УДК 547.918:543.422

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ВИДОВ РОДА *CLEMATIS* ФЛОРЫ КРЫМА

Г.П. Зайцев, С.А. Сытник*

Национальный Институт Винограда и Вина "Магарач"

****Днепропетровский государственный аграрный университет***

Определен состав экстрактов *Clematis vitalba* L. и *Clematis flammula* L. Определено химическое строение основных компонентов экстракта *Clematis vitalba* – витальбозидов А, В и С. Витальбозиды А та В в основе структуры имеют ядро тритерпенового агликона хедерогенина, а витальбозид С – олеаноловой кислоти. Установлено, что витальбозиды у *Clematis vitalba* накапливаются в корнях к периоду покоя, а в вегетационный период концентрируются в вегетативной части растения – листьях и молодых побегах. В составе *Clematis flammula* тритерпеновые гликозиды не обнаружены.

Clematis vitalba L., *Clematis flammula* L., *флора Крима, тритерпеновые глликозиди*

ВВЕДЕНИЕ

Исследование состава вторичных метаболитов растений и динамики их накопления в вегетативных и генеративных органов является весьма актуальным для расширения применения биоиндикационных методов при определении состояния окружающей природной среды. При условии воздействия стрессовых факторов – влияния критических значений абиотических факторов, ксенобиотиков, в организме растения может происходить изменение метаболизма, проявление которого начинается на молекулярном и клеточном уровнях, что впоследствии находит выражение в изменении морфологии растения. Поэтому, скрининг биологически активных веществ является неотемлимой составляющей биоиндикационных исследований.

Химический состав видов рода *Clematis* – *Clematis vitalba* L., *C. flammula* L., представителей природной флоры Крыма, изучен недостаточно, несмотря на то, что растения клематиса используются в народной медицине для лечения различных воспалительных заболеваний, ревматизма, хронических кожных и варикозных заболеваний. Различными авторами констатировалось наличие тритерпеновых сапонинов [2, 3] и компонентов фенольной природы [5]. В связи с этим мы продолжаем исследование химического состава клематисов, для установления структуры тритерпеновых гликозидов и определения закономерностей динамики их накопления в вегетативных и генеративных органах растений *Clematis vitalba,* как распространенного вида флоры Крыма и редкого вида, произрастающего в условиях заповедного режима в границах природного заповедника «Мыс Мартьян» – *C. flammula.*

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал *Clematis vitalba* (рис. 1) был собран в Бахчисарайском районе близ реки Альма в феврале, марте, июле и сентябре 2009 г. Растительный материал *Clematis flammula* (рис. 1) был собран в Ялтинском районе на территории заповедника мыс Мартьян в феврале 2009 г. Растения разделяли на части, измельчили и высушили на воздухе.

Идентификацию индивидуальных веществ проводили по ЯМР ^{13}C, ПМР и Масс-спектрам. Математическую обработку спектральных данных ЯМР-^{13}C производили с использованием программного обеспечения основанного на корреляционных методах (HMBC, HMQC, NOESY, COSY).



Рисунок 1 – *Clematis vitalba* и *C. flammula* в природных условиях

В исследовании использовалось оборудование фирмы Agilent Technologies – высоко эффективный жидкостный хроматограф модель Agilent 1100 укомплектованный 4-х канальным насосом градиента низкого давления, вакуумным дегазатором, автоматическим инжектором проб, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором на диодной матрице, рефрактометрическим нефелометрическим ELSD детектором Agilent G4218A и Масс-детектором Agilent 6410 с ионизационным источником – электроспрей.

Предварительное аналитическое разделение проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле Sorbfil UV254 и проявляли 0,5%-ным раствором ванилина с серной кислотой в этиловом спирте. Аналитическое высокоэффективно-жидкостное хроматографическое (ВЭЖХ) разделение тритереновых гликозидов производили на хроматографической колонке ZORBAX-SB-C18 (150×2.1 мм) с зернением сорбента 3,5 мкм в градиентном элюировании в 20%-ном метиловом спирте, 20%-ном ацетонитриле, 60%-ном растворе 0,015% водного раствора трифторуксусной кислоты до 100%-ного метилового спирта за 18 мин. Температура термостата 40 °С, поток подвижной фазы 0,25 мл/мин. Объем инжекции 2 мкл. Детектирование DAD A 206/8нм, DAD B 254/16нм и на ELSD детекторе при давлении азота 3,0 атм, температуре 100 °С, PTgain=5. Масс-спекторметрический анализ проводился аналогично описанному в [4]. Препаративное разделение суммы гликозидов производили на хроматографической колонке Supelcosil C18 (210×21 мм) с зернением сорбента 5 мкм. Аналитическое разделение углеводов, образующихся при гидролизе гликозидов, производили на колонке Supelcogel C610-H (300×7,8×9 мкм) с элюированием 0,1%-ного раствора H_3PO_4. Температура термостата 30 °С, поток подвижной фазы 0,5 мл/мин. Объем инжекции 5 мкл. Детектирование производилось на рефрактометрическом детекторе.

Экстракцию растительного сырья проводили по схеме последовательной сменой растворителей по степени возрастания их полярности. Первое извлечение производили безводным ацетоном, полученный экстракт содержал липофильные и фенольные вещества растения. Тритерпеновые гликозиды извлекали 40%-ным раствором этанола в воде из высушенного от остатков ацетона сырья. Водно-этанольные экстракты концентрировали в вакууме, переосаждали ацетоном из водных растворов, реэкстрагировали *н*-бутиловым спиртом и высушивали в вакууме роторного испарителя. Суммарную фракцию тритерпеновых гликозидов подвергали препаративному хроматографическому разделению на сорбенте с обращенной фазой, индивидуальные вещества осаждали из фракций ацетоном и перекристаллизовывали из *н*-бутанола.

Для установления последовательности углеводных остатков каждого тритерпенового гликозида производили кислотный и щелочной гидролиз. Кислотный гидролиз тритерпеновых гликозидов проводили в смеси диоксана и 4 н водной трифторуксусной

кислоты (1:1) в запаянной ампуле при 100 °С в течение 5 часов, содержимое ампул концентрировали в вакууме, разбавляли водой и центрифугировали. После гидролиза гидрофильную составляющую анализировали на состав углеводов методом ВЭЖХ, а липофильную фракцию анализировали на состав агликонов методом ТСХ. Щелочной гидролиз проводили в растворе содержащем 4 н КОН в 50%-ном метаноле в запаянной ампуле при 100 °С в течение 2 часов. Осадок после щелочного гидролиза промывали водой и подвергали кислотному гидролизу по вышеописанной схеме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования определен состав тритерпеновых гликозидов *Clematis vitalba* – обнаружены и идентифицированы три основных компонента, определенные нами по степени уменьшения полярности витальбозидами А, В и С (рис. 2).

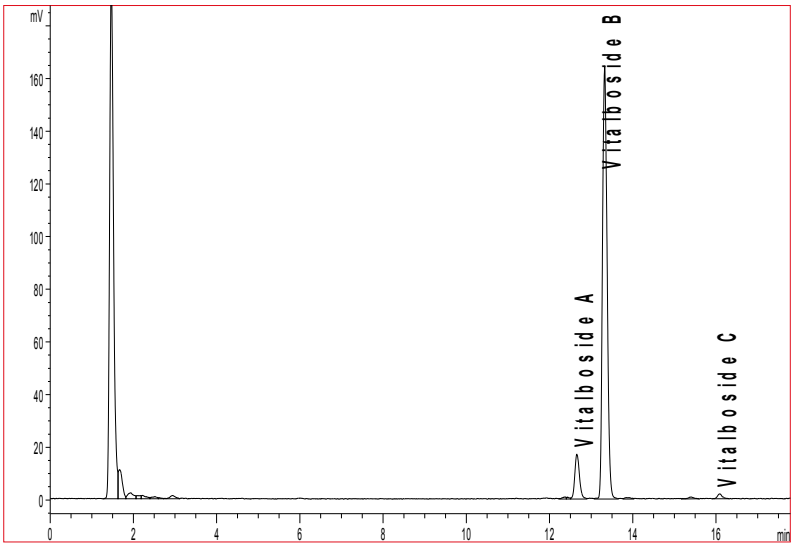


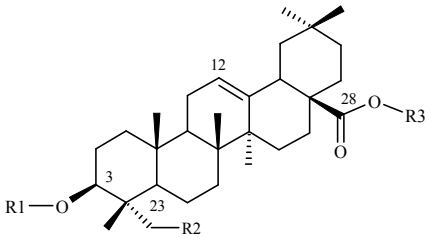
Рисунок 2 – Хроматограмма фракции тритерпеновых гликозидов корня *Clematis vitalba*

В результате исследования (табл. 1) установлено, что витальбозиды А и В содержат по 6 углеводных фрагментов и имеют тритерпеновый агликон – хедерагенин. Витальбозид С – также содержит 6 углеводных фрагментов и агликоновый тритерпеноид – олеаноловую кислоту. Изучение последовательности присоединения моносахаридов позволило установить структуру выделенных тритерпеновых гликозидов, которые оказались ранее неописанными соединениями (рис. 3).

Таким образом, витальбозид А представляет собой 3-О-β-D- рибопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабино-пиранозил-(1→6)-гликопиранозил-хедерагенин-28-О-α-L-рамно-пиранозил-(1→4)-β-D-гликопиранозиловый эфир. Витальбозид В представляет собой 3-О-β-D-рибопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабинопиранозил-хедерагенин-28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-β-D-гликопиранозил-(1→6)-β-D-гликопиранозиловый эфир, а ви-тальбозид С представляет собой 3-О-β-D-рибопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабинопиранозил-олеанол-28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-β-D-гликопиранозил-(1→6)-β-D-гликопирано-зиловый эфир.

Таблица 1 – МАСС–спектрометрические данные витальбозидов

Соединение	-ESI-MS m/z $[M-H]^-$	+ESI-MS m/z $[M+NH4]^+$	Расчетная формула $[M-H]^-$
Витальбозид А	1351	1370	$C_{64}H_{103}O_{30}$
Витальбозид В	1351	1370	$C_{64}H_{103}O_{30}$
Витальбозид С	1335	1354	$C_{64}H_{103}O_{29}$



	R1	R2	R3
Витальбозид А	Rib1---3Rha1---2Ara1---6Glc-	OH	Rha1---4Glc-
Витальбозид В	Rib1---3Rha1---2Ara1-	OH	Rha1---4Glc1---6Glc-
Витальбозид С	Rib1---3Rha1---2Ara1-	H	Rha1---4Glc1---6Glc-

Рисунок 3 – Химическая формула идентифицированных тритерпеновых гликозидов *Clematis vitalba*

В рамках проведенных нами исследований получены данные о распределении идентифицированных веществ в органах растения и динамике их накопления в корнях (табл. 2). Установлено, что все идентифицированные витальбозиды накапливаются в корнях клематиса к февралю, что соответствует периоду покоя данного вида. В максимальном количестве концентрируется витальбозид В. В вегетационный период (с марта по сентябрь) – витальбозиды концентрируются в вегетативных органах растений – листьях и молодых побегах. В соцветиях накапливается максимальное количество витальбозида В и минимальное – витальбозида С.

Изучение качественного состава экстрактов растительного материала *Clematis flammula* не выявило наличия тритерпеновых гликозидов.

Таблица 2 – Содержание витальбозидов А, В и С в органах *Clematis vitalba*

Содержание, % сухого веса	Вегетативные и генеративные органы						
	корень	корень	корень	корень	листья	лоза	соцветия
	Дата определения						
	февраль	март	июль	сентябрь	июль	июль	июль
Витальбозид А	0,313	0,587	0,028	0,027	1,097	0,000	0,260
Витальбозид В	2,982	1,115	0,687	0,356	0,474	0,039	0,701
Витальбозид С	0,399	0,133	0,018	0,020	0,034	0,027	0,062
Сумма	3,694	1,835	0,733	0,403	1,605	0,066	1,023

Полученые данные могут служить диагностическими признаками при биоиндикационной оценке состояния природной среды без влияния антропопрессии. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение изменения качественного состава тритерпеновых гликозидов и их количественного содержания под действием стрессовых факторов.

ВЫВОДЫ

1. Установлена структура трех основных компонентов экстракта *Clematis vitalba* тритерпеновых гликозидов – витальбозидов А, В и С.
2. В корнях *Clematis vitalba* максимальное накопление тритерпеновых гликозидов происходит в период покоя растения. В наибольшей степени концентрируется витальбозид В.
3. В соцветиях *Clematis vitalba* накапливается максимальное количество витальбозида В и минимальное – витальбозида С.
4. В составе растительного материала *Clematis flammula* не обнаружено тритерпеновых гликозидов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Bock K. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides / Bock, K., Pedersen, C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. – 1983. – Number 41. – P. 27–66.*
2. *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. – Number 3. – Volume 7. – P. 284–286.*
3. *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. – Number 6. – Volume 10. – P. 833.*
4. *Multi-stage massspectrometric studies of triterpenoid saponins in crude extracts from Acanthopanax senticosus Harms / Cui, M., Sun, W.X., Song, F.R., ...[et al] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1999. – Number 13. – P. 873–879.*
5. *Yesilada E. Clematis vitalba L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects / Yesilada E., Kupeli E. // Journal of Ethnopharmacology. – 2007. – Vol. 110 – P. 504–515.*

TRITERPENE GLYCOSIDES OF WILD PLANTS CLEMATIS FLORA OF CRIMEA

Zaitcev G.P., Sytnik S.A.

Three triterpenoid saponins, named vitalbosides A, B, C, were isolated from the roots plant of *Clematis vitalba*. Its structure was elucidated on the basis of 1D, 2D NMR ^{13}C, ESI-MS techniques, and physicochemical properties. Dynamics of accumulation triterpenoid glycosides in roots *Clematis vitalba* and distribution in a vegetative part of plant was investigated. It is established, that Vitalbosides collect in roots *Clematis* to a dormant period, and during the vegetative period concentrate in a vegetative part of plant – leaves and young shoots.