

На правах рукописи



**ПАТОВ Сергей Александрович**

**Выделение и встречный синтез гликозидов,  
обладающих адаптогенными свойствами**

**02.00.10 – Биоорганическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2006

Работа выполнена в Институте химии Коми Научного Центра Уральского  
отделения Российской Академии наук г. Сыктывкар

Научный руководитель: член-корреспондент РАН  
А.В. Кучин

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
Э.Э. Шульц  
кандидат химических наук  
Л.Б. Дмитриев

Ведущая организация: Институт органической и физической  
химии им. Арбузова, г. Казань

Защита диссертации состоится «\_\_\_» декабря 2006 года в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета К 220.043.04 при Российском государ-  
ственном аграрном университете МСХА имени К.А. Тимирязева, по адресу:  
127550, Москва, Тимирязевская улица, 49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НЦБ  
РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Г.П. Токмаков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время особое внимание уделяется разработке лекарственных средств растительного происхождения, обладающих адаптогенным эффектом. Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.) в этом смысле обладает уникальными свойствами. Основными действующими веществами этого растения являются фенилпропаноиды: гликозиды коричневого спирта (розин, розавин, розарин) и салидрозид. Соотношение мажорных компонентов *R. rosea* зависит от климатических условий и мест произрастания. Для установления качества растительного сырья необходимы стандартные вещества, полученные либо из экстрактов данного растения, либо синтетическим путем.

Кроме того, известны соединения терпеновой природы, проявляющие физиологические свойства, сходные с фенилпропаноидами родиолы розовой. Однако их использование в качестве лекарственных средств затруднено, что частично связано с плохой растворимостью соединений данного класса в воде и физиологических жидкостях. Для улучшения растворимости и проницаемости через клеточную стенку вещества терпеновой природы часто переводят в гликозидную форму. Поэтому выделение, исследование и синтез гликозидов различной природы, обладающих физиологической активностью, является актуальной задачей.

Работа выполнена в Институте химии Коми НЦ УрО РАН в рамках НИР по теме: «Химия и технология растительных веществ. Научные основы переработки и использования низкомолекулярных компонентов из растительного сырья как источника химических продуктов для органического синтеза, изучение физиологических свойств полученных соединений» (№ 01.2.00102727), при поддержке Научного совета «Химия и технология переработки возобновляемого растительного сырья», ХТРС №8.1.38.

**Цель работы.** Синтез гликозидов растения *Rhodiola rosea* L., а также гликозидов некоторых монотерпеновых спиртов и стероидов. Испытание полученных соединений на биологическую активность. Разработка методов анализа растительного сырья *Rhodiola rosea* L.

### **Научная новизна.**

Впервые осуществлены синтезы гликозидов *R. rosea* – салидрозида, розина и розавина, а также ряда монотерпеновых спиртов и стероидов. Показано, что реакционная способность гидроксильных групп  $\alpha$ -эксизона в реакциях гликозилирования различна, наибольшую активность ОН-группы проявляют в положении С-3 и С-22. Разработаны методы анализа экстрактов *R. rosea*, позволяющие оценить качество растительного сырья. Впервые

показано, что синтетический розин при внутривнутрибрюшинном введении лабораторным животным в концентрации 0.05 мг/кг проявляет адаптогенные свойства. Впервые установлено, что синтетический розин способен увеличивать продолжительность жизни биологической модели *Drosophila melanogaster* при введении в рацион в малых дозах (0.05 мг/кг).

**Практическая значимость.** Усовершенствованы экстрактивные и синтетические методы получения нативных гликозидов *R. rosea*, что позволит расширить перечень Государственных стандартных образцов химически чистых веществ. Синтетические гликозиды могут применяться для обогащения экстрактов *R. rosea* с целью увеличения их биологической ценности. Основные гликозиды *R. rosea* салидрозид и розавин впервые выделены с помощью обращеннофазовой хроматографии низкого давления без применения токсичных реагентов, что более приемлемо при получении лекарственных средств из растительного сырья. Установлено, что *R. rosea* накапливает гликозиды (салидрозид и розавин) в количествах, удовлетворяющих требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации, к третьему году вегетации. Растения, произрастающие в горных районах Северного Урала, накапливают гликозидов на 23% больше, чем культурные растения. Синтетические аналоги гликозидов *Rhodiola rosea* L. проявляют высокую физиологическую активность и могут являться альтернативным источником получения лекарственных препаратов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на I Всероссийской конференции «Аналитические приборы» (Санкт-Петербург, 2002), II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2002), III Всероссийской конференции: «Химия и технология растительных веществ» (Саратов, 2004), Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2005), IV Всероссийской научной конференции: «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2006) .

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и тезисы 10 докладов на научных конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Библиография включает литературные ссылки на 153 научные публикации. Объем работы составляет 140 стр., включая \_ таблиц, \_ схем, \_ рисунков. Первая глава посвящена методам выделения и синтеза гликозидов различной природы, вторая глава посвящена изложению результатов собственных исследований, в третьей главе приведены экспериментальные данные, методы получения и характеристики веществ.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Выделение гликозидов *Rhodiola rosea* L.

Для исследования экстрактов корней с корневищами *R. rosea* L. были отобраны растения второго-пятого годов жизни в конце вегетации, произрастающие в ботаническом саду Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Выделение экстрактивных веществ осуществляли исчерпывающим экстрагированием измельченных корней с корневищами 70%-ным этиловым спиртом. Полученную экстракционную смесь обрабатывали сульфатом цинка для удаления части флавоноидов и производных галловой кислоты. Осадок отфильтровывали, водный слой экстрагировали *n*-бутанолом. Получали фракцию веществ, обогащенную гликозидами коричневого спирта (циннамилгликозидами, ЦГ) и салидрозидом *R. rosea* L. (схема 1).

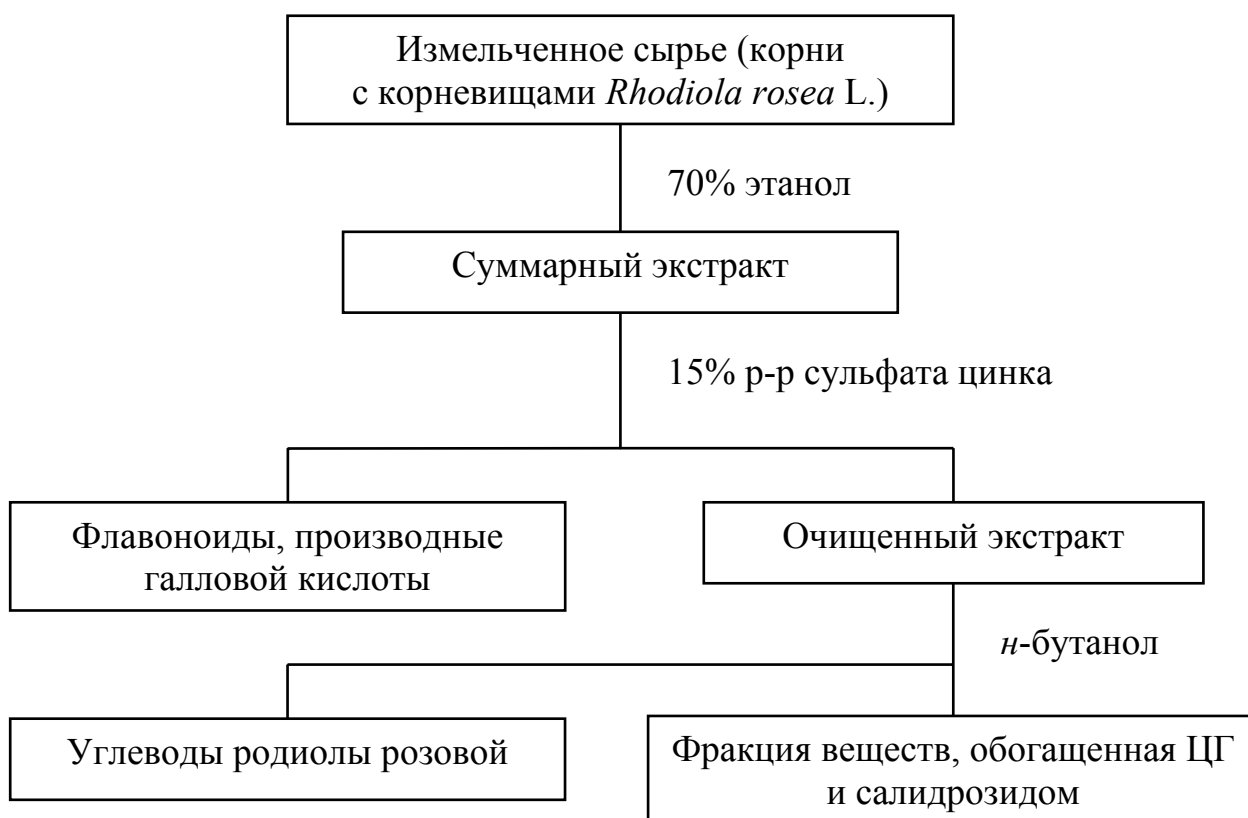
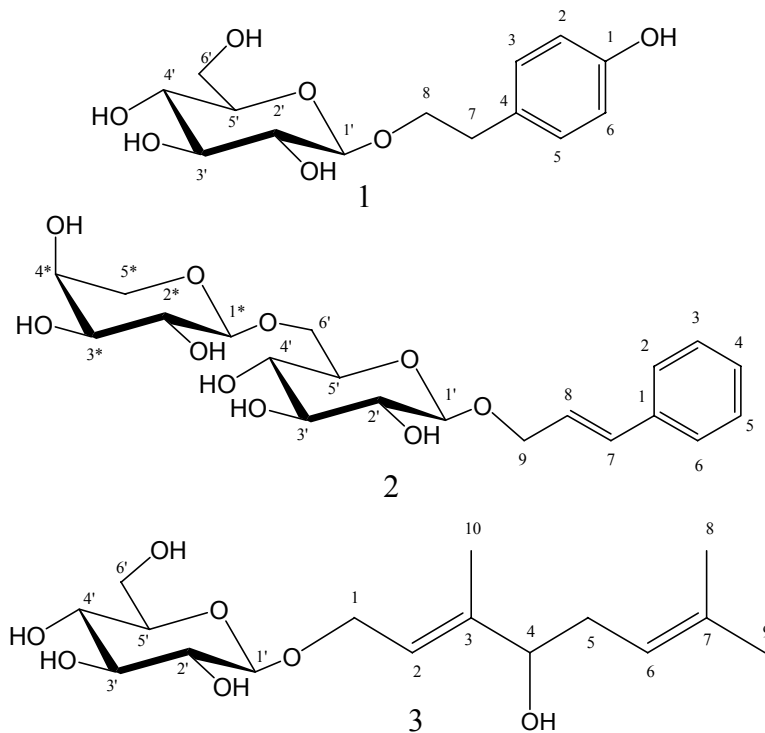


Схема 1. Экстракция и частичная очистка циннамилгликозидов (ЦГ) и салидрозида *R. rosea* L.

Концентрированный экстракт наносили на колонку с сорбентом Диасорб 130С-16Т и элюировали растворами этилового спирта различной концентрации. Установлено, что салидрозид элюируется 10%-ным, а ЦГ – 14%-ным этиловым спиртом. Полученные очищенные фракции исследовали методом ВЭЖХ с УФ детектированием при длине волны 276 нм для ЦГ и 256 нм для салидрозида.

Фракции, содержащие индивидуальные вещества, исследовали методами ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектроскопии. Результаты проведенного анализа позволяют утверждать, что салидрозид **1** выделен в чистом виде, а в образце розавина **2** присутствует примесь, которую мы идентифицировали как розиридин **3**.

В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  смеси веществ **2** и **3** сигналы при 120.6 м.д. и 136.5 м.д., принадлежат углеродным атомам у двойных связей молекулы розиридина в положениях 2,6 и 3,7 соответственно. Сигнал при 101.4 м.д. ( $\text{C}_1'$ ) в спектре свидетельствует о наличии  $\beta$ -D-гликозидной связи. Сигналы метильных групп в положениях 8, 9 и 10 при 17.8 м.д., 25.7 м.д. и 33.8 м.д.



соответственно, являются дополнительным подтверждением, что примесью является розиридин т.к. в розавине отсутствуют метильные группы. Сигналы при 128.6 м.д. и 126.3 м.д. соответствуют углеродным атомам бензольного кольца розавина в положениях 2,6 и 3,5. Четвертому углеродному атому бензольного кольца соединения **2** отнесен сигнал 126.1 м.д. Для  $\text{C}_1$  атома сигнал смещен в область слабого поля (131.5 м.д.) из-за наличия сопряженной связи пропилиденового фрагмента молекулы розавина. Сигнал  $\text{C}_1^*$ -атома арабинопиранозы при 103.4 м.д. в спектре розавина указывает на наличие  $\alpha$ -конфигурации гликозидной связи с глюкопиранозой, связанной  $\beta$ -D-гликозидной связью при  $\text{C}_1'$ -атоме 101.9 м.д. с коричневым спиртом.

Использование УФ детектора для ВЭЖХ анализа основных компонентов экстрактивной смеси *R. rosea* L. гликозидов коричневого спирта и салидрозиды оказалось не совсем корректным при исследовании выделенных индивидуальных компонентов. Минорный компонент исходной смеси терпеновый гликозид розиридин не поглощает УФ излучение при длине волны 276 нм. Поэтому, в дальнейшем для исследования фракций, обогащенных циннамилгликозидами и розиридином, мы использовали рефрактометрический детектор. Рехроматография смеси веществ **2** и **3** в тех же условиях позволила получить индивидуальные розавин и розиридин в чистом виде.

Калибровка аналитического хроматографа “Милихром 2” была проведена с использованием полученных рабочих образцов гликозидов *R. rosea*. Калибровочные кривые для розавина и салидрозида построены согласно хроматографическим данным, что позволяет определять их концентрации в экстракте. Полученные результаты могут служить оценочным показателем качества сырья родиолы розовой.

**Анализ экстрактов, выделенных из *Rhodiola rosea* L.  
разных годов жизни и места произрастания**

Сбор растительного сырья проводили в 1999-2003 г. в ботаническом саду Института биологии Коми Научного центра УрО РАН. Часть отобранного материала – корни с корневищами *R. rosea* второго-пятого годов жизни экстрагировали сразу, а часть сырья сушили при 70°C. Кроме того, был собран растительный материал на Северном Урале в долинах рек Большой Паток (2003) и Щугор (1999). Все растительное сырье отбирали в период отмирания надземной массы растения (август-октябрь).

Таблица 1

**Содержание гликозидов в экстрактах корней с корневищами *R. rosea*  
в зависимости от года жизни и места произрастания, (% от а.с.с.)**

	Год жизни				р. Щугор	р. Большой Паток
	2	3	4	5		
Салидрозид	0.7	0.9	1.2	1.1	2.1	1.0
Розавин	0.4	0.9	1.4	1.5	1.9	0.9
Розарин	0.3	0.8	1.3	1.3	1.9	0.7
Розин	0.03	0.1	0.1	0.2	0.3	0.01

К четвертому году жизни в растениях происходит небольшое снижение концентрации салидрозида по сравнению с гликозидами коричневого спирта. К пятому году вегетации существенных изменений содержания гликозидов *R. rosea* не происходит. Анализ экстракта корней с корневищами растений, произрастающих в долине реки Щугор, показал, что содержание гликозидов в них намного выше, чем в интродуцированных растениях (табл.1). Низкое содержание гликозидов в корнях с корневищами *R. rosea*, собранных в долине реки Большой Паток, обусловлено климатическими условиями данного года: средняя температура превышала среднее значение для лета на 5-7 °С, количество выпавших осадков за июль-август 2003 года меньше среднего значения.

Таким образом, показано, что при интродукции на Европейском Северо-востоке можно получать растения *R. rosea*, удовлетворяющие

требованиям Государственной фармакопеи, лишь на 3-й год жизни. Средняя массовая доля гликозидов в экстрактах дикой *R. rosea* на 23% больше, чем в культурных растениях. Показано, что накопление гликозидов *R. rosea* на Северном Урале также зависит от природных условий.

В виду низкого содержания целевых компонентов в растительном сырье, трудоемкости их выделения и, следовательно, высокой себестоимости, нами был проведен синтез трех мажорных компонентов экстракта *R. rosea*: розина **18**, розавина **2**, салидрозида **1**.

### Синтез салидрозида (1)

Синтез салидрозида проводили в две стадии: на первой – ацилировали тирозол **4** по фенольной группе, на второй – гликозилировали **5** ацетобром-глюкозой с получением соединения **7** (схема 2).

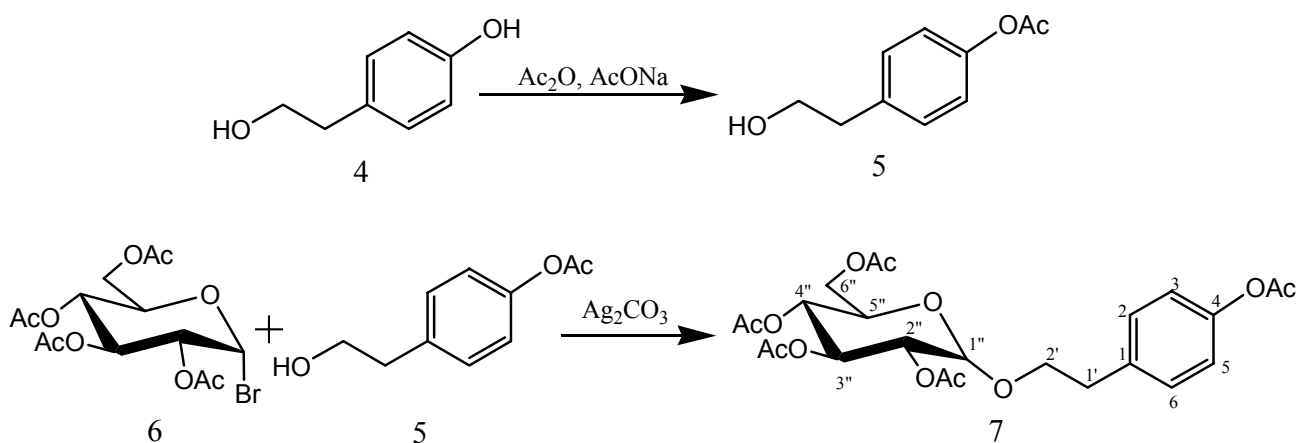


Схема 2. Синтез салидрозида

После снятия защитных групп строение полученного соединения изучали методом ЯМР <sup>1</sup>H спектроскопии. В спектре вещества видны сигналы протонов *para*-замещенного фенола в положении 2, 6 и 3, 5 которые проявляются в виде дуплетов при 7.1 и 6.7 м.д., водород при фенольной группе дает сигнал при 4.5 м.д. Сигналы протонов при 7 и 8 углеродных атомах проявляются при 2.7 и 3.7 м.д. соответственно. Сигнал при 3.9 м.д. (д.д.) соответствует водороду при C<sub>1</sub>' атоме глюкозы и говорит о наличии β-D-гликозидной связи глюкозного фрагмента с фенольным. Сигналы протонов глюкозы лежат в интервале 3.4 – 4.2. м.д., протоны гидроксильных групп глюкозы наблюдаются в виде уширенного сигнала при 4.9 м.д. Таким образом, показано, что синтезированное соединение имеет структуру салидрозида.

### Синтез розавина (2)

Синтез розавина проводили двумя способами: способ А: предусматривает получение дисахарида и на его основе получение



гликозилирующего агента и синтез непосредственно самого гликозида – розавина; в способе **Б** первоначально синтезируют гликозид – розин, и далее, наращивая гликозидную цепь, получают розавин.

**Способ А** (схема 3): С этой целью был получен 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-6-О-трифенилметил-D-глюкопиранозид, который обрабатывали бромоводородом для удаления трифенилметильной группы. Полученный таким образом 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-D-глюкопиранозид (8) гликозилировали, используя различные катализаторы (карбонат серебра, хлорат серебра, оксолат меди) арабинопиранозилбромидом (9) в хлористом метилене (табл. 2).

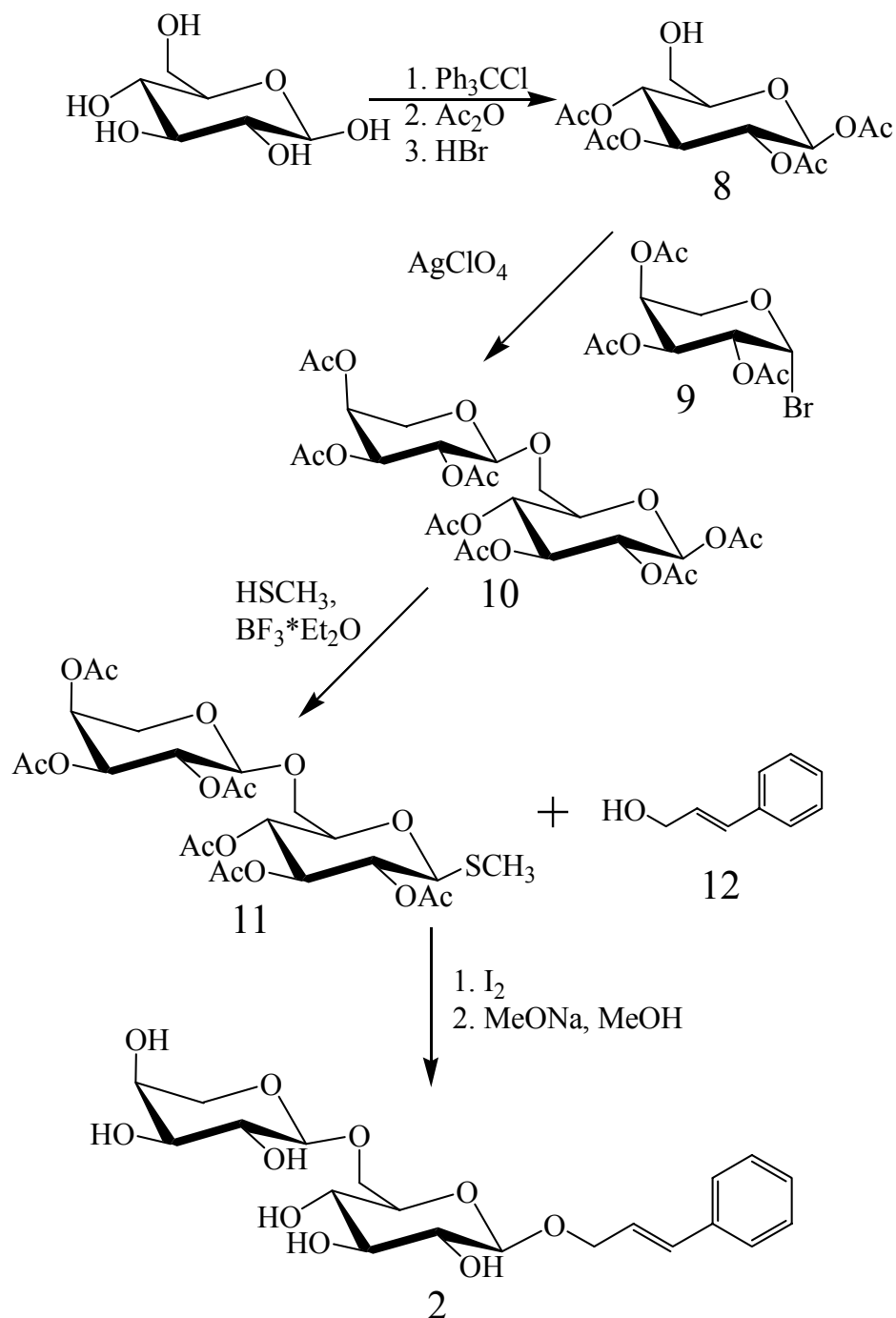


Схема 3. Синтез розавина, способ А

**Выход 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил-2,3,4-три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозы при использовании различных катализаторов**

Катализатор	α-L-производные, %
Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	13±2
AgClO <sub>4</sub> , CaCO <sub>3</sub>	27±2
TiCl <sub>4</sub>	20±2
BF <sub>3</sub> •Et <sub>2</sub> O	18±2

С целью получения гликозилирующего агента дисахарид **10** обрабатывали в хлороформе метилмеркаптаном, в качестве катализатора использовали эфират трехфтористого бора (BF<sub>3</sub>•Et<sub>2</sub>O).

Далее проводили гликозилирование коричневого спирта **12** реагентом **11** при комнатной температуре в течение 8 ч с кристаллическим йодом в качестве катализатора. Полный ацетат розавина выделяли колоночной хроматографией на силикагеле и подвергали гидролизу по реакции Земплена для удаления защитных ацетатных групп. Продукт гидролиза очищали и анализировали методом ВЭЖХ на колонке *Silasorb* C-18 детектированием при длине волны 252 нм. Получили розавин **2** с общим выходом ~5%.

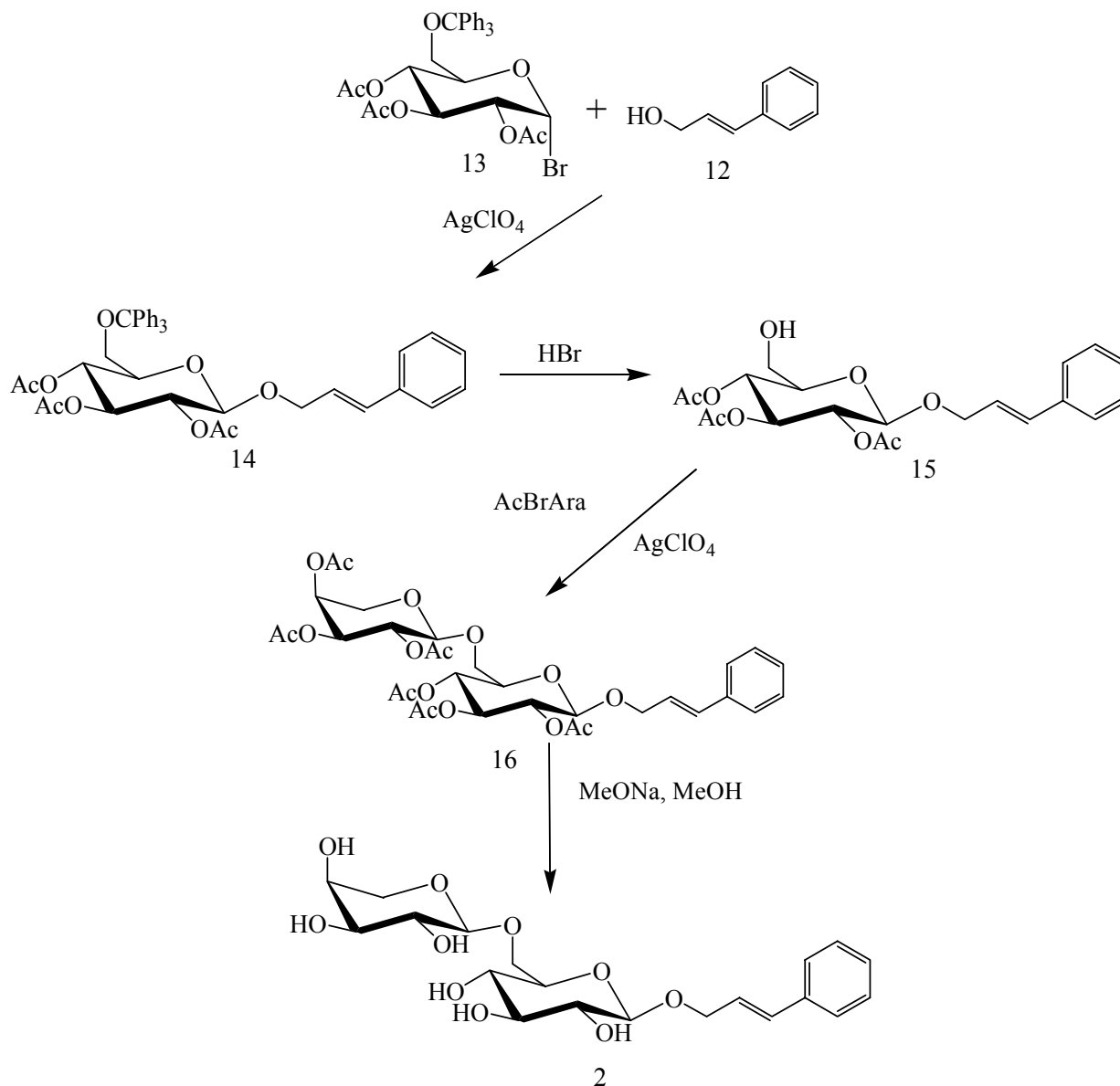
Строение **2** доказали с помощью ЯМР <sup>13</sup>C спектроскопии: фенольное кольцо C<sub>1</sub> – 136.7, C<sub>2,4</sub> – 126.3, C<sub>3,5</sub> – 127.4, C<sub>6</sub> – 128.5 м.д., сигналы C<sub>7</sub> – 131.5, C<sub>8</sub> – 127.5, C<sub>9</sub> – 70.5 м.д. оксипропиленового остатка, β-D-гликозидную связь C<sub>1'</sub> при 102.3 м.д., д.д. 4.3 м.д., α-L-гликозидную связь C<sub>1''</sub> при 103.5 м.д., д.д. 4.3 м.д., сигналы остальных атомов углерода углеводной части лежат в области 62-76 м.д. Таким образом показано, что синтезированный розавин идентичен выделенному из растения.

**Способ Б** (схема 4): 2,3,4-три-О-ацетил-6-О-трифенилметил-β-D-глюкопиранозилбромид **13** присоединяли к агликону (коричному спирту) **12**. В качестве катализаторов реакции использовали соли серебра, дибензо-18-краун-6 эфир, оксалат меди (табл. 3).

Следующим этапом синтеза стало снятие защитной трифенилметильной группы по 6-му положению глюкозы. С этой целью полученный продукт *транс*-циннамил-О-β-D-6-О-трифенилметил-2,3,4-три-О-ацетилглюкопиранозу **14** обрабатывали бромоводородом, растворенным в уксусной кислоте. При этом трифенилметильная группа отщеплялась, не затрагивая остальные ацетатные группы. Недостатком способа являлось то, что частично разрушался и сам продукт **15**, поэтому выходы данной реакции были порядка 60-70 %. На последнем этапе проводили конденсацию *транс*-циннамил-О-β-D-2,3,4-три-О-ацетилглюкопиранозы **15** с арабинопиранозилбромидом **9** в присутствии хлората серебра как катализатора.

**Выходы продуктов гликозилирования тетра-О-ацетил-6-О-трифенилметил-β-D-глюкопиранозилбромида и коричневого спирта при использовании различных катализаторов**

Катализатор	β-D-производное, %
Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15±2
AgClO <sub>4</sub> , CaCO <sub>3</sub>	20±2
18-Краун-6	18±2
CuC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	12±2



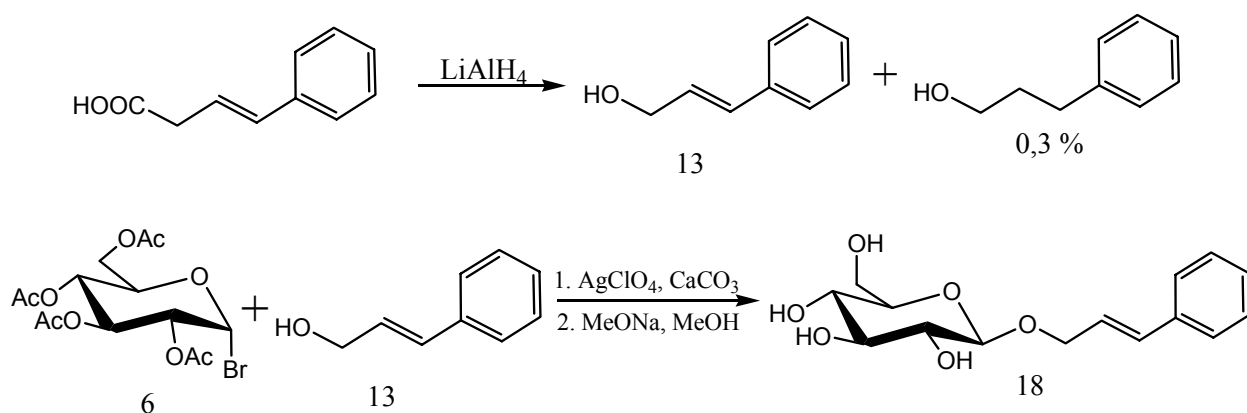
**Схема 4. Синтез розавина, способ Б**

Полученное соединение *транс*-циннамил-О-(6'-О-α-L-три-О-ацетил-арабинопиранозил-β-D-тетра-О-ацетил-глюкопиранозид) **16** выделяли колоночной хроматографией на SiO<sub>2</sub>, гидролизовали метилатом натрия в метаноле и получали розавин **2** с общим выходом до 1%.

Полученные результаты указывают на то, что синтез розавина через образование дисахаридного мостика и последующего присоединения коричневого спирта дает продукт с большим выходом (1-5 %), чем при постепенном достраивании углеводной цепи (0.2-1 %). Строение полученных соединений по данным ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$ -спектроскопии полностью соответствует гликозиду, выделенному из растения.

### Синтез розина (18)

Синтез розина проводили по схеме 5. Вначале восстанавливали коричневую кислоту до коричневого спирта **13**. При этом в качестве примеси (0.3%) дополнительно с коричневым спиртом происходит образование 3-фенил-1-пропанола. Разделение и выделение индивидуальных веществ проводили на колонке с силикагелем. Данные ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  спектроскопии подтверждают структуру коричневого спирта:  $\text{C}_1$  – 141.3 м.д.,  $\text{C}_{2,6}$  – 126.4 м.д.,  $\text{C}_{3,5}$  – 128.3 м.д.,  $\text{C}_4$  – 127.9 м.д.,  $\text{C}_7$  – 130.0 м.д.,  $\text{C}_8$  – 126.8 м.д.,  $\text{C}_9$  – 62.3 м.д., ЯМР  $^1\text{H}$ : бензольное кольцо 7.3 м.д. (м.),  $\text{C}_7$  – 6.5 м.д. (д.),  $\text{C}_8$  – 6.3 м.д. (т.д.),  $\text{C}_9$  – 4.2 м.д. (д.), -ОН – 4.3 м.д. (с.). ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  спектры 3-фенил-1-пропанола указывают на отсутствие сопряженной двойной связи в соединении (ЯМР  $^{13}\text{C}$ :  $\text{C}_1$  – 141.7 м.д.,  $\text{C}_{2,3}$ - $\text{C}_{5,6}$  – 128.2 м.д.,  $\text{C}_4$  – 414.7 м.д.,  $\text{C}_7$  – 31.9 м.д.,  $\text{C}_8$  – 33.9 м.д.,  $\text{C}_9$  – 61.7 м.д.; ЯМР  $^1\text{H}$ : бензольное кольцо 7.2-7.4 м.д.,  $\text{C}_7$  – 2.6 м.д. (т.),  $\text{C}_8$  – 1.9 м.д. (т.т.),  $\text{C}_9$  – 3.7 м.д. (т.)).



### Схема 5. Синтез розина

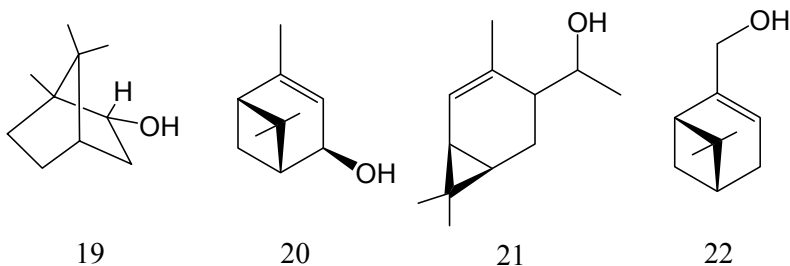
Гликозилирование коричневого спирта **13** проводили ацетобромглюкозой в присутствии катализатора  $\text{AgClO}_4$ - $\text{CaCO}_3$  в течение суток в темноте при комнатной температуре, выход продукта после колоночной хроматографии на  $\text{SiO}_2$  составил 25%, гидролизом которого был получен гликозид **18**.

Наличие  $\beta$ -D-гликозидной связи подтверждается в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  сигналом 102.0 м.д. ( $\text{C}_1$ ), углеводного фрагмента – 71.3-62.0 м.д., фенильной группы –  $\text{C}_1$  – 141.7 м.д.,  $\text{C}_{2,6}$  – 125.6 м.д.,  $\text{C}_{3,5}$  – 128.4 м.д.,  $\text{C}_4$  – 126.3 м.д.,  $\text{C}_7$  – 132.1 м.д.,  $\text{C}_8$  – 128.2 м.д.,  $\text{C}_9$  – 68.7 м.д. Таким образом, синтезированный розин полностью соответствует природному, выделенному из родиолы розовой.

## Синтез гликозидов монотерпеноидов

Известно, что терпеноиды являются биологически активными веществами. Однако использование соединений данного класса в качестве лекарственных средств затруднено, что частично связано с их плохой растворимостью в водных растворах и малой проницаемостью через клеточную стенку. Поэтому для фармакопеи интерес представляют гликозиды терпеноидов, которые, как известно, хорошо растворяются в физиологических жидкостях. Среди монотерпеноидов различной природы особый интерес представляют борнеол **19**,

*цис*-вербенол **20**, 4-(1-гидроксиэтил)карен-2 **21**, миртенол **22**, которые проявляют ярко выраженную бактерицидную и фунгицидную активность.



Синтез монотерпеновых гликозидов проводили по методу Кеннигса-Кнорра (схема 6), используя в качестве катализатора карбонат серебра. По окончании реакции избыток монотерпеноидов удаляли отгонкой с водяным паром, затем синтезированные гликозиды выделяли хроматографией на колонке с силикагелем.

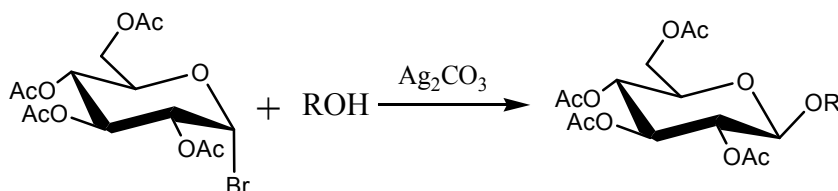


Схема 6. Синтез гликозидов монотерпеноидов

Выходы полученных гликозидов варьируется от 35 до 57% (табл.4). Вероятно такой разброс объясняется наличием стерических затруднений в структуре монотерпеноидов. В частности, в структуре вербенола, для которого выход гликозида наибольший, гидроксильная группа оказывается более реакционноспособной, так как находится в аллильном положении, а также она максимально удалена от C<sub>6</sub> мостиковой связи. Низкий выход гликозида борнеола объясняется тем, что гидроксильная группа в положении C<sub>2</sub> экранируется мостиковой связью при C<sub>7</sub>, что создает дополнительные стерические затруднения при проведении реакции гликозилирования. Выход гликозидов миртенола и 4-(1-гидроксиэтил)карена-2 меньше, чем *цис*-вербенола, несмотря на то, что гидроксильные группы находятся в более выгодном положении с точки зрения реакционной способности и доступности.

**Выходы терпеновых гликозидов**

Агликон (ROH)	Выход, %
Борнеол (19)	35.4±0.5
<i>цис</i> -Вербенол (20)	57.5±0.5
4-(1-гидроксиэтил)карен-2 (21)	42.2±0.5
Миртенол (22)	41.6±0.5

Методами спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  установлено, что полученные гликозиды имеют  $\beta$ -D-гликозидную связь, что подтверждается наличием в спектрах сигналов при 4.2-4.6 м.д. ( $J_{1,2}$ , 8 Гц) и 99-101 м.д. соответственно. Полученные гликозиды монотерпеноидов в настоящее время испытываются на биологическую активность.

**Гликозиды стероидов и тритерпенов**

В связи с тем, что растворимость стероидов в физиологических жидкостях человека – крови, слюне, пищеварительном соке сравнительно невелика (8-10 мг/мл), представлялось целесообразным разработать методы и схемы синтеза полусинтетических гликозидов стероидов, более приемлемых как для перорального, так и инъекционного введения их в организм человека.

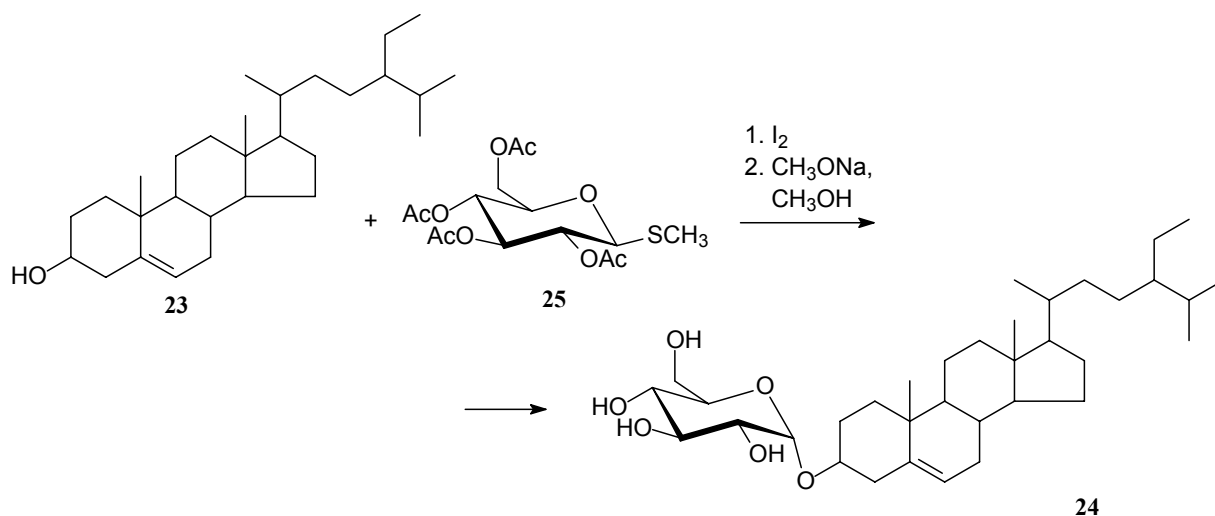
**Гликозид  $\beta$ -ситостерина (24)**

По литературным данным из надземной части растения *R.rosea* были выделены вещества стероидной природы, в частности  $\beta$ -ситостерин **23** и даукостерин **24**. Но в виду их низкого содержания в данном растении нами в качестве растительного материала была взята кора осины, которая кроме того, содержит салидрозид и некоторые другие терпеновые и фенольные соединения.

Для выделения соединения **23** проводили экстракцию осиновой коры этилацетатом в аппарате Сокслетта. После упаривания растворителя экстракционную смесь наносили на колонку с сорбентом Диасорб 130С-16Т и элюировали водными растворами этилового спирта различной концентрации (0-30 %). Фракции анализировали методом ВЭЖХ. В ЯМР  $^1\text{H}$  спектре  $\beta$ -ситостерина сигналы кольцевой системы стероида лежат в пределах 0.5-2.5 м.д., четко видны сигналы протонов при  $\text{C}_3$  атоме, связанном с гидроксильной группой (3.5 м.д. (1H, м)) и  $\text{C}_6$ , находящемся при двойной связи в цикле (5.3 м.д. (1H, т)), протон при гидроксильной группе дает уширенный синглет при 3.0 м.д.

Синтез гликозида  $\beta$ -ситостерина проводили, используя в качестве гликозилирующего агента меркаптопроизводное глюкозы – 2,3,4,6-тетра-О-

ацетил- $\beta$ -метил-1-тио-D-глюкопиранозид **25**, в качестве катализатора выступал кристаллический йод (схема 7). Выход целевого продукта **24** составил 30-35 %.



### Схема 7. Синтез гликозида $\beta$ -ситостерина

Спектр ЯМР  $^{13}C$  позволил нам сделать вывод, что агликон связан  $\alpha$ -D-гликозидной связью с глюкозой (86.3 м.д.). Таким образом, наше соединение имеет структуру гликозида даукостерина **24**.

### Гликозид $\alpha$ -экдизона (**27**)

Еще одним из интересных объектов исследований в последнее время является  $\alpha$ -экдизон, 20-гидроксиэкдизон и инокостерон. Основными источниками для получения экдистероидов стали растения родов *Rhaponticum* и *Silene*.

Экстракцию фитоэкдистероидов проводили 40%-ным этиловым спиртом из измельченного растительного сырья *Serratula coronata* L. (серпуха венценосная), после чего экстракт обрабатывали раствором сульфата цинка и сумму стероидов разделяли на колонке, заполненной сорбентом Диасорб 130-С16Т. После разделения суммарного экстракта были получены  $\alpha$ -экдизон **26**, 20-гидроксиэкдизон и инокостерон.

Полученный  $\alpha$ -экдизон гликозилировали двукратным избытком гликозилирующего агента 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -метил-1-тио-D-глюкопиранозид **25**, в качестве катализатора реакции использовали кристаллический йод (схема 8), выход продукта составил 30-35%. ЯМР  $^{13}C$  спектр указывает на то, что гликозилирование экдистероида проходит по двум положениям: происходит смещение сигналов, соответствующих  $C_3$  и  $C_{22}$  атомам в область слабого поля (80.8 м.д. и 90.1 м.д. соответственно), с образованием  $\beta$ -D-гликозидной связи ( $C_{1'}$  100.5 м.д. и  $C_{1''}$  101.4 м.д.).

Таким образом можно утверждать, что полученный препарат  $\alpha$ -экдизона является бигликозидом **27**, а наиболее реакционноспособные гидроксильные группы находятся в положениях  $C_3$  и  $C_{22}$ . По литературным данным, из

растений родов *Melandrium*, *Allium* были выделены гликозиды стероидной природы, причем углеводные фрагменты находились по положениям C<sub>3</sub>, C<sub>22</sub> и C<sub>25</sub>.

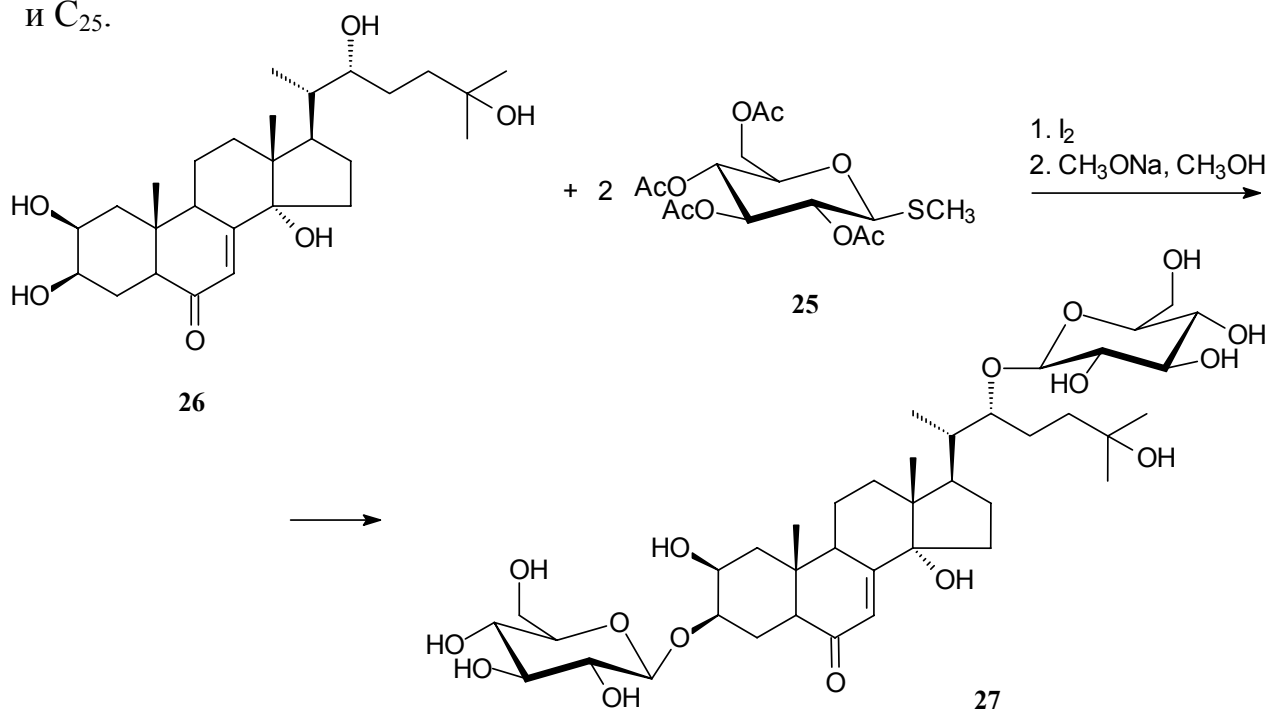


Схема 8. Синтез гликозида  $\alpha$ -экидона

### Исследования физиологической активности синтетического розина

В связи с тем, что природные аналоги синтезированных препаратов проявляют высокую биологическую активность, представлялось целесообразным провести тестирование на активность синтетических аналогов. В качестве образца был взят гликозид родиолы розовой – розин. Испытания на биологическую эффективность проводились в Институте Биологии КНЦ УрО РАН в лаборатории генетики. Хоз. договор № 56-2004 «Исследование биологической активности синтетического розина на лабораторных животных».

#### Тест на лабораторных мышах

Испытание физиологической активности розина проведено на лабораторных мышах линии СВА (100 мг/кг) и С57В1. Физическую работоспособность и влияние на нее розина оценивали по выносливости к динамической и статической нагрузке. Исследуемое вещество растворяли в физиологическом растворе. Розин в концентрации 100 мг/кг (мыши линии СВА); 5, 0.5 и 0.05 мг/кг (мыши линии С57В1) вводили внутривенно. В качестве контроля использовали физиологический раствор (0.9%-ный раствор NaCl).



В результате исследования физиологической активности розина было установлено, что только минимальная из исследованных концентраций оказывает положительное воздействие на увеличение выносливости к динамическим нагрузкам – продолжительность плавания увеличилась более чем на 40%. При этой дозе также наблюдается увеличение массы семенников. Высокие дозы (5 и 100 мг/кг) наоборот приводили к резкому снижению устойчивости к статической и особенно к динамической нагрузкам – продолжительность плавания снизилась в 10 раз. Следует обратить особое внимание, что только при максимальной концентрации обнаружено увеличение частоты хромосомных aberrаций. Установлено, что низкие концентрации розина могут увеличивать устойчивость к физическим нагрузкам, т.е. обладают адаптогенными свойствами.

Учитывая тот факт, что некоторые концентрации розина приводили к увеличению уровня генетической изменчивости были проведены испытания препарата на дрозофиле. Данный объект позволяет, используя стандартные методы, оценить биологическую эффективность. Тесты на дрозофиле (линии *Drosophila melanogaster*: *Canton-S*, *mei-41*, *mus 209*, 4015, 4018) показали, что воздействие розина на ранние стадии развития, независимо от генотипа, приводит к достоверно значимому увеличению медианной продолжительности жизни (на 23%) у самцов.

## Выводы

1. С помощью обращеннофазовой хроматографии низкого давления без применения токсичных растворителей из экстракта корней с корневищами растения *Rhodiola rosea* L. выделены в нативном виде гликозиды – розавин и салидрозид. Разработаны методы анализа, позволяющие оценить качество растительного сырья *Rhodiola rosea* L., в частности показано, что к третьему году вегетации интродуцированное сырье накапливает гликозиды в количествах, удовлетворяющих требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации. Растения, произрастающие в горных районах Северного Урала, накапливают гликозидов в среднем на 23% больше, чем культурные растения.

2. Синтезированы гликозиды *Rhodiola rosea* L. – салидрозид и розин. Из разработанных и апробированных двух схем синтеза розавина наиболее эффективной является получение гликозида построением углеводного фрагмента и присоединением его к агликону. Синтезированные гликозиды являются альтернативой природным соединениям как в качестве биологически активных веществ, так и в качестве эталонных соединений.

3. Выполнен ряд синтезов гликозидов монотерпеноидов по методу Кеннигса-Кнорра. Найдено, что практический выход гликозидов в ряду монотерпеноидов может достигать 50%.

4. Впервые синтезированы гликозиды экистероидов. Показано, что реакционная способность гидроксильных групп различна, гликозилирование проходит в положения C<sub>3</sub> и C<sub>22</sub>.

5. Проведены испытания синтетического препарата розина на биологическую активность. Исследования на мышах (линии СВА и С57В1) показали: высокие концентрации розина (100 и 5 мг/кг) снижают выносливость к статической и, особенно, к динамической нагрузке. Минимальная из тестируемых концентраций розина (0,05 мг/кг), привела к увеличению выносливости к динамической нагрузке. Исследование генотоксической эффективности розина не выявило достоверно значимых изменений в половых и соматических клетках. Обнаружено увеличение уровня микроядер только при максимальной дозе розина. Тесты на дрозофиле (линии *Drosophila melanogaster*: Canton-S, *mei-41*, *mus* 209, 4015, 4018) показали что воздействие розина на ранние стадии развития, независимо от генотипа, приводит к достоверно значимому увеличению медианной продолжительности жизни (на 23%) у самцов.

### Публикации

1. **Патов С.А.**, Захожий И.Г., Пунегов В.В., Кучин А.В., Кодесс М.И. Выделение гликозидов *Rhodiola rosea* L. с помощью обращеннофазовой хроматографии и встречный синтез салидрозида // Бутлеровские сообщения. 2002. №7. С. 85-87.

2. Туманова Е.А., **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Кучин А.В., Фролова Л.Л., Кодесс М.И. Гликозилирование монотерпеноидов, входящих в состав эфирных масел растений, методом Кеннигса-Кнорра // Бутлеровские сообщения. 2002. №7. С. 89-91.

3. **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Кучин А.В., Фролова Л.Л. Синтез гликозидов некоторых монотерпеноидов // Химия природных соединений. 2006, №4. С. 431-433.

4. **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Кучин А.В. Синтез розавина - гликозида *Rhodiola rosea* // Химия природных соединений. 2006, №4. С. 397-399.

5. **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Кучин А.В. Выделение гликозидов *Rhodiola rosea* L. с помощью обращеннофазовой хроматографии и встречный синтез салидрозида // II Всероссийская конференция: "Химия и технология растительных веществ": Тез. докл. – Казань, 2002. – С. 3-4.

6. Туманова Е.А., **Патов С.А.** Гликозилирование монотерпеноидов, входящих в состав эфирных масел растений, методом Кеннигса-Кнорра // II Всероссийская конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Казань, 2002. – С.5.

7. **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Сычев Р.Л., Кучин А.В., Кодесс М.И. Синтез гликозидов бетулина и экдистероидов // II Всероссийская конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Казань, 2002, – С.35.

8. Захожий И.Г., Пунегов В.В., **Патов С.А.** Об эффективности твердофазной экстракции при подготовке проб препаратов *Rhodiola rosea* L. для ВЭЖХ анализа гликозидов. // I Всероссийская конференция: “Аналитические приборы”: Тез. докл. – СПб, 2002. – С. 177.

9. **Патов С.А.**, Кучин А.В. Синтез розавина – гликозида родиолы розовой *Rhodiola rosea* L. // III Всероссийская конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Саратов, 2004. – С. 69.

10. Пунегов В.В., **Патов С.А.**, Сычев Р.Л., Туманова Е.А. Электрохимическая трансформация  $\alpha$ -пинена в нестационарном поле импульсного тока как способ получения кислородсодержащих монотерпеноидов // III Всероссийская конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Саратов, 2004. – С. 109-110.

11. **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Кучин А.В. Гликозиды *Rhodiola rosea* L. выделение, анализ состава, встречный синтез // Всероссийская конференция: “Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья”: Тез. докл. – Барнаул, 2005. – С.246.

12. **Патов С.А.**, Пунегов В.В., Кучин А.В. Выделение и синтез гликозидов *Rhodiola rosea* L. // IV Всероссийская научная конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Сыктывкар, 2006. – С. 152.

13. **Патов С.А.**, Зайнуллин В.Г., Пунегов В.В., Кучин А.В. Исследование биологической активности синтетического розина // IV Всероссийская научная конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Сыктывкар, 2006. – С. 153.

14. **Патов С.А.**, Туманова Е.А., Пунегов В.В., Фролова Л.Л., Кучин А.В. Синтез гликозидов некоторых монотерпеноидов // IV Всероссийская научная конференция: “Химия и технология растительных веществ”: Тез. докл. – Сыктывкар, 2006. – С. 154.

Лицензия № 0047 от 10.01.1999  
Заказ № 53 Тираж 100 экз.

---

Издательство Коми научного центра УрО РАН  
167982, ГСП, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 48.