u> , генистеин, <u>генистеин-7-O-β-D-галактопиранозид</u> , прунетин, прунетин-4'-O-β-D-глюкопиранозид, прунетин-4'-O-α-D-глюкопиранозид,
<i>Trifolium lupinaster</i> L.	ононин*, кемпферол-3-O-дигликозид*, кемпферол-3-O-тригликозид*
<i>Vicia subvillosa</i> (Ledeb.) Trautv.	апигенин*, лютеолин*, кверцетин*, цинарозид*, лютеолин-4'-O-β-D-глюкопиранозид*, изокверцитрин*, <u>висциозид</u>

I. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ИЗОФЛАВОНОИДОВ И (+)-ПИНИТОЛА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *TRIFOLIUM PRATENSE* L.

Поскольку концентрация флавоноидов в разных органах растения варьирует в зависимости от вегетационного периода, мы проводили сбор надземной части клевера в середине июля, во время бурного роста и

¹ Подчеркнуты новые природные соединения; * - вещества, выделенные из данного вида впервые.

цветения, а подземной – в конце сентября, когда надземная часть отмирает, и вещества накапливаются в большом количестве в корнях.

Фракции, полученные последовательной обработкой упаренного и разбавленного водой этанольного экстракта клевера гексаном, хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом, разделялись на колонках с силикагелем. В результате было получено 8 веществ: 3 – из подземной части растения (формонетин, формонетин-7-О-β-D-галактопиранозид, инермин-3-О-β-D-галактопиранозид) и 5 – из надземной (прунетин, генистеин, прунетин-4'-О-β-D-глюкопиранозид, прунетин-4'-О-α-D-глюкопиранозид, генистеин-7-О-β-D-галактопиранозид).

Четыре вещества – формонетин-7-О-β-D-галактопиранозид, инермин-3-О-β-D-галактопиранозид, прунетин-4'-О-α-D-глюкопиранозид, генистеин-7-О-β-D-галактопиранозид – не описаны в литературе.

Строение формонетин-7-О-β-D-галактопиранозид (II)

Формонетин-7-О-β-D-галактопиранозид (II) был получен из этилацетатной фракции подземной части клевера в виде бежевых кристаллов (250 мг) с т.пл. 213⁰С. В УФ-спектре имеются максимумы поглощения при $\lambda_{\text{max}}^{\text{этанол}}$ 261, 263, 303 нм, характерные для производных изофлавона.

В ИК-спектре проявляются полосы поглощения, характерные для спиртовых гидроксильных групп (3292 см⁻¹), карбонила γ-пирона (1639 см⁻¹), ароматических углерод-углеродных связей (1622 см⁻¹) и С-О колебаний гликозидов (1078 см⁻¹).

При кислотном гидролизе этого соединения был получен агликон, который сравнением с истинным образцом был идентифицирован как формонетин, и D-галактоза. Галактозу идентифицировали сравнением с подлинным образцом методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) (в виде триметилсилилового эфира).

Таблица 2.

Данные спектров ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C
формононетин-7-О-β-D-галактопиранозида

Атом С	δ _с (м.д.)	δ _H (J, Гц)
Агликон		
2	153.7	8.42 с
3	124.0	
4	174.8	8.05 д (8,4)
5	127.0	
6	115.7	7.15 дд (8.4 и 1.8)
7	161.5	7.23 уш. с.
8	103.5	
9	157.1	7.52 д (8,7)
10	118.5	
1'	123.4	6.99 д (8,7)
2'/6'	130.1	
3'/5'	113.7	3.78 с
4'	159.1	
ОСН ₃	55.2	
Галактоза		
1"	100.1	5.10 д (6,8)
2"	73.2	3.30-3.81
3"	76.5	3.30-3.81
4"	69.7	3.30-3.81
5"	77.2	3.30-3.81
6"	60.3	3.30-3.81

При ацетилировании гликозида II уксусным ангидридом в пиридине получили тетраацетильное производное (IIb). В масс-спектре соединения IIb наблюдается пик молекулярного иона M⁺ с m/z 598 (31), пики фрагментных ионов, характерные для тетраацетилгексозы с m/z 331 (72), 169 (100%), 109 (42), а также пик остатка агликона с m/z 268 (80).

Данные спектров ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C, снятых в гексадейтеродиметилсульфоксиде (ДМСО-d₆), показывают, что вещество II представляет собой моногликозид (табл. 2).

Значение КССВ сигнала аномерного протона (J=6,4 Гц) в спектре ЯМР-¹H и значения химсдвигов сигналов углерода остатка D-галактозы в

спектре ЯМР-¹³С флавоноида II свидетельствуют о β-D-галактопиранозной структуре углеводной части.

Таким образом, для вещества II установлена структура формонетин-7-O-β-D-галактопиранозида (рис.1).

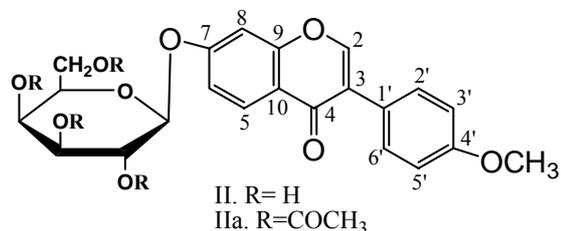


Рис. 1. Формонетин-7-O-β-D-галактопиранозид и его тетраацетильное производное

Среди моногликозидов формонетина известны лишь глюкозиды. Моногалактозид этого изофлавона выделен впервые нами и является новым соединением.

Строение инермин-3-O-β-D-галактопиранозида (III)

Инермин-3-O-β-D-галактопиранозид (III) (C₂₂H₂₂O₁₀, т.пл. 193⁰С) также был выделен из этилацетатной фракции подземной части клевера лугового (500 мг). Вещество имеет характерный для птерокарпанов УФ-спектр: λ_{max}^{этанол} 278, 285, 310 нм.

В ИК-спектре присутствуют полосы поглощения гидроксильных групп (3400 см⁻¹), ароматических С-С связей (1622 см⁻¹), С-О колебаний гликозидов (1070 см⁻¹) и метилendioксигруппы (930 см⁻¹).

При кислотном гидролизе исследуемого вещества был получен агликон и D-галактоза (ТСХ, ГЖХ).

Ацетилирование гликозида уксусным ангидридом в пиридине дало тетраацетильное производное (IIIa). В масс-спектре последнего наблюдается пик молекулярного иона с m/z 614 (7), пики ионов агликона, а также пики фрагментных ионов остатка тетраацетилгексозы с m/z 331 (30), 271 (23), 169 (89) и 109 (55).

Агликон состава $C_{15}H_{12}O_5$, т.пл.180-181⁰, $[\alpha]_D -211,4^0$ (этанол) имеет характерный для птерокарпанов УФ-спектр (λ_{max} 282, 287, 311 нм).

Таблица 3. Данные спектров ЯМР- ¹ H и ЯМР- ¹³ C инермин-3-О-β-D-галактопиранозида		
Атом С	δ _С (м.д.)	δ _H (J, Гц)
Агликон		
1	131.9	7.36 д (8,7)
2	110.4	6.71 дд (8,7 и 1,8)
3	158.5	
4	104.0	6.55 д (1,8)
5	156.2	
6	65.9	4.27 дд (3,6 и 10,2)
6a	39.5	3.59-3.70
6b	118.3	
7	105.4	6.98 с
8/9	147.5	
10	93.3	6.52 с
10a	153.7	
11a	77.7	5.57 д (6.9)
11b	114.2	
ОН ₂ O	101.2	5.92 д (11,2)
Галактоза		
1'	100.3	4.84 д (7.2)
2'	73.2	3.12-3.36
3'	76.5	3.12-3.36
4'	69.7	3.12-3.36
5'	77.1	3.12-3.36
6'	60.7	3.12-3.36

В ПМР-спектре агликона (Pу-d₅) в области 3,12-4,40 м.д. проявляются сигналы протонов птерокарпана при углеродных атомах 6 и 6a, а при 5,50 м.д. (1H, д, 6 Гц) резонирует сигнал протона H-11a. Двухпротонный дублет с центром при 5,85 м.д. (J=2.0 Гц) обусловлен наличием метилendioксигруппы. В области слабого поля присутствуют сигналы пяти ароматических протонов, три из которых относятся к системе 1,3,4-тризамещения в бензольном кольце, а остальные два образуют синглеты при 6,60 и 6,80 м.д. и могут принадлежать только протонам в *para*-положениях. Присутствие в масс-спектре агликона, наряду с пиком молекулярного иона

M^+ 284, пиков ионов с m/z 147 и 175 указывает на то, что гидроксильная группа расположена в кольце А, а метилendioксигруппа – в кольце В. На основании изучения спектральных данных и сравнением с заведомым образцом агликон идентифицирован как 6aR,11aR-3-гидрокси-8,9-метилendioксиптерокарпан (инермин).

В спектре ЯМР- 1H (ДМСО- d_6) вещества III проявляются сигналы протонов 3,8,9-тризамещенного птерокарпана и углеводной части. Сигнал аномерного протона D-галактозы в спектре ЯМР- 1H гликозида III проявляется при 4.84 м.д. в виде дублета с КССВ 7.2 Гц, а сигнал атома углерода C-1 – при δ 100.3 м.д. в спектре ЯМР- ^{13}C (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что остаток D-галактозы имеет пиранозную форму и связан с агликоном β -гликозидной связью.

Данные спектра кругового дихроизма [ϵ 0,1; этанол: $\Delta\epsilon=-12,3$ (233 нм), $\Delta\epsilon=-1,2$ (278 нм), $\Delta\epsilon=+3,6$ (310 нм)] подтверждают 6aR, 11aR-конфигурацию хиральных центров агликоновой части гликозида.

На основании вышеизложенных данных для этого соединения мы установили строение инермин-3-О- β -D-галактопиранозида (III).

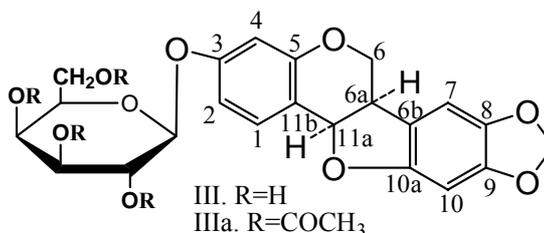


Рис. 2. Инермин-3-О- β -D-галактопиранозид и его тетраацетильное производное

Это вещество не описано в литературе и является новым соединением.

Структура прунетин-4'-О- α -D-глюкопиранозида (VII)

Соединение VII состава $C_{22}H_{22}O_{11}$ с т.пл. 259-260 $^{\circ}C$ в количестве 25 мг было получено из этилацетатной фракции надземной части клевера лугового.

УФ-спектр рассматриваемого соединения характерен для изофлавонов и имеет максимумы поглощения при $\lambda_{\text{max}}^{\text{этанол}}$ 263, 292, 335 нм. При снятии УФ-спектра с добавлением ацетата натрия не наблюдалось батохромного сдвига полосы II, что свидетельствует об отсутствии свободной фенольной гидроксильной группы в положении С-7. Батохромный сдвиг полосы II на 10 нм наблюдался при снятии спектра с добавлением хлорида алюминия, что обусловлено наличием фенольного гидроксила при С-5.

В ИК-спектре вещества VII имеется полоса поглощения гидроксильных групп (3317 см^{-1}), карбонила γ -пирона (1645 см^{-1}), ароматических углерод-углеродных связей (1600 см^{-1}) и С-О колебаний гликозидов (1015 см^{-1}).

При кислотном гидролизе был получен прунетин, а также моносахарид, который методом ГЖХ в виде ТМС-эфира был идентифицирован как D-глюкоза.

В результате ацетилирования изофлавона уксусным ангидридом в пиридине было получено пентаацетильное производное VIIa.

В масс-спектре вещества VIIa наблюдаются следующие пики ионов: M^+ 368 (2), 284 (100), 255 (10), 166 (50), 138 (40), 118 (30) и другие. Пики ионов с m/z 166 и 118 характерны для производных изофлавона, содержащих гидроксильную группу в кольце В, а также гидроксильную и метоксильную группы в кольце А.

В спектре ЯМР- ^{13}C (ДМСО- d_6) проявляются сигналы атомов углерода агликона и сахарной части (табл. 4). Сигнал аномерного протона глюкозы в спектре ПМР проявляется в виде дублета при 5.36 м.д. с $J=4,5$ Гц. Такое значение константы спин-спинового взаимодействия сигнала аномерного протона, а также парамагнитный сдвиг сигналов протонов углеводной части на 1,5 м.д. по сравнению с β -формой свидетельствуют в пользу α -пиранозной конфигурации глюкозы. Значения химсдвигов сигналов остальных протонов сахарной части лежат в области 4.58-5.18 м.д.

Таблица 4.
 Данные спектров ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C
 прунетин-4'-O-α-D-глюкопиранозида .

Атом С	δ _с (м.д.)	δ _H (J, Гц)
Агликон		
2	153.6	8.46 с
3	121.4	
4	180.3	
5	157.7	
6	98.6	6.41 ус
7	164.9	
8	92.6	6.66 ус
9	157.5	
10	105.3	
1'	122.5	
2'/6'	130.1	7.50 д (8,1)
3'/5'	116.1	7.09 д (8,1)
4'	162.1	
OCH ₃	56.2	3.86 с
ОН (С-5)		12.92 с
Глюкоза		
1"	100.3	5.36 д (4,5)
2"	73.1	4.58-5.18
3"	76.5	4.58-5.18
4"	69.6	4.58-5.18
5"	77.0	4.58-5.18
6"	60.2	4.58-5.18

Таким образом, вещество VII имеет структуру прунетин-4'-O-α-D-глюкопиранозида.

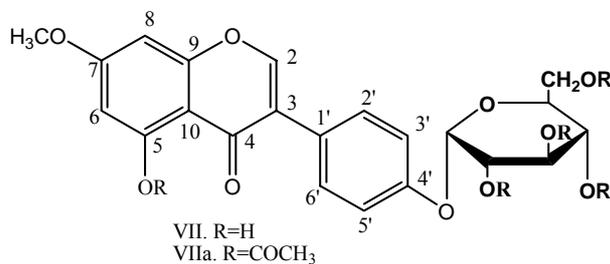


Рис. 3. Прунетин-4'-O-α-D-глюкопиранозид и его пентаацетильное производное

Прунетин-4'-O-α-D-глюкопиранозид в литературе не описан и является новым соединением.

Структура генистеин-7-О-β-D-галактопиранозида (VIII)

Генистеин-7-О-β-D-галактопиранозид (т.пл. 258-259⁰С) был получен из этилацетатной фракции надземной части клевера (35 мг). Из данных УФ-, ЯМР-¹³С и ЯМР-¹Н спектров этого соединения ($\lambda_{\text{max}}^{\text{этанол}}$ 264, 290, 332 нм) следует, что оно является гликозидом изофлавона (табл. 5), причем в агликоне гликозилирована гидроксильная группа в положении С-7, т.к. при снятии УФ-спектра соединения с добавкой ацетата натрия не наблюдался батохромный сдвиг максимумов поглощения. Также в кольце А имеется свободная гидроксильная группа при С-5, о чем свидетельствует батохромный сдвиг полосы II при снятии УФ-спектра с добавлением хлорида алюминия.

При кислотном гидролизе гликозида VIII был получен генистеин и D-галактоза (ТСХ, ГЖХ).

Ацетилированием соединения VIII уксусным ангидридом в пиридине было получено его гексаацетильное производное (VIIIa). В масс-спектре вещества VIIIa наблюдаются пики ионов 684 (M⁺, 3), 331 (13), 270 (16), 169 (50), 109 (34) и др. Из этих данных следует, что в составе исходного гликозида изофлавона имеется один моносахаридный остаток.

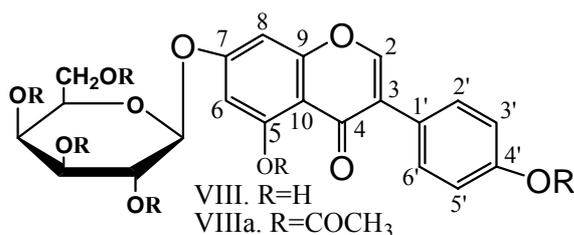


Рис. 4. Галактозид генистеина и его гексаацетат

Сигнал аномерного протона D-галактозы в спектре ЯМР-¹Н (ДМСО-d₆) проявляется в виде дублета с КССВ 6,7 Гц. Этот факт, а также значения химсдвига сигнала углерода С-1 сахарной части δ 100.1 м.д. в спектре ЯМР-¹³С (табл. 5) свидетельствуют о β-конфигурации галактозы.

Обобщив и проанализировав вышеизложенные данные, для соединения VIII мы установили структуру генистеин-7-О-β-D-галактопиранозида.

Таблица 5.

Данные спектров ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C
генистеин-7-О-β-D-галактопиранозид

Атом С	δ _С (м.д.)	δ _H (J, Гц)
Агликон		
2	154.2	8.41 с
3	122.1	
4	181.3	
5	158.2	
6	99.3	
7	162.9	6.47 д (2.0)
8	94.4	
9	158.8	6.73 д (2.0)
10	106.1	
1'	122.8	
2'/6'	130.4	7.40 д (8,1)
3'/5'	115.4	6.82 д (8,4)
4'	162.4	
5-ОН		12.94 с
4'-ОН		9.75 с
Галактоза		
1"	100.1	5.17 д (6,4)
2"	73.2	3.28-3.77
3"	76.5	3.28-3.77
4"	69.7	3.28-3.77
5"	77.3	3.28-3.77
6"	60.4	3.28-3.77

Генистеин-7-О-β-D-галактопиранозид в литературе не описан и является новым соединением.

Идентификация (+)-пинитола (IX)

Элюированием колонки с бутанольной фракцией спиртового экстракта надземной части клевера лугового системой хлороформ-этанол (82:18) было выделено соединение IX (600 мг).

Это вещество состава C₇H₁₄O₆ ([α]_D +65,63⁰) не дает поглощения в УФ- и видимой области, а в его ИК-спектре присутствуют полосы поглощения гидроксильных групп (3600-3250 см⁻¹), колебания алифатических С-С связей (2300-2950 см⁻¹), колебания связей С-О (1175 см⁻¹)

Ацелированием вещества IX хлористым ацетилем было получено его пентаацетильное производное IXa.

В масс-спектре соединения IXa наблюдаются пики ионов с m/z 404 (M^+ , 3), 345 (2), 285 (2), 243 (8), 182 (35), 150 (50), 109 (15), 87 (45), что соответствует структуре метоксиинозитола.

В спектре ЯМР- ^{13}C (ДМСО- d_6) присутствуют сигналы шести атомов углерода циклогексанового кольца, связанных с кислородной функцией (70.1-83.8 м.д.) и сигнал углерода метоксильной группы со значением химсдвига 59.7 м.д.

Таблица 6.
Данные спектров ЯМР- 1H и ЯМР- ^{13}C
соединения IX

Атом С	δ_C (м.д.)	δ_H (J, Гц)
1	70.9	4.47 д (6.6)
2	72.4	4.52 д (4.8)
3	70.1	4.72 д (2.1)
4	72.6	4.63 д (2.1)
5	71.9	4.35 д (5.7)
6	83.8	3.0 т (9.3)
OCH ₃	59.7	3.62 с

В ЯМР- 1H -спектре проявляются сигналы пяти атомов водорода $>CH-OR$ групп циклогексанового кольца в области 4.34-4.73 м.д. и сигналы протонов метоксильной группы. Сигнал протона при С-6 проявляется в виде триплета в сильном поле (табл. 6). Парамагнитный сдвиг сигнала Н-6 по сравнению с таковым циклогексана обусловлен наличием метоксильной группы при ипсо-атоме углерода, а сигналов остальных пяти атомов водорода цикла – наличием пяти спиртовых гидроксильных групп.

Детальный анализ данных ПМР-спектра, сопоставление значений химсдвигов сигналов протонов и значений констант спин-спинового взаимодействия, позволил нам идентифицировать соединение IX как (1R, 2S, 3s, 4S, 5S, 6r)-6-метоксициклогексан-1,2,3,4,5-пентаол (пинитол).

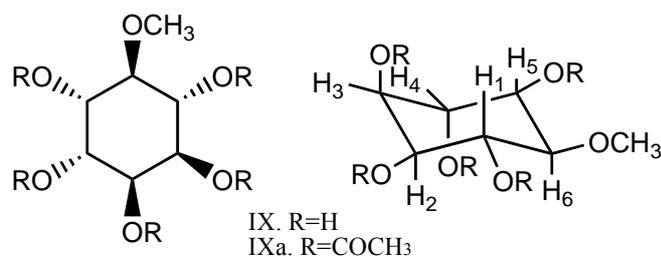


Рис. 5. (+)-пинитол и его ацетилированное производное

У представителей семейства бобовые довольно часто обнаруживают пинитол в больших количествах, однако из клевера лугового это соединение выделено впервые.

Идентификация изофлавонов, выделенных из *Trifolium pratense* L.

Помимо описанных четырех новых соединений, из надземной и подземной частей клевера лугового были выделены 4 известных изофлавона: формонетин (I) (88,3 мг), прунетин (IV) (70 мг), генистеин (V) (60 мг) и прунетин-4'-O-β-D-глюкопиранозид (VI) (350 мг).

В ИК-спектрах этих соединений присутствуют полосы поглощения гидроксильных групп, карбонила γ-пирона и ароматических ядер. В УФ-спектрах наблюдаются максимумы поглощения, характерные для изофлавонов и их производных.

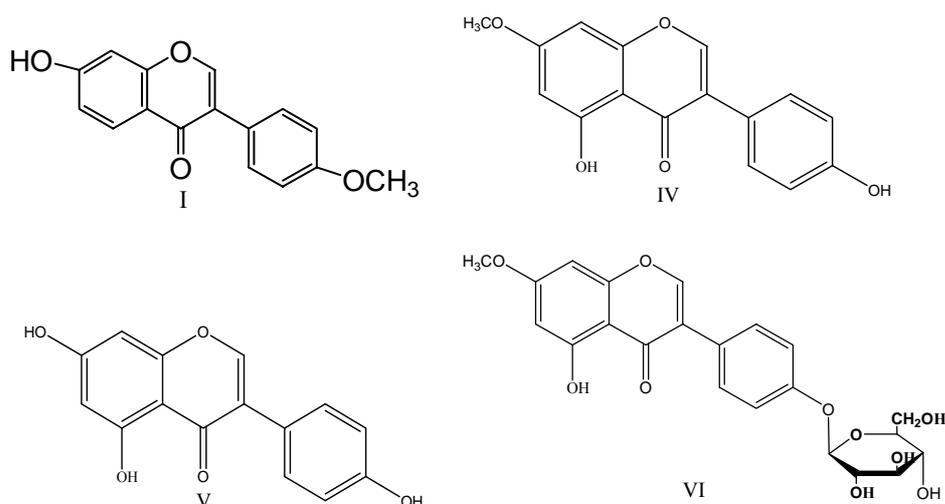


Рис. 6. Известные изофлавоны, выделенные из клевера лугового

В спектрах ПМР имеются характерные сигналы протона Н-2 в виде синглета в области слабого поля (8,05-8,10 м.д.).

Для установления месторасположения заместителей в молекулах выделенных изофлавонов использовалась комбинация методов УФ- и ПМР-спектроскопии, также масс-спектрометрия.

Масс-спектры снимались для ацилированных производных исследуемых веществ.

При установлении структуры гликозида прунетина применяли кислотный гидролиз и идентифицировали отдельно агликон и сахарный остаток. Место присоединения углеводной части к агликону устанавливали методами, перечисленными выше.

Структура, установленная для данных соединений, была подтверждена сравнением с имеющимися образцами.

II. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОФЛАВОНОВ И ФЛАВОНОЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ TRIFOLIUM LUPINASTER L.

Из люпиновидного клевера, собранного на территории Сургутского района, было выделено 4 соединения: гликозид изофлавона – ононин (X) (20 мг), два гликозида кемпферола: 3-О-дигликозид (XI) (5 мг) и 3-О-тригликозид (XII) (15 мг), и (+)-пинитол (400 мг).

Ононин (X) был получен из этилацетатной фракции надземной части люпиновидного клевера и идентифицирован сравнением с имеющимся подлинным образцом, а также на основании данных, полученных методами ИК-, УФ-, ПМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

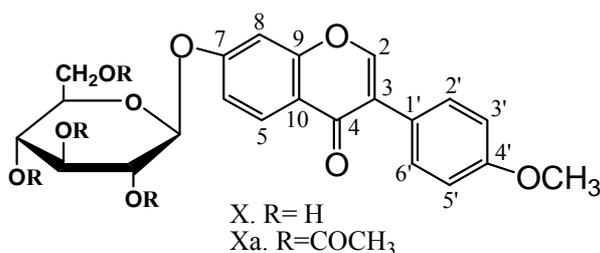


Рис. 7. Формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид (ононин)
и его тетраацетат

Кемпферол-3-О-дигликозид и кемпферол-3-О-тригликозид были получены из бутанольной фракции надземной части клевера и идентифицированы теми же методами, что и ононин.

Эти соединения имеют УФ-спектр, характерный для флавонолов, замещенных по третьему положению. В ИК-спектре имеются полосы поглощения гидроксильных, карбонильной группы и ароматических ядер.

При кислотном гидролизе первого соединения был получен агликон кемпферол, D-глюкоза и D-галактоза. При гидролизе второго – кемпферол, D-глюкоза, D-галактоза и L-рамноза. Последовательность связей сахаров не установлена по причине малого количества вещества. Работа по установлению структуры соединений XI и XII продолжается.

Ононин и (+)-пинитол из люпиновидного клевера выделены впервые.

III. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ФЛАВОНОВ И ФЛАВОНОЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ VICIA SUBVILLOSA (LEDEB.) TRAUTV

Флавоноиды горошка волосистого мы изучали в рамках сотрудничества с Институтом химии растительных веществ (ИХРВ АН республики Узбекистан).

Сбор растительного материала проводился в апреле в период цветения в окрестностях гор Алимтау Чимкентской области Республики Казахстан.

Обработка растительного экстракта и выделение индивидуальных флавоноидов проводилось методами, описанными выше.

Из этилацетатной фракции были получены 7 веществ. Одно из них – висциозид – оказалось новым природным соединением.

Структура висциозида (XVI)

УФ-спектр висциозида, полученного из этилацетатной фракции надземной части в количестве 100 мг, (λ_{\max} 272, 292 пл., 340 нм) характерен для производных флавона.

В ИК-спектре этого соединения имеются полосы колебания гидроксильных групп, карбонила γ -пирона, ароматических C=C связей и C-O колебаний гликозидов.

В спектре ПМР, снятом в ДМСО-d₆, проявляются сигналы пяти ароматических протонов, H-3, аномерного протона (H-1''), протонов фенольных гидроксильных групп при C-5 и C-7.

Хроматографическая подвижность и данные ИК-, ПМР-спектров свидетельствуют о том, что соединение XIX является гликозидом. Это подтверждено получением в результате кислотного гидролиза гликозида XIX лютеолина (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавона) и D-галактозы.

Ацетилированием флавоногликозида уксусным ангидридом в пиридине получили гептаацетильное производное состава C₃₅H₃₄O₁₈, т.пл. 118-120° С (M⁺ 742).

Батохромный сдвиг полосы I в УФ-спектре флавоноида XVI при добавлении ацетата натрия и наличие сигнала протона при 10,85 м.д. (7-ОН группа) в спектре ПМР указывают на наличие свободной фенольной гидроксильной группы в положении 7 гликозида.

Место присоединения углеводного остатка к агликону установили сравнительным изучением УФ-спектров исследуемого гликозида и лютеолина, снятых в присутствии ионизирующих и комплексообразующих добавок.

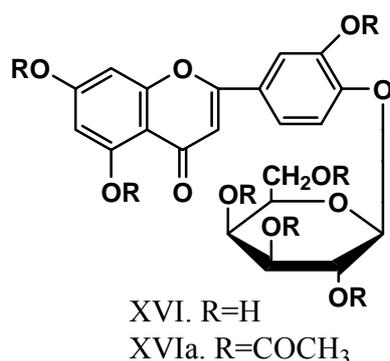


Рис. 8. Висциозид и его гептаацетат

Величина батохромного сдвига полосы I в спектре флавоногликозида при добавлении AlCl₃ и AlCl₃/HCl (+46 нм) свидетельствует об отсутствии орто-диоксигруппы в кольце В. В присутствии CH₃COONa в УФ-спектре соединения наблюдается батахромный сдвиг полосы I на 55 нм с уменьшением интенсивности

максимумов поглощений, что указывает на гликозирование 4'-ОН группы лютеолина в молекуле рассматриваемого флавоногликозида.

Сигнал аномерного протона D-галактозы в спектре ПМР гликозида проявляется при 4.90 м.д. в виде дублета с КССВ 7.0 Гц. Это свидетельствует о β -конфигурации гликозидного центра D-галактозы. Следовательно, гликозид имеет строение лютеолин-4'-О- β -D-галактопиранозида.

В литературе имеются сообщения об обнаружении 4'-О-арабинозида, 4'-О-глюкозида и 4'-О-глюкуронида лютеолина, сведения о лютеолин-4'-О- β -D-галактопиранозиде отсутствуют.

Структура флавонов и флавонолов, выделенных из горошка волосистого

Структура шести известных соединений, выделенных из этилацетатной фракции горошка волосистого – апигенина (XIII) (150 мг), лютеолина (XIV) (240 мг), кверцетина (XV) (220 мг), цинарозида (XVII) (190 мг), лютеолин-4'-О- β -D-глюкопиранозида (XVIII) (160 мг), изокверцитрина (XIX) (120 мг) – была установлена методами ПМР-, ИК-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. В случае гликозидов применялся кислотный гидролиз и отдельно идентифицировались агликони и сахарные остатки.

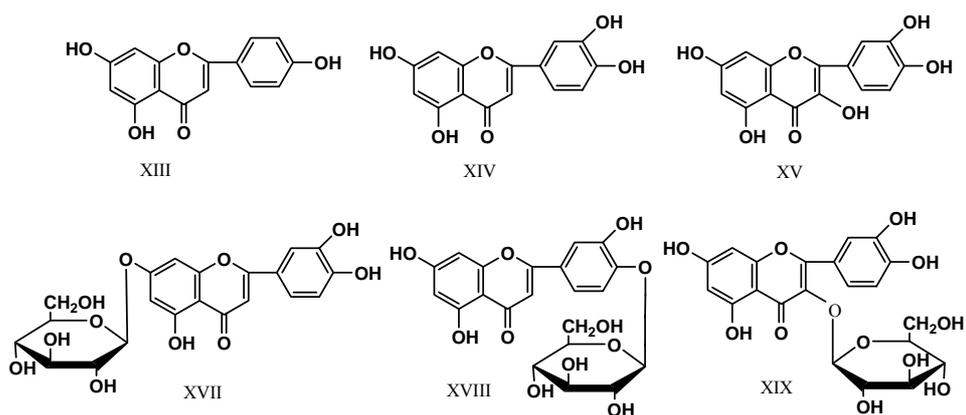


Рис. 9. Известные флавоноиды, выделенные из *Vicia subvillosa*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Для выделенных нами изофлавоноидов формонетина, ононина и генистина сотрудниками лаборатории фармакологии Института химии растительных веществ АН РУз установлена гиполипидемическая и гипохолестеринемическая активность, превосходящая таковую официального лекарственного препарата «Гемфеброзил». Также для этих соединений была установлена ингибирующая активность по отношению к Na^+, K^+ -АТФ-азе.

(+)-Пинитол обладает антидиабетическими и гипогликемическими свойствами и запатентован в качестве лекарственного средства в США.

ВЫВОДЫ

1. Изучен химический состав флавоноидов трех видов растений семейства Fabaceae: *Trifolium pratense* L., *Trifolium lupinaster* L., *Vicia subvillosa* (Ledeb.) Trautv. Выделено 19 соединений, представленных флавонами, флавонолами, изофлавонами, птерокарпанами, их гликозидами и циклополиолом.
2. Из корней клевера лугового выделены новые моногалактозиды изофлавоноидов: формонетин-7-О-β-D-галактопиранозид и инермин-3-О-β-D-галактопиранозид, а также известный изофлавоноид формонетин (7-гидрокси-4'-метоксиизофлавоноид). Из надземной части этого растения получены новые соединения прунетин-4'-О-α-D-глюкопиранозид, генистеин-7-О-β-D-галактопиранозид и известные изофлавоны формонетин, прунетин, генистеин, прунетин-4'-О-β-D-глюкопиранозид. Структура новых соединений установлена на основании данных химических превращений (ацетилирование, гидролиз), а также методами УФ-, ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C, масс-спектрометрии и спектроскопии кругового дихроизма.

3. Впервые изучен клевер люпиновидный. Из надземной части выделены известное соединение ононин, а также 3-О-дигликозид и 3-О-тригликозид кемпферола.
4. Обнаружены новые источники циклополиола (+)-пинитола – надземная часть клевера лугового и клевера люпиновидного –, обладающего антидиабетическими и гипогликемическими свойствами
5. Из надземной части горошка волосистого получен новый гликозид флавонола висциозид (лютеолин-4'-О-β-D-галактопиранозид), а также впервые выделены известные соединения: апигенин, лютеолин, кверцетин, цинарозид, лютеолин-4'-О-β-D-глюкопиранозид, изокверцитрин.
6. Впервые были проведены структурные исследования флавоноидов растений территории Ханты-Мансийского автономного округа.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Дренин А.А., Ботиров Э.Х., Петруляк Е.В.. Два новых моногалактозида изофлавоноидов из корней *Trifolium pratense* L. // *Химия природ. соед.* – 2008. – Т.44. - №1. – С.21-23.
2. Дренин А.А., Ботиров Э.Х., Петруляк Е.В. Новый моногалактозид генистеина из надземной части *Trifolium pratense* L. // *Химия природ. соед.* – 2008. – Т.44. - №2. – С.141-143.
3. Юлдашев М.П., Муминова Б.А., Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды надземной части *Vicia subvillosa* // *Химия природ. соед.* – 2007. – Т.43.– № 1. – С. 30-31.
4. Drenin A.A., Botirov E.Kh. New Galactosides of isoflavonoids from *Trifolium pratense* L. / *Seventh Intern. Symp. on the Chemistry of Natur. Compounds: Abstracts.* – Tashkent, 2007. – P. 76.
5. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Новые моногалактозиды изофлавоноидов из подземной части *Trifolium pratense* L. / *Новые достижения в химии*

- и химической технологии растительного сырья: Материалы III Всероссийской конференции. – Барнаул, 2007 г. – кн.2. – С. 295-298.
6. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Новые моногалактозиды изофлавоноидов из клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) / Химия и медицина: Материалы VI-го Всероссийского научного семинара с молодежной научной школой (с международным участием). – Уфа, 2007. – С.49-51.
 7. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Выделение и изучение флавоноидов *Trifolium pratense* L. / Наука и инновации XXI века: Материалы VII Открытой окружной конференции молодых ученых. – Сургут, 2006 г. – С. 90-92.
 8. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Новые гликозиды изофлавонов из клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) / Наука и инновации XXI века: Материалы VIII Открытой окружной конференции молодых ученых. – Сургут, 2007 г. – С. 84-86.