УДК 615.322:582.973

■ С.Н. Коваленко, д. хим. н., проф., проректор по научной работе
Ю.И. Губин, к. фарм. н., ст. н. с.
Т.Д. Гусарова, аспир., ассист., каф. управления качеством

■ *Национальный фармацевтический университет, г. Харьков*

ВЫДЕЛЕНИЕ ИРИДОИДОВ SYMPHORICARPOS ALBUS

Снежноягодник – *Symphoricarpos L.* – род *Symphoricarpos Duhamel* растений семейства жимолостных *Caprifoliaceae*. В природе снежноягодник встречается, главным образом, в Северной Америке. На территории Украины распространены следующие виды снежноягодника [2, 3]: *Symphoricarpos albus L. Blake (S. racemosus Michaux, Vaccinium album L., S. rivularis Suksdorf)* – снежноягодник белый или кистевой; *S. chenaultii Rehd.* – с. Шено; *S. hesperius Jones.* – с. полночный; *S. microphyllus H. B. K.* – с. мелколистный; *S. mollis Nutt.* – с. мягкий; *S. occidentalis Hook.* – с. западный; *S. orbicukatus Moench.* – с. округлый или обыкновенный; *S. oreophilus Gray.* – с. горолюбивый; *S. rotundifolius Gray.* – с. круглолистный.

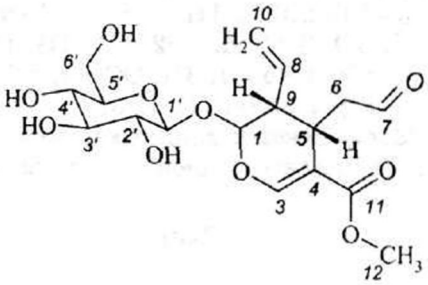
Снежноягодник получил широкое распространение для декоративных целей, в фитохимическом плане виды снежноягодника мало изучены. Имеются сведения, что он содержит углеводы [5], фенольные кислоты [12] и вещества иридоидного происхождения, в том числе секологанин (I) и логанин (II) (рис. 1) [1].

Известно, что секологанин – монотерпеновый гликозид – в растениях является предшественником для более 650 иридоидных веществ и около 2500 индольных, изохинолиновых соединений. Секологанин – основной полупродукт в биосинтезе резерпина, аймалина, винбластина, йохимбина и других биологически активных веществ [7, 9, 11]. Сообщается об антимикробном действии секологанина [6].

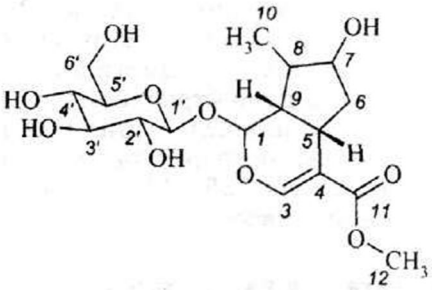
Логанин – монотерпеновый гликозид с горьким вкусом. Является важным веществом в биосинтезе индольных алкалоидов. Изучено противовоспалительное действие логанина [4]. Логанин и секологанин проявляют также умеренную противоопухолевую активность [16].

Эти соединения характеризуются наличием реакционноспособных функциональных групп, что позволяет использовать их в качестве полупродуктов для синтеза новых биологически активных веществ [11, 14]. Нами был разработан простой и удобный способ получения секологанина и логанина с целью дальнейшего изучения их производных.

Как источник иридоидов научный интерес вызывает снежноягодник белый (*S. albus L. Blake*). В литературе описаны способы выделения секологанина и логанина из плодов только этого вида снежноягодника [5, 13, 17], включая нижеперечисленные методы. Секологанин был получен из растительного сырья – плодов *S. albus L.* посредством центробежной распределительной хроматографии (centrifugal partition chromatography (CPC)) (Sanki Engineering, model NMF, Япония); система растворителей: этилацетат – изопропанол – вода (4:2:7, об/об/об); верхний слой был подвижной фазой. Скорость центрифугирования 1200 об/мин, УФ детектор (260 нм). При скорости потока 1 мл/мин$^{-1}$ чистый секологанин элюировался между 110 и 180 мл после введения образца [10]. Тьетц Л.Ф. с соавторами предложили следующий способ получения секологанина [14]. Плоды *S. albus L.* измельчали вместе с ацетоном и полученную смесь фильтровали. Фильтрат центрифугировали для удаления взвешенных частиц, концентрировали в вакууме при 30° С и подвергали лиофильной сушке. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюент: этилацетат - изопропанол (3:1). Ким Х.К. с соавторами для определения



I



II

Рис.1. Иридоиды Symphoricarpos albus – секологанин (I) и логанин (II)

© С.Н. Коваленко, Ю.И. Губин, Т.Д. Гусарова. 2007

самого эффективного способа выделения секологанина из *S. albus* проводили оценку следующих методов: обработка ультразвуком с органическими растворителями и водой, микроволновая экстракция и экстракция горячей водой [8]. Самым эффективным определили метод обработки ультразвуком метанольного экстракта плодов *S. albus*.

Материалы и методы

В данной работе использованы плоды снежноягодника белого, собранные в ноябре 2005 г. в Ботаническом саду Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (Украина).

Для идентификации выделенных веществ использовали хроматографические и спектральные методы анализа. Спектры ^{1}H ЯМР записаны на спектрометре Varian WXR-400 (рабочая частота 400 MHz) в ДМСО-d_6, внутренний стандарт – ТМС. Масс-спектры записаны с помощью LCMS-системы анализа многокомпонентных смесей органического происхождения, включающую: Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avp, автосамплер Gilson 215, ELSD (evaporative light scattering detector) Sedex 75 (55), масс-спектрометр PE SCIEX API 165 (150), Canada. Тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле на пластинах Sorbfil UV-254 (10 см х 15 см) (ЗАО "Сорбполимер" г. Краснодар, Россия) в системе растворителей хлороформ - метанол (85:15).

Для проявления хроматограмм применяли реагент ванилин - серная кислота. Пластинку опрыскивали 1% раствором ванилина в этаноле, затем 10% раствором серной кислоты в этаноле. После нагревания до 110° С в течение 3-5 мин. пластинку просматривали в дневном свете [15].

Температуру плавления выделенных веществ определяли на блоке Кофлера. Удельное вращение – на поляриметре круговом СМ-3.

Для колоночной хроматографии применяли силикагель с размером частиц 40-60 мкм (Aldrich), предварительно отмытый от ионов металлов следующим способом: к 1 кг силикагеля приливали 2 л 0,1М раствора соляной кислоты. Перемешивали с помощью электрической мешалки в течение 2 часов. После настаивания в течение суток силикагель переносили на воронку Бюхнера. Дистиллированной водой отмывали до нейтральной реакции промывных вод. Силикагель сушили на воздухе при комнатной температуре и активировали при температуре 135-140° С в течение 3 часов в сушильном шкафу.

Результаты и их обсуждение

Логанин и секологанин получали экстракцией 10,7 кг плодов снежноягодника н-бутанолом при соотношении сырье : растворитель 1 : 3,5 (10 раз), с добавлением 2,14 кг сульфата натрия безводного для улучшения и ускорения экстракции. Экстракт отделяли от шрота, концентрировали в вакууме на кипящей водяной бане до выпадения осадка, представляющего собой высокополярные вещества растения (олигосахариды, органические кислоты, соли и др.). После охлаждения до комнатной температуры бутанольный раствор декантировали и упаривали в вакууме досуха. Полученный сухой остаток хроматографировали на колонке с силикагелем с градиентом элюента в 1%, начиная с чистого хлороформа до смеси метанол - хлороформ (25:75).

Было собрано 200 фракций элюата по 20 мл. Содержание целевых веществ в элюатах контролировали с помощью ТСХ. В качестве образцов сравнения на хроматограммы наносили образцы секологанина и логанина (Fluka).

Фракции 92-117, содержащие секологанин, после объединения упаривали. Секологанин на хроматограмме проявляется фиолетовым пятном с Rf=0.51 в системе растворителей хлороформ – метанол (85:15). Кристаллизация: из изопропилового спирта с гексаном. Секологанин был получен в количестве 1,73 г. Кристаллы белого цвета. $[\alpha]^{25}_D$ =-85°±5° (с 0.5, MeOH). Спектр ^{1}H-ЯМР, δ, м.д.: 2.95 (t, 4H, H-5, 6_2, 9), 3.70 (m, 3H, OCH_3) 4.45 (d, J=8 Гц, 1H, H-1´), 5.35 (m, 4H, H-1, 8, 10_2), 7.45 (d, J=2 Гц, 1H, H-3).

Масс-спектр секологанина характеризуется массовыми числами, представленными в табл. 1.

Фракции 139-163, содержащие логанин, после объединения упаривали. Полученную воскообразную массу растворяли в горячем изопропиловом спирте. При охлаждении до комнатной температуры, из раствора выпадали бесцветные кристаллы. Логанин был получен в количестве 4,48 г. На хроматограмме логанин проявляется фиолетовым пятном с R_f=0.42 в системе растворителей хлороформ - метанол (85:15). Температура плавления 203-218° С. $[\alpha]^{25}_D$=-109°±6° (с 1.0, MeOH). Спектр ^{1}H-ЯМР, δ, м.д.: 0.95 (dd, J=8.0, 8.0 Гц 3H, CH_3), 1.42 (m, 1H, H-9), 1.75 (m, 2H, H-6), 2.10 (dd, J=8.0, 9.0 Гц 1H, H-5), 3.65 (m, 4H, H-2´, 3´, 4´, 5´), 3.85 (d, J=2.0 Гц 1H, H-7), 4.5 (m, 2H, H-6´), 4.95 (m, 3H, OCH_3), 5.1 (d, J=8 Гц, 1H, H-1´), 7.35 (s, 1H, H-3).

Масс-спектр логанина характеризуется массовыми числами, представленными в табл. 2.

Выводы

- **Предложен простой способ выделения веществ иридоидного типа, в том числе логанина и секологанина, из плодов снежноягод-**

Таблица 1.

Характеристика масс-спектра секологанина

Массовые числа	Молекулярная масса, а.е.м.	$C_{17}H_{24}O_{10}$
389=M+1	М.м.$_{секологанина}$=388.37	
227=агликон+1	М.м.$_{агл.секолог.}$=226.23	
209=агликон-H_2O+1	М.м.$_{агл.секолог.}$=226.23 М.м.$_{воды}$=18.020	
195=агликон-CH_3O	М.м.$_{агл.секолог.}$=226.23 М.м.CH_3O=32.040	
177=глюкоза-3	М.м.$_{глюкозы}$=180.16	
151=глюкоза-CH_2OH	М.м.$_{глюкозы}$=180.16 М.м.CH_2OH=32.040	
139=глюкоза-CH_2CHO+2	М.м.$_{глюкозы}$=180.16 М.м.CH_2CHO=43.050	
107=(глюкоза-CH_2OH) - CH_2CHO	М.м.$_{глюкозы}$=180.16 М.м.CH_2OH=32.040 М.м.CH_2CHO=43.050	

Таблица 2.

Характеристика масс-спектра логанина

Массовые числа	Молекулярная масса, а.е.м.	$C_{17}H_{26}O_{10}$
391=M+1	М.м.$_{логанина}$=390.39	
229=агликон+1	М.м.$_{агл.логанина}$=228.25	
211=агликон-H_2O	М.м.$_{агл.логанина}$=228.25 М.м.$_{воды}$=18.020	
197=агликон-CH_3O	М.м.$_{агл.логанина}$=228.25 М.м.CH_3O=32.040	
179=глюкоза-1	М.м.$_{глюкозы}$=180.16	
160=(глюкоза-1)-H_2O-1	М.м.$_{глюкозы}$=180.16 М.м.$_{воды}$=18.020	
151=агликон-CH_3O-CO	М.м.$_{агл.логанина}$=228.25 М.м.CO=28.010 М.м.CH_3O=32.040	
149=179-CH_2OH+1	М.м.CH_2OH=32.040	

ника белого с целью дальнейшего изучения их производных.

Проведена экстракция плодов снежноягодника белого *Symphoricarpos albus L. Blake* бутанолом с последующей концентрацией экстракта, фильтрованием, получением сухого остатка фильтрата и хроматографическим выделением целевых веществ на колонке с силикагелем, элюент – смесь хлороформ-метанол с градиентом концентрации.

· Идентифицированы два соединения – секологанин и логанин. Структура выделенных веществ подтверждена данными ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Література

1. Бакуридзе А.Д., Даргаева Т.Д., Николаева Г.Г.и др. Иридоиды растений рода Gentiana из семейства Gentianaceae // Хим. природ. соед. – 1987 – №1. – С. 3-11.

2. Деревья и кустарники, культивируемые в Украинской ССР. Покрытосеменные. Справ. пособие / Под общ. ред. Кохно Н.А. – Киев: Наук. думка, 1986. – С. 463-465.

3. Определитель высших растений Украины. – Киев: Наук.думка, 1987. – С. 246.

4. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / За ред. проф. В.М. Ковальова. – Харків: Прапор, 2000 – С. 323.

5. Geerlings, A., Redondo F. J., Contin A. et al. Biotransformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast // Applied Microbiol. and Biotechnol. – 2001. – Vol. 56, № 3-4. – P. 420-424.

6. Graikou K., Aligannis N; Chinou I.B.; Harvala C. Cantleyoside-dimethyl-acetal and other iridoid glucosides from Pterocephalus parennis – antimicrobial activities // J. of Biosciences. – 2002. – Vol. 57 № 1-2. – P. 95-99.

7. Inoue K. Cytochrome P450 enzymes in biosyntheses of some plant secondary metabolites // Gifu Yakugaku Zasshi. – 2005. – Vol. 125, № 1. – P. 31-49.

8. Kim H.K., Choi Y.H., Luijendijk T. et al. Comparison of extraction methods for secologanin and the quantitative analysis of secologanin from Symphoricarpos albus using 1H-NMR // Phytochem. analysis. – 2004. – Vol.15, № 4. – P. 257-261.

9. Liu J. Biogenetically patterned synthesis of monoterpenoid indole alkaloids from secologanin and its derivatives // Youji Huaxue. – 2003. – Vol. 23, № 8. – P. 784-793.

10. Silvestrini A., Pasqua G., Botta B. et al. Effects of alkaloid precursor feeding on a Camptotheca acuminate cell line // Plant Physiol. Biochem. – 2002. – № 40. – P. 749-753.

11. Szabo L.F. Some aspects of the chemistry of secologanin // Studies in Natural Products Chem. – 2002. – Vol. 26 (Bioactive Natural Products, (Part G)). – P. 95-148.

12. Szaufer-Hajdrych M, Zgórka G. Phenolic acids from Symphoricarpos albus (L.) Blake (Caprifoliaceae) // Acta Pol. Pharmac. – 2003. – Vol. 60, № 1. – P. 91-95.

13. Tanahashi T., Nagakura N., Inouye H., Zenk M.H. Radioimmunoassay for the determination of loganin and the biotransformation of loganin to secologanin by plant cell cultures // Phytochem. (Elsevier). – 1984. – Vol. 23, № 9. – P. 1917-22.

14. Tietze L. F., Henke S., Bärtels C. Biomimetic Transformations of the Biogenetic Key Intermediate Secologanin // Tetrahedron. – 1988. – Vol.44, № 23. – P. 7145-7153.

15. Wagner H., Bladt S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. – P.86-87, 364.

16. Wang Y., Wei Q., Yang L., Liu Zh. Iridoid glucosides from Chinese herb Lonicera chrysatha and their antitumor activity // J. of Chem. Research, Synopses. – 2003. – № 10. – P. 676-677.

17. Whitmer S., van der Heijden R., Verpoorte R. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of Catharanthus roseus // J. of Biotechn. – 2002. – № 96. – P. 193-203.

Надійшла до редакції 12.03.2007

УДК 615.322:582.973

С.М. Коваленко, Ю.І. Губін, Т.Д. Гусарова

ВИДІЛЕННЯ ІРИДОЇДІВ SYMPHORICARPOS ALBUS

Ключові слова: сніжноягідник білий, іридоїди, секологанін, логанін.

Наведено огляд способів виділення секологаніну з плодів сніжноягідника білого Symphoricarpos albus L. Blake. Запропоновано простий спосіб виділення речовин іридоїдного типу, у тому числі логаніну та секологаніну, з плодів сніжноягідника білого. Екстракцію проводили бутанолом 10 разів при співвідношенні сировина : розчинник 1 : 3,5 з подальшим концентруванням екстракту, фільтруванням, одержанням сухого залишку фільтрату та хроматографічним виділенням секологаніну і логаніну на колонці із силікагелем, елюент: суміш метанол - хлороформ з градієнтом концентрації. Наведено фізико-хімічні властивості та біологічна активність логаніну та секологаніну.

S.M. Kovalenko, Yu.I. Gubin, T.D. Gusarova

ISOLATION OF THE IRIDOIDS FROM SYMPHORICARPOS ALBUS

Key words: Symphoricarpos albus L. Blake, iridoids, secologanin, loganin.

The review of isolation methods of secologanin from the berries of Symphoricarpos albus L. Blake has been described. The simple method of isolation of iridoids, among them loganin and secologanin, was proposed. The berries of Symphoricar-pos albus L. Blake were extracted with n-butanol 10 times at correlation raw mate-rial : solvent 1 : 3,5. The extract was concentrated and filtrated. Dry remain of fil-trate was chromatographed on silica gel, by mixture chloroform and methanol with the gradient of concentration as eluent. Physicochemical properties and biological activity of loganin and secologanin was presented.