

УДК 582.573.16:581.192

СТРОЕНИЕ ОСНОВНОГО СТЕРОИДНОГО ГЛИКОЗИДА СОЦВЕТИЙ *ALLIUM CYRILLII* (ALLIACEAE)

Толкачева Н.В.¹, Зайцев Г.П.², Качала В.В.³, Гришкова В.И.⁴, Чирва В.Я.⁴

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Украина

²Национальный институт винограда и вина «Магарач», Ялта, Украина

³Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

⁴Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Украина

E-mail: tolkacheva_n@mail.ru

В результате исследования стероидных гликозидов соцветий лука Кирилла (увеличенного) *Allium cyrillii* Ten. выделен основной спироستانоловый гликозид. С помощью химических и спектральных методов анализа была установлена структура данного соединения, которое представляет собой 3-*O*-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-[*O*-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-*O*-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-*O*-β-D-галактопиранозид-(25*R*)-5α-спиростан-2α,3β,6β-триол.

Ключевые слова: *Allium cyrillii* Ten., стероидные гликозиды.

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные гликозиды являются обширным классом природных соединений из группы сапонинов, которые привлекают внимание исследователей благодаря их широкому спектру биологической активности и экологической безопасности [1].

Известно, что экстракты разных растений, принадлежащих к семействам *Amaryllidaceae*, *Dioscoreaceae*, *Alliaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, которые содержат стероидные гликозиды, используются в традиционной медицине как противоопухолевые, фунгицидные, контрацептивные, антивирусные и цитотоксические средства [2–4]. Известно также, что данные соединения снижают уровень холестерина в крови и обладают антиоксидантным действием [5, 6]. Кроме того, стимуляция роста и фитоиммунитета растений стероидными гликозидами позволяет рассматривать эти вещества как природные адаптогены [7].

Перспективными в плане поиска сапониноносных видов являются растения рода *Allium*, произрастающие в Крыму, тем более, что в литературе данные о стероидных гликозидах большинства крымских луков отсутствуют. Именно поэтому изучение химической структуры стероидных гликозидов представителей семейства *Alliaceae* является актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования взят основной сапонин, выделенный из соцветий лука Кирилла (увеличенного) *Allium cyrillii* Ten., собранного на северо-восточном склоне горы Парагильмен в 2010 г.

170 г свежесобранных и измельченных соцветий трижды экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом. Экстракцию проводили путем нагревания сырья на водяной бане с обратным холодильником в течение трех часов. Полученный экстракт упаривали на роторном испарителе при 50 °С до водного остатка и последовательно обрабатывали хлороформом и *n*-бутиловым спиртом. Бутанольный экстракт упаривали. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили в системах хлороформ-метанол-вода (65:35:7) и хлороформ-метанол (7:3). Для хроматографии использовали силикагелевые пластинки Sorbfil АФ-В, толщина слоя 110 мкм. Хроматограммы опрыскивали реактивом Эрлиха [8] и реактивом Санье [9], после чего нагревали до 120 °С. Кислотный гидролиз выполняли следующим образом: 10 мг чистого гликозида нагревали при 110 °С в 5 мл 1%-ного раствора серной кислоты в этиловом спирте в течении 2-х часов. После охлаждения гидролизат разбавляли водой и извлекали агликон хлороформом. Хлороформные экстракты промывали водой до нейтральной реакции и концентрировали в вакууме до сухого остатка. С помощью ТСХ в системе бензол-этанол 9:1 идентифицировали агликон. Водные слои нейтрализовывали анионитом до нейтральной реакции и упаривали. Сахара идентифицировали в системе бутанол-ацетон-вода 4:5:1.

Колоночная хроматография была проведена с использованием колонки 100 мм с фазой Supelcocoan C18 (150-200 мкм, Supelco). ВЭЖХ разделение проводилось на хроматографе Agilent 1100, оснащенном детектором по светорассеиванию (ELSD) и колонкой Zorbax SB-C18 (150×2.1 мм). ЯМР эксперименты осуществлялись с образцами, растворенными в 0,6 мл дейтеропиридина (400 МГц для ¹H; 100 МГц для ¹³C) на приборе Varian AS 400, стандарт – TMS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из соцветий *A. cyrillii* было выделено 0,11 г хроматографически чистого гликозида. Агликоном после кислотного гидролиза был идентифицирован агигенин. С помощью ТСХ путем сравнения с заведомо известными образцами сахаров были идентифицированы глюкоза, ксилоза и галактоза в соотношении 2:1:1.

В ¹³C ЯМР-спектре (табл. 1) представлено 27 сигналов атомов углерода, за исключением сигналов углеводной части: четырех метильных (14,8; 16,3; 17,0; 17,1), девяти метиленовых, одиннадцати метиновых и трех четвертичных (36,8; 40,6; 109,0) атомов углерода. Данные ¹H- и ¹³C ЯМР-спектров свидетельствуют о том, что соединение является производным ряда спиростана, величина ¹³C химического сдвига для атома C-22 равна 109,0 м.д. Величины химических сдвигов C-5 (δ 47,6) C-9 (54,3) и C-19 (17,0) свидетельствуют о *цис*-сочленении колец А и В [1].

Химические сдвиги дублета CH₃-27, а также двух сигналов метиленовых протонов с δ 3,49 (1H, H-26a и 3.58 (1H, H-26b) однозначно указывают на экваториальную ориентацию CH₃-27 [1]. Таким образом, агликон относится к спиростанам (25R)-ряда. Кроме того, 25R-конфигурация подтверждается значениями химических сдвигов C-20, C-21, C-23, C-24, C-25 и C-27 в сравнении с литературными данными [10, 11]. 5β-Конфигурация была определена с помощью корреляции между сигналом атома водорода при δ 1,28 м.д. (Me-19) и значениями

сигналов атомов углерода при δ (м.д.) 36,8 (C-10), 54,3 (C-9), 47,6 (C-5) и 46,9 (C-1) в двумерном спектре НМВС.

Положение гидроксильных групп в агликонной части гликозида (у C-2 и C-6 атомов) было выполнено путем анализа химических сдвигов сигналов C-атомов в сравнении с литературными данными [12–13] для незамещенных агликонных частей и с учетом значительных положительных α -эффектов гидроксирования (до 10 м.д.) и небольших, обычно отрицательных, β -эффектов. 2 α ,3 β ,6 β -Конфигурации определены на основе анализа констант спин-спинового взаимодействия протонов у атомов C-2, C-3 и C-6 с протонами у соседних C-атомов.

Сравнение спектральных данных с литературными [12–15] подтверждает строение агликонной составляющей как (25R)-5 α -спиростан-2 α ,3 β ,6 β -триол и указывает на замещение по атому C-3 (слабополюный сдвиг с 76,5 м.д. до 84,4 м.д.)

Таблица 1

Химические сдвиги атомов углерода гликозида

С-атом	Химический сдвиг	С-атом	Химический сдвиг
1	46,9	Gal-1'	102,9
2	70,5	2'	72,3
3	84,4	3'	75,3
4	31,7	4'	79,1
5	47,6	5'	75,5
6	69,8	6'	60,4
7	40,5		
8	29,8	Glc-1''	104,4
9	54,3	2''	81,0
10	36,8	3''	86,8
11	21,1	4''	70,2
12	39,9	5''	77,3
13	40,6	6''	62,7
14	56,0		
15	32,0	Glc-1'''	104,5
16	80,9	2'''	75,8
17	62,8	3'''	77,9
18	16,3	4'''	71,2
19	17,0	5'''	78,2
20	41,8	6'''	62,5
21	14,8		
22	109,0	Xyl-1''''	104,7
23	31,6	2''''	74,9
24	29,0	3''''	78,4
25	30,4	4''''	70,3
26	66,6	5''''	67,1
27	17,1		

СТРОЕНИЕ ОСНОВНОГО СТЕРОИДНОГО ГЛИКОЗИДА СОЦВЕТИЙ...

В спектре ПМР в области сильного поля четко выделяются сигналы четырех метильных групп: δ 0,85 (3H, s, Me-18), 1,28 (3H, s, Me-19), 0,69 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, Me-27) и 1,14 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, Me-21). Также имеются четыре сигнала аномерных протонов: δ 5,56 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 5,24 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 5,20 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) и 4,96 (1H, d, $J = 7,5$ Hz). Константы спин-спинового взаимодействия этих сигналов свидетельствуют о β -конфигурации гликозидных связей.

Из анализа ^1H - и ^{13}C ЯМР-спектров следует, что углеводная цепь у C-3 состоит из остатков четырех сахаров. Химические сдвиги всех протонов четырех углеводных единиц были установлены с помощью комбинации двумерных спектров TOCSY и COSY. ^{13}C -Химические сдвиги сигналов их соответствующих атомов однозначно отнесены с помощью двумерного спектра HSQC. Эти данные, приведенные в Табл. 2, свидетельствуют о наличии одного остатка β -D-галактопиранозы, одного остатка β -D-ксилопиранозы и двух – β -D-глюкопиранозы.

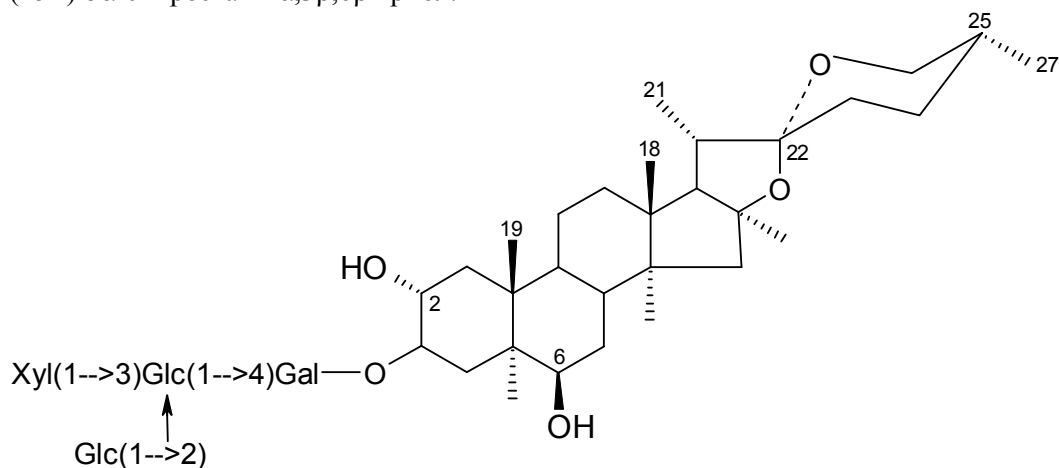
Таблица 2

Наблюдаемые корреляции в спектрах HSQC и HMBC гликозида

№ атома	δ_{H} HSQC	HMBC	№ п/п	δ_{H} HSQC	HMBC
1a	2,21 dd	C-2, 3, 5, 10, 19	25	1,59 m	C-24
1b	1,25 m	C-2, 9, 10, 19	26a	3,58 dd	C-22, 24, 25
2	4,09 m	C-3	26b	3,49 t	C-22, 24, 25, 27
3	4,01 m	C-2, 1'	27	0,69 d	C-24, 25, 26
4a	2,38 q	C-2, 5, 10			
4b	2,12 m	C-5, 10	1'-Gal	4,96 d	C-3, 3'
5	1,18 m	C-4, 10, 19	2'	4,54 m	C-3'
6	3,96 m	C-8, 10	3'	4,12 m	C-5'
7a	2,00 m	C-5, 6, 9	4'	4,59 m	C-2', 3', 5', 1''
7b	1,17m	C-8	5'	4,02 m	C-6'
8	2,15 m	C-6, 9, 13, 14	6'a	4,59 m	C-5'
9	0,75 td	C-8, 10, 19	6'e	4,19 m	C-4', 5'
10			1"Glc	5,20 d	C-4'
11a	1,54 m	C-8	2''	4,34 t	C-3'', 1'''
11b	1,42 m	C-8	3''	4,14 t	C-1''', 1'', 2'', 4''
12a	1,70 m	C-9, 13, 14	4''	3,79 t	C-3'', 5'', 6''
12b	1,09 m	C-9, 11, 13	5''	3,85 m	C-4'', 6''
13			6'a	4,48 m	
14	1,14 m	C-8, 12, 13, 15, 17, 18	6'e	4,05 m	C-4'', 5''
15a	2,08 m	C-8, 13, 14, 16, 17	1"Glc	5,56 d	C-2'', 3'''
15b	1,43 m	C-8, 14, 16	2'''	4,03 m	C-3'''
16	4,57 m	C-13	3'''	4,12 m	C-1''', 2''', 4''', 5'''
17	1,83 t	C-12, 13, 15, 16, 18, 20, 21	4'''	4,03 m	C-6'''
18	0,85 s	C-12, 13, 14, 17	5'''	3,89 m	C-6'''
19	1,28 s	C-1, 5, 10	6''a	4,53 m	C-4'''
20	1,94 m	C-13, 17, 21, 22, 23	6''e	4,40 dd	C-4''', 5'''
21	1,14 d	C-17, 20, 22	1''Xyl	5,24 d	C-3''', 3''''
22			2''''	3,94 t	C-3''', 4''''
23a	1,67 m	C-20, 22, 24	3''''	4,07 m	C-5''''
23b	1,62 m	C-22, 24, 25	4''''	4,11 m	C-3''', 5''''
24a	1,57 m	C-22, 23	5''''a	3,66 t	C-1''', 3''', 4''''
24b	1,53 m	C-22, 23, 25	5''''e	421 m	C-1''', 3''', 4''''

Корреляция между C-3 (84,4) агликона и H-1 Gal (4,96) показывает место присоединения углеводных остатков к агликону. Для C-4 Gal (79,1) наблюдается химический сдвиг, характеризующий место присоединения остатка глюкопиранозы. НМВС спектр показал структурно информативные кросс-пики корреляций между сигналом протона с δ 4,96 м.д. (H-1 Gal') и сигналом атома углерода с δ 81,0 м.д. (C-2 Glc"), а также сигналами H-1 Xyl (5,24) и C-3 Glc" (86,8); H-1 Glc''' (5,56) и C-2 Glc" (81,0); H-1 Glc" (5,20) и C-4 Gal (79,1).

Таким образом, основной стероидный гликозид соцветий лука Кирилла *Allium cyrillii* Ten. представляет собой 3-O- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 3)-[O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-галактопиранозид-(25R)-5 α -спиростан-2 α ,3 β ,6 β -триол.



ВЫВОДЫ

1. Из соцветий лука Кирилла *Allium cyrillii* Ten. была получена сумма стероидных гликозидов и выделен основной сапонин.
2. На основании химических и спектральных методов было установлено, что он представляет собой 3-O- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 3)-[O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-галактопиранозид-(25R)-5 α -спиростан-2 α ,3 β ,6 β -триол.

Список литературы

1. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана / [П.К. Кинтя, Г.В. Лазурьевский, Н.Н. Балашова и др.]. – Кишинев: Штиинца, 1987. – 142 с.
2. Васильева И.С. Состав и биологическая активность стероидных гликозидов из суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. / И.С. Васильева, В.А. Пасешниченко // Прикл. биохим. и микробиол. – 1995. – Т. 31. – С. 238–242.
3. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis / A. Heese-Peck, H. Pichler, B. Zanolari [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2002. – Vol. 13. – P. 2664–2680.
4. Oleszek W. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants / W. Oleszek, A. Marston // Phytochemical Society of Europe. – 2000. – Vol. 45. – P. 241–254.
5. Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties / Y. Sauvare, Y. Baissac, O.

- Leconte [et al.] // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y. – London: Plenum Press. – 1996. – Vol. 405. – P. 37–46.
6. Кинтя П.К., Ковальчук Л.П., Бурцева С.А. Поиск антиоксидантов в ряду стероидных гликозидов // Хим. фарм. журнал. – 1982. – № 1. – С. 95–97.
 7. Стероидные фураностаноловые гликозиды – новый класс природных адаптогенов / Васильева И.С., Удалова Ж.В., Зиновьева С.В., Пасешниченко В.А. // Прикладная биохимия и микробиология – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 517–526.
 8. Kiyosawa S. Detection of Prototype Compounds of Diosgenin and Other Spirostanol-Glycosides / S. Kiyosawa, M. Huton // Chem. Pharm. Bull. – 1968. – Vol. 16. – P. 1162–1164.
 9. Sannie M. Steroid Sapogenins 7. Neoruscogenin 3-β-Dihydroxy-22β-25L-S-Spirostene, a new Sapogenin from *Ruscus aculeatus* / M. Sannie, H. Lapin // Bull. Soc. Chem. France. – 1957. – Vol. 10. – P. 1237–1241.
 10. Ikeda T. Pregnane- and furostane-type oligoglycosides from the seeds of *Allium tuberosum* / T. Ikeda, H. Tsumagari, M. Okawa [et al.] // Chem. Pharm. Bull. – 2004. – Vol. 52. – № 1. – P. 142–145.
 11. Su L. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris* / L. Su, G. Chen, S.-G. Feng [et al.] // Steroids. – 2009. Vol. 74. – P. 399–403.
 12. Agrawal P.K. Carbon-13 NMR спектроскопия of steroidal saponins and steroidal saponins / P.K. Agrawal, D.C. Jain, R.K. Gupta [et al.] // Phytochemistry. – 1985. – Vol. 24. – № 11. – P. 2479–2496.
 13. Agrawal P.K. Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts / P.K. Agrawal // Steroids. – 2005. – Vol. 70. – P. 715–724.
 14. Peng J. 19 New steroidal saponins from *Allium* plants: isolation, structural elucidation and effect on blood coagulability / J. Peng, X. Yao // Saponins used in traditional and modern medicine. Plenum press.: New York, 1996. Vol. 404. – P. 511–526.
 15. Hayes P.Y. Steroidal saponins from the roots of *Trillium erectum* (Beth root) / P.Y. Hayes, R. Lehmann, K. Penman [et al.] // Phytochemistry. – 2009. – Vol. 70. – P. 105–113.

Толкачова Н.В. Будова основного стероїдного глікозиду суцвіть *Allium cyrililii* (*Alliaceae*) / Н.В. Толкачова, Г.П. Зайцев, В.В. Качала, В.І. Гришковець, В.Я. Чирва // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 390–395.

В результаті дослідження стероїдних глікозидів суцвіть цибулі Кірілла (збільшеного) *Allium cyrililii* Ten. виділений основний спіростаноловий глікозид. За допомогою хімічних і спектральних методів аналізу було встановлено структуру даної сполуки, яка є 3-*O*-β-*D*-ксилопіранозил-(1→3)-[*O*-β-*D*-глюкопіранозил-(1→2)]-*O*-β-*D*-глюкопіранозил-(1→4)-*O*-β-*D*-галактопіранозид-(25R)-5α-спіростан-2α,3β,6β-тріол.

Ключові слова: *Allium cyrililii* Ten., стероїдні глікозиди.

Tolkachova N.V. Structure of basic steroidal glycoside of raseme of *Allium cyrililii* (*Alliaceae*) / N.V. Tolkachova, G.P. Zaytsev, V.V. Kachala, V.I. Grishkovets, V.Ya. Chirva // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 2. – P. 390–395.

As the result of the research of steroidal glycosides of raseme of *Allium cyrililii* Ten. The main spirostanol saponin has been obtained. With the help chemical and spectral methods the structure of the given compound has been determined. It is 3-*O*-β-*D*-xylopyranosyl-(1→3)-[*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→2)]-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→4)-*O*-β-*D*-galactopyranoside-(25R)-5α-spirostan-2α,3β,6β-triol.

Keywords: *Allium cyrililii* Ten., steroidal glycosides.

Поступила в редакцію 18.05.2011 г.