

УДК 615.322:582.973

- Т. Д. Гусарова, ассист. каф. упр. качеством,
- С. Н. Коваленко, д. хим. н., проф., проректор по научн. работе,
- И. Ф. Макаревич, д. хим. н., проф. каф. упр. качеством,
- Ю. И. Губин, к. фарм. н., доц. каф. упр. качеством,
- А. Н. Мурашко, к. фарм. н., доц. каф. упр. качеством

■ Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

## ПОЛУЧЕНИЕ АГЛИКОНА ЛОГАНИНА ИЗ ПЛОДОВ SYMPHORICARPOS ALBUS

В последнее время наблюдается повышенный интерес к иридоидам [5], в частности к таким биологически активным веществам, как логанин **1**, логанигенин (логанетин, агликон логанина) **2**, секологанин **3** [9, 15, 17] (рис. 1). Среди данного класса соединений особый интерес вызывает логанигенин **2**, который обладает широким спектром биологической активности, а именно: противовоспалительной, противоопухолевой, гипогликемической [4, 10, 12]. М. Анью с соавторами использовали агликон логанина для синтеза новых биологически активных соединений [6]. Поэтому выделение логанигенина из растительного сырья и дальнейшее его исследование является актуальным и перспективным направлением в современной фитохимии.

В литературе описаны несколько способов выделения агликон логанина **2** из различных растений. Логанигенин **2** был выделен группой исследователей под руководством М. Кардони из коры тропического дерева *Calycophyllum spruceanum* [19], Р. Камби с соавторами – из древесины *Scaevola floribunda* [7], М. Кацуёши – из *Strychnos ligustrina* [13]. В работах С. Хуанг и др. описано выделение агликон логанина из *Menyanthes trifoliata* L [10], Мпондо Е. – из *Gentiana verna* [14]. Отсутствие или труднодоступность сырьевой базы в Украине вышеперечисленных растений побудило нас провести анализ отечественного сырья, содержащего иридоиды. В качестве сырья для наших исследований был выбран снежноягодник белый (*Symphoricarpos albus* (L.) Blake), который широко распространен в Украине, как декоративный кустарник [2]. Наличие иридоидов в этом

сырье ранее было экспериментально установлено Танахаши Т., Гирлингсом А. и соавт. [8, 16], а нами ранее был разработан способ выделения секологанина и логанина из этих плодов [3].

В настоящей работе мы поставили задачу разработать способ получения логанигенина **2** из плодов снежноягодника белого (*Symphoricarpos albus* (L.) Blake), который бы имел препаративное значение. Существуют два подхода к решению этой задачи. Первый подход основан на получении агликон логанина из гликозида логанина **1** путем ферментативного гидролиза, второй подход основан на непосредственном выделении логанетина **2** из плодов снежноягодника. В настоящей работе мы провели сравнительный анализ возможностей этих технологий.

Плоды *Symphoricarpos albus* (L.) Blake собирали в октябре-ноябре 2006 г. в Ботаническом саду Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (Украина). Содержание воды в плодах 86-88%, что было учтено нами при их переработке [1]. Выделенный логанин из плодов *Symphoricarpos albus* подвергали ферментативному гидролизу [3]. Логанин в количестве 0,2 г растворяли в 2 мл воды, прибавляли 0,1 г ферментного препарата, полученного из виноградной улитки *Helix pomatia* [11]. Смесь выдерживали в термостате 22 часа при температуре 40 °С, после чего прибавляли 8 мл изопропилового спирта и нагревали до четкого отделения осадка ферментов. Фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме досуха. Полученную смесь веществ в количестве 0,15 г хроматографировали на колонке с силикагелем в соотношении 1 : 50. В качестве элюента использовали смесь растворителей хлороформ-

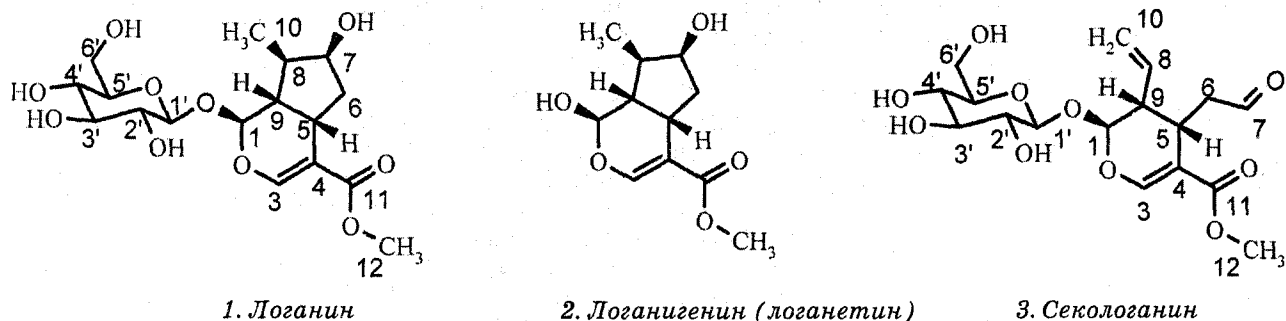


Рис. 1. Иридоиды снежноягодника

метанол (от чистого хлороформа до содержания метанола в хлороформе 3%). Было собрано 20 фракций элюата по 5 мл. Содержание целевого вещества в элюатах контролировали с помощью ТСХ. Вещество 2 на хроматограмме после обработки реактивом ванилин – серная кислота проявляется фиолетовым пятном с  $R_f = 0,23$  в системе растворителей хлороформ-метанол (97:3). Фракции 8-17, содержащие индивидуальное вещество, объединяли и упаривали в вакууме. Получено 0,07 г агликона логанина, с содержанием основного вещества 80%. Была проведена дополнительная очистка с помощью хроматографа Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avp с масс-спектрометрическим детектором. Масс-спектр полученного логанигина согласуется с представленной структурой 2.

Структура выделенного соединения подтверждена данными  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре логанигина наблюдается характерный сигнал для протона в 3 положении в виде синглета в области 7.2 м.д. и для протона гидроксильной группы в 1 положении – в области 7.4 м.д. Для сложноэфирной группы  $\text{OCH}_3$  характерный мультиплет в области 3.65 м.д. Протоны метильной группы в 10 положении наблюдаются в виде дублета в области 1.05 м.д. (см. эксп. часть).

Используя полученный образец агликона логанина в качестве рабочего стандартного образца, был проведен его поиск в плодах снежноягодника белого. 4 Кг плодов измельчали и экстрагировали *n*-бутанолом (12 x 3 л). Для ускорения процесса экстракции добавляли безводный сульфат натрия в количестве 10% от веса плодов. Полученный экстракт концентрировали на водяной бане до выпадения осадка. Декантировали бутанольный раствор и упаривали досуха. Остаток растворяли в 300 мл воды и добавляли гексан в количестве 300 мл. Водный слой, отмытый гексаном, упаривали досуха. Полученный сухой экстракт (41 г) хроматографировали на колонке ( $D = 7,5$  см,  $L = 100$  см) с силикагелем при соотношении разделяемых веществ: адсорбент 1 : 20. В качестве элюента использовали смесь растворителей этилацетат : изопропиловый спирт с градиентом элюента в 1% и шагом 300 мл (от чистого этилацетата до содержания изопропилового спирта в этилацетате 6%).

Было собрано 70 фракций элюата по 30 мл. Содержание целевого вещества в элюатах контролировали с помощью ТСХ. Вещество 2 на хроматограмме проявляется фиолетовым пятном с  $R_f = 0,23$  в системе растворителей хлороформ-метанол (97 : 3). Фракции 15-49, содержащие вещество 2, после объединения упаривали в вакууме. Получили 3,1 г вещества, которое дополнительно очищали на хроматографических колонках. В качестве элюента использовали смесь растворителей в такой последовательности: 1) хлороформ : четыреххлористый углерод в соотношении 1 : 1 (200 мл); 2) хлороформ (500 мл); 3) хлороформ : метиловый спирт, с

содержанием последнего 0,5% (300 мл). Получили 0,45 г вещества 2 (степень чистоты 70%) хроматографически идентичного логанигенину, полученного ферментацией логанина. Дополнительную очистку проводили с помощью хроматографа Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avp с масс-спектрометрическим детектором. Масс-спектр агликона логанина, выделенного из плодов снежноягодника белого, согласуется с представленной структурой 2 и характеризуется следующими массовыми числами,  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ , %): 474,4 (71); 246,3 (94); 229,2 ( $M^+$ , 100), 170 (53).

Исходя из полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод, что наиболее приемлемым является способ получения логанигина путем ферментации исходного гликозида. При перерасчете на 10 кг плодов снежноягодника выход логанигина, полученного ферментативным путем, – 1,17 г; прямой экстракцией – 0,78 г. При этом степень чистоты выделенных соединений – 80% и 70% соответственно.

#### Экспериментальная часть

Тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле на пластинах Sorbfil UV-254 (10 см x 15 см) (ЗАО “Сорбполимер”, г. Краснодар, Россия) в системе растворителей хлороформ-метанол (от 97 : 3).

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 [18].

Для колоночной хроматографии применяли силикагель с размером частиц 40–60 мкм (Aldrich), предварительно отмытый от ионов металлов 0,5% раствором соляной кислоты. Силикагель сушили на воздухе при комнатной температуре и активировали при температуре 130–140 °С в течение 3 часов в сушильном шкафу.

Спектры ПМР записаны на спектрометре Varian WXR-400 (рабочая частота 400 МГц) в ДМСО- $d_6$ , внутренний стандарт – ТМС (рис.2).

LCMS-система анализа многокомпонентных смесей органического происхождения включает: Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avp, автосамплер Gilson 215, ELSD (evaporative light scattering detector) Sedex 75 (55), масс-спектрометр PE SCIEX API 165 (150), Канада.

Параметры проведения анализа раствора образца: колонка Synergi 2u Hydro-RP Mercury, 20x2,0 mm; объем вводимой в хроматографическую колонку пробы, – 4,0 мкл; растворитель А – вода с 0,05% ТФУК; растворитель В – ацетонитрил с 0,05% ТФУК; объемная скорость потока элюента – 0,50 мл/мин.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.д.: 1.05 д (J 8.0 Гц, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.35 м (1H, H-9), 1.65 м (2H, H-6), 2.05 дд (J 6.0, 6.0 Гц 1H, H-8), 2.95 м (1H, H-

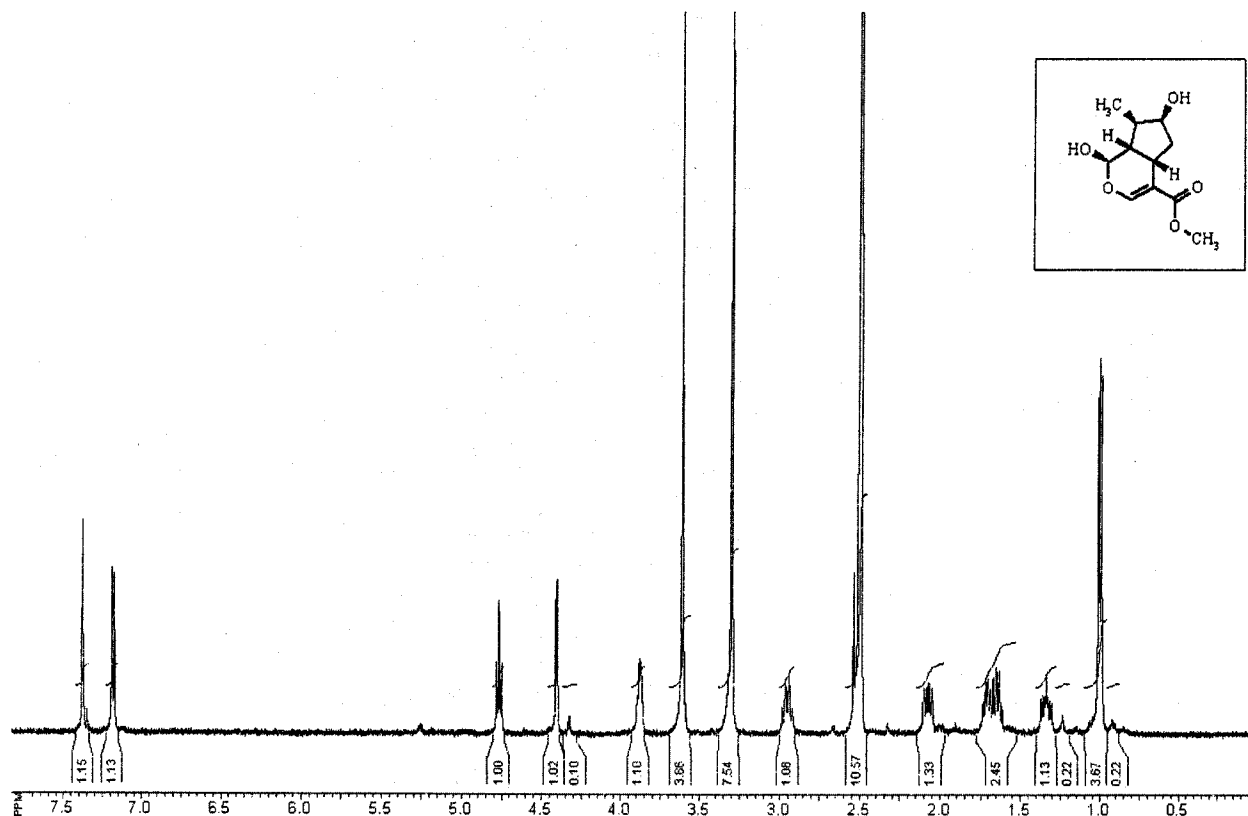


Рис. 2. ПМР-спектр аглікона логаніна 2

5), 3.65 м (3H, OCH<sub>3</sub>), 3.90 д (J 2.0 Гц 1H, H-7), 4.45 д (J 3.0 Гц 1H, OH-7), 4.75 т (1H, H-1), 7.2 д (J 7.0 Гц, 1H, OH-1), 7.4 с (1H, H-3).

m/z (I<sub>гн</sub>, %): 474.3 (100); 457.4 (18); 246.3 (41); 229.2 (M<sup>+</sup>, 31).

### Выводы

Разработаны два способа выделения логанигена 2 из плодов снежноягодника белого (*Symphoricarpos albus (L.) Blake*). Первый способ получения агликона логанина 2 основан на ферментативном гидролизе гликозида

логанина 1, второй способ получения основан на непосредственном выделении логанетина 2 из плодов снежноягодника. Проведен сравнительный анализ данных технологий. Показано, что более приемлемым методом является способ получения агликона логанина 2 путем ферментации исходного гликозида логанина. Структура выделенного логанетина 2 подтверждена данными <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

### Література

1. Гусарова Т.Д., Гусаров В.І., Губін Ю.І. Тези доп. Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, 17-18 травня 2007 р. — Х., 2007. — С. 48-49.
2. Деревья и кустарники, культивируемые в Украинской ССР. Покрытосеменные. Справ. пособие / Под общ. ред. Козно Н.А. — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 463-465.
3. Коваленко С.М., Губін Ю.І., Гусарова Т.Д. // Фітотерапія. Часопис. 2007. — №2 С. 65-68.
4. Пат. WO 2004089926 (2004) Preparation of genipin derivs. for use in pharmaceutical compns. as inhibitors of the activity of uncoupling protein-2 (UCP2). Zhang Ch., Lowell B. B., Porco J. A. Jr., Shen R., Lin Ch. T., Krauss S. // C. A. — 2004. — Vol. 141. — 366346.
5. Путырский И., Прохоров В. Универсальная энциклопедия лекарственных растений. — М.: Махаон, 2000. — 656 с.
6. Anju M.P., Vijayavithal M.T., Kanwal R. et al. Modified iridoid glycosides as anti-implantation agents: inhibition of cell adhesion as an approach for developing pregnancy interceptive agents // Bioorg. & Med. Chem. — 2001. — Vol. 9, № 11. — P. 2763-2772.
7. Cambie R. C., Rutledge P. S., Wellington K. D. Chemistry of Fijian Plants XIII. Floribunda, a nonglycosidic

bisiridoid, and six novel fatty esters of  $\delta$ -amyirin from *Scaevola floribunda* // *J. of Nat. Prod.* – 1997. – Vol.60, №12. – P. 1303-1306.

8. Geerlings A., Redondo F. J., Contin A. et al. Bio-transformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 2001. – V. 56, № 3-4. – P. 420-424.

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

10. Huang L. C., Tunon H., Bohlin L. Anti-inflammatory compounds isolated from *Menyanthes trifoliata* L. // *Yaoxue Xuebao.* – 1995. – Vol.30, №8. – P. 621-626.

11. Huber H., Blindenbacher F., Mohr K. et al. Enzyme from *Helix pomatia* // *Helv. Chim. Acta.* – 1951. – Vol.34. – P. 46.

12. Isiguro K., Yamaki M., Takagi Sh. et al. Studies on iridoid-related compounds. IV. Antitumor activity of iridoid aglycones // *Chem. & Pharmac. Bull.* – 1986. – Vol. 34, № 6. – P. 2375-2379.

13. Katsuyoshi M., Kazuo K., Hiroshi F., Kiyoshi I. Ligustrinoside, a new bisiridoid glucoside from *Strychnos ligustrina*

// *Chem. & Pharmac. Bull.* – 1991. – Vol. 39, № 10. – P. 2737-2738.

14. Mpondo E. Mpondo, Garcia J. Iridoids from *Gentiana verna* // *Phytochem.* – 1989. – Vol. 28, №9. – P. 2503-2504.

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

16. 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.

17. Tietze L. F., Henke S., Bärtels C. Biomimetic transformations of the biogenetic key intermediate secologanin // *Tetrahedron.* – 1988. – Vol. 44, № 23. – P. 7145-7153.

18. Wagner H., Blatt S. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.* – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. – P.86-87, 364.

19. Zuleta L. M. Cardona, Cavalheiro A. J., Silva D. H. Siqueira et al. Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae) // *Phytochem. (Elsevier).* – 2003. – Vol.64, № 2. – P. 549-553.

Надійшла до редакції 22.03.2008

**УДК 615.322:582.973**

Т.Д. Гусарова, С.М. Коваленко, І.Ф. Макаревич, Ю.І. Губін, А.М. Мурашко

**ОТРИМАННЯ АГЛІКОНУ ЛОГАНІНУ З ПЛОДІВ SYMPHORICARPOS ALBUS**

**Ключові слова:** іридоїди, *Symphoricarpos albus*, сніжногідник, аглікони логаніну (логанігенін, логанетин).

Запропоновано способи виділення аглікону логаніну (логанігеніну) з плодів *Symphoricarpos albus* (L.) Blake, як прямою екстракцією, так і ферментативним гідролізом логаніну. Будова логанігеніну підтверджена даними <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії. Показано, що найбільш прийнятним способом отримання логанігеніну є ферментативний гідроліз логаніну.

T.D. Gusarova, S.M. Kovalenko, I.F. Makarevich, Yu.I. Gubin, A.M. Murashko

**ISOLATION OF LOGANIN AGLYCON FROM THE BERRIES OF SYMPHORICARPOS ALBUS**

**Key words:** iridoids, *Symphoricarpos albus*, snowberry, loganin aglycon (loganigenin, loganetin)

The methods of isolation the loganin aglycon (loganigenin) from the berries of *Symphoricarpos albus* by direct extraction and by fermentative hydrolysis of loganin was proposed. The structure of loganigenin has been confirmed by the data of <sup>1</sup>H-NMR-spectroscopy and mass-spectrometry. It was shown that more handlike method to obtain of loganigenin was fermentative hydrolysis of loganin. □