

УДК 547.587.51

Биологическая активность фенольных соединений, выделенных из галении рогатой (*Halenia corniculata* (L.) Cornaz)

Т. М. МИХАЙЛОВА¹, Э. Э. ШУЛЬЦ², Л. М. ТАНХАЕВА³, Г. Г. НИКОЛАЕВА³, Н. В. БОДОВЕВ¹, Г. А. ТОЛСТИКОВ²

¹Бурятский государственный университет,
ул. Смолина, 24А, Улан-Удэ 670000 (Россия)

E-mail: mihailova25@rambler.ru

²Институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: schultz@nioch.nsc.ru

³Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН,
ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ 670047 (Россия)

(Поступила 26.05.04; после доработки 17.10.04)

Аннотация

Исследован состав экстрактивных веществ надземной части галении рогатой. Выделены и охарактеризованы два индивидуальных вещества.

ВВЕДЕНИЕ

Галения рогатая (*Halenia corniculata* (L.) Cornaz) – однолетнее растение высотой 12–50 см, широко распространенное в европейской части России, Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке, в Монголии и Манчжурии [1, 2] и встречающееся на лугах, лесных опушках, по берегам рек и ручьев, в ивняках и ерниках, на луговых склонах и в разреженных лесах [2, 3].

Надземная часть галении рогатой применяется в тибетской медицине в качестве заменителя сырья “сэр-тиг”, которое назначают для лечения “жара желчи и заразы” [4–7]. Настои и настойку галении рогатой на водке рекомендуют в качестве средства, возбуждающего аппетит и регулирующего пищеварение, а также при гастритах, болях в области кишечника, желудка, заболеваниях печени, колитах, энтероколитах [8]. Полифенольный комплекс из галении рогатой обладает антиоксидантным и гепатозащитным действием [9, 10].

В растении обнаружены эфирные масла, алкалоиды, дубильные вещества, иридоиды, фенольные соединения (ксантоны, флавоноиды) [11–17].

Исследования галении рогатой в основном связаны с изучением химического состава [17] и фармакологической активности индивидуальных ксантонов [18, 19]. Экспериментально подтверждено, что индивидуальные ксантоны галении рогатой оказывают гепатопротекторное действие, обусловленное их мембраностабилизирующим и антиоксидантным действием [18, 19].

Настоящая работа посвящена проблеме выделения доминирующих химически чистых фенольных соединений из надземной части галении рогатой с целью повышения их выхода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Надземная часть галении рогатой собрана в августе 2001 г. в период цветения (Кабан-

ский район, Бурятия). Использовали свеже-перегнанные растворители квалификации «ч».

Температуру плавления определяли на аппарате Kofler. Для определения молекулярных масс и элементного состава использовали масс-спектрометр высокого разрешения Finnigan MAT 8200. Спектры ЯМР получали на спектрометре Bruker AC 200 (рабочая частота 200.13 МГц для ^1H и 50.32 МГц для ^{13}C) в растворе CDCl_3 . Мультиплетность сигналов в спектрах ^{13}C ЯМР определяли по стандартным методикам снятия спектров в режиме J-модуляции (JMOD).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром-4» (ПО «Научприбор», Орел). Условия хроматографирования: стальная колонка размером 2×64 мм, сорбент Nucleosil C-18 (5 мкм), температура ~ 20 °С, скорость элюирования 100 мкл/мин, УФ-детектирование при 360 нм.

Методика обработки растительного материала

Воздушно-сухую измельченную надземную часть (2–3 мм) галении рогатой в количестве 1.5 кг подвергали пятикратной экстракции 70 %-м этиловым спиртом при соотношении сырья и растворителя, равном 1 : 12 (18–20 °С, по 72 ч). Объединенные экстракты концентрировали в вакууме до водного остатка (0.5 л), который последовательно обрабатывали в делительной воронке хлороформом (25×200 мл) и этилацетатом (25×300 мл). Органические извлечения упаривали в вакууме, остаток подвергали разделению. Выход экстрактивных веществ из надземной части

галении рогатой в случае использования в качестве растворителя хлороформа составил 99.79 г (6.65 % от массы абсолютно сухого сырья), в случае использования этилацетата – 53.11 г (3.54 % от массы абсолютно сухого сырья).

Разделение хлороформного извлечения

Способ I. Хлороформное извлечение концентрировали на ротационном испарителе досуха. Сухой остаток хроматографировали на колонке с силикагелем L 100/400, используя в качестве элюента смесь гексана и этилацетата (7 : 3). Фракции отбирали по 100 мл. Контроль за разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Silufol в системе гексан – этилацетат (7 : 3). В результате разделения выделен индивидуальный ксантон – 1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон **1**, чистота которого определена методом ВЭЖХ (табл. 1).

Способ II. Колоночной хроматографией 5.4 г хлороформного извлечения на силикагеле L 100/250 (элюент: хлороформ → этанол) получили две фракции: 2.57 г фракции 1 (элюент – хлороформ) и 2.83 г фракции 2 (элюент – этанол).

Перекристаллизацией фракции 1 из этанола выделили 0.55 г осадка I, 0.12 г осадка II, 0.05 г осадка III и 0.02 г осадка IV, которые представляют собой смеси ксантонов: 1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантона **1**, 1-гидрокси-2,3,5-триметоксиксантона **2** и 1-гидрокси-2,3,4,7-тетраметоксиксантона **3**. Идентификация соединений **1–3** проведена на основании данных ТСХ и ЯМР.

Перекристаллизацией фракции 2 из этанола выделили 0.37 г осадка I (смесь 1-гидро-

ТАБЛИЦА 1

Выход индивидуальных веществ, выделенных из надземной части галении рогатой

Вещество	Чистота, %	Выход		
		% от массы извлечения	% от массы абсолютно сухого сырья	
			Данная работа	Литературные данные
1	95.22	3.76	0.25	0.003 [20], 0.12 [21]
4	96.81	5.93	0.21	0.0096 [17]

ТАБЛИЦА 2

Сравнительная характеристика физико-химических свойств соединений **1** и **4** с литературными данными

Соединение	Т. пл., °С	Хроматографическое поведение R_f	УФ-спектры, λ_{max} (MeOH), нм	1H ЯМР-спектры, (δ_c , м.д., J , Гц)
1	146–147	0.29 (гексан/этилацетат = 7 : 3)	244, 260, 275 пл., 314, 378	3.92 (3H, с, OCH ₃), 4.00 (6H, с, 2×OCH ₃), 4.12 (3H, с, OCH ₃), 7.22 (2H, м, H-6,7), 7.77 (1H, дд, $J = 7.5$; 2.0, H-8), 12.55 (1H, с, OH)
1-Гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон [17, 20, 21]	145–147	0.24 (гексан/этилацетат = 7 : 3)	243,261, 273 пл., 313, 380	3.96 (3H, с, OCH ₃), 4.02 (6H, с, OCH ₃), 4.16 (3H, с, OCH ₃), 7.28 (2H, м, H-6,7), 7.8 (1H, дд, $J = 9.0$; 2.5, H-8)
4	326–328	0.22 (хлороформ/метанол = 9 : 1)	253, 265, 292 пл., 347	6.23 (1H, д, $J = 2.0$, H-8), 6.50 (1H, д, $J = 2.0$, H-6), 6.56 (1H, с, H-3), 6.99 (1H, д, $J = 7.8$, H-5'), 7.45 (1H, дд, $J = 7.8$; 1.8, H-6'), 7.48 (1H, д, $J = 1.8$, H-2'), 13.0 (1H, с, OH при C-5)
5,7,3',4'-Тетрагидрокси-флавонон (лютеолин) [17, 22, 23]	328–331 (с разл.)	–	242 пл., 253, 267, 291 пл., 349	6.58 (1H, д, $J = 2.0$, H-6), 6.67 (1H, д, $J = 2.0$, H-8), 6.79 (1H, с, H-3), 7.08 (1H, д, $J = 8.0$, H-5'), 7.51 (уш. с, H-2'), 7.56 (1H, дд, $J = 2.0$; 8.0, H-6')

кси-2,3,4,5-тетраметоксиксантона **1** и 1-гидрокси-2,3,5-триметоксиксантона **2** в соотношении 2.5 : 1) и 0.08 г осадка II (смесь 1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантона **1** и 1-гидрокси-2,3,5-триметоксиксантона **2** в соотношении 1 : 4) с примесью 1-гидрокси-2,3,4,7-тетраметоксиксантона **3**. Идентификация соединений **1–3** проведена на основании данных ТСХ и ЯМР, а соотношение ксантонов в осадках I и II определяли по соотношению интегральных интенсивностей сигналов протонов ЯМР-спектров. По данным спектров 1H ЯМР хлороформной фракции, содержание ксантона **3** не превышает 0.09 % в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Разделение этилацетатного извлечения

Колоночной хроматографией 1 г этилацетатного извлечения на силикагеле L 100/250 (элюент: хлороформ → этилацетат → этанол) получили три фракции: фракцию 1 (элюент хлороформ) – 0.07 г (содержание ксантона **1** по данным 1H ЯМР не превышает 10 % от массы фракции), фракцию 2 (элюент – этил-

ацетат) – 0.66 г, фракцию 3 (элюент – этанол) – 0.23 г (по данным ТСХ и ЯМР, не содержит упомянутых ксантоновых соединений).

Перекристаллизацией фракции 2 из этанола выделили индивидуальный флавоноид лютеолин **4**, чистоту которого определили методом ВЭЖХ (см. табл. 1). Методом ВЭЖХ определили содержание лютеолина во фракции 2, которое составило 68.26 %. В надземной части галении рогатой содержание данного соединения составляет 0.21 %.

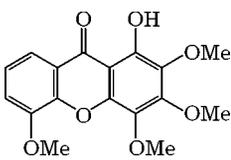
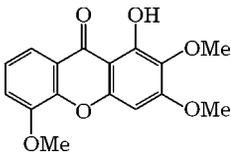
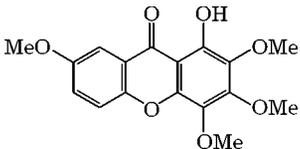
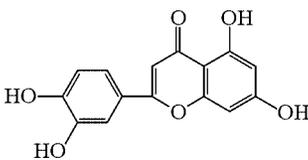
Как видно из табл. 2, качество выделенных из надземной части галении рогатой фенольных соединений **1** и **4** соответствует химически чистым 1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантону и 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонону (лютеолину) соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате разделения хлороформного извлечения из галении рогатой двумя способами наиболее приемлемым оказался первый, который позволил выделить индивидуальный ксантон **1** (1-гидрокси-2,3,4,5-тетра-

ТАБЛИЦА 3

Структурные формулы выделенных из галении рогатой веществ

Соединение	Структурная формула	Название
1		1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон
2		1-гидрокси-2,3,5-триметоксиксантон
3		1-гидрокси-2,3,4,7-тетраметоксиксантон
4		5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонон (лютеолин)

метоксиксантон), а при разделении этилацетатного извлечения удалось выделить индивидуальный флавоноид **4** (лютеолин). Предложенные способы выделения этих индивидуальных веществ позволили повысить их выход.

Структуры ксантоновых соединений **1–3** и флавоноида **4** приведены в табл. 3.

Таким образом, хлороформное извлечение из надземной части галении рогатой может быть использовано в качестве источника получения ксантоновых соединений. Доминирующий ксантон данного извлечения представляет собой 1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон (0.25 % от массы абсолютно сухого сырья). Из этилацетатного извлечения выделяется лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонон) с выходом 0.21 % от массы абсолютно сухого сырья. Соединение **1** (1-гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон) использовали для проведения синтетических трансформаций.

Ниже приведена характеристика индивидуальных соединений.

1-Гидрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон **1**.

Т. пл. 146–147 °С (из этанола). УФ-спектр: λ_{\max} (MeOH) 244, 260, 275 пл., 314, 378 нм. Масс-спектр, m/z (%): 347 (13.55), 332 (83.87), 317 (100), 302 (13.27), 289 (10.83), 259 (11.17), 175 (11.68). $C_{17}H_{16}O_7$. Расч. m/z : 332.08959. Эксп. m/z : 332.08801. Спектр ЯМР ^{13}C (δ_c , м.д.): 56.42 (CH₃), 61.47 (CH₃), 61.72 (2×CH₃), 95.12 (C-4), 106.79 (C-8a), 115.92 (C-6), 116.49 (C-7), 120.83 (C-5a), 123.56 (C-8), 132.69 (C-4a), 135.42 (C-1a), 145.62 (C-5), 148.66 (C-3), 150.49 (C-2), 154.08 (C-1), 181.58 (C-9). Данные спектра 1H ЯМР аналогичны приведенным в работах [17, 20, 24].

5,7,3',4'-Тетрагидроксифлавонон (лютеолин) **4**.

Т. пл. 326–328 °С. УФ-спектр: λ_{\max} (MeOH) 253, 265 пл., 292 пл., 347 нм; NaOAc: 270, 380 нм; NaOAc + H₃BO₃ 263, 378 нм; AlCl₃ 273, 303 пл., 332, 430 нм; AlCl₃ + HCl 265, 272, 300 пл., 364, 385; NaOMe 272, 420 нм. Спектр ЯМР 1H (δ_c , м.д., J , Гц): 6.23 (д, 1H, H-8, J = 2.0); 6.50 (д, 1H, H-6, J = 2.0); 6.56 (с, 1H, H-3); 6.99 (д, 1H, H-5', J = 7.8); 7.45 (дд, 1H, H-6', J = 7.8 и J = 1.8); 7.48 (д, 1H, H-2', J = 1.8); 13.0 (с, OH)

при С-5). Данные аналогичны приведенным в работах [17, 22, 23].

Работа выполнена при финансовой поддержке СО РАН (интеграционный проект № 146) и Федеральной целевой программы “Интеграция” (грант № L 0022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 А. А. Гроссгейм, Семейство Горечавковые – Gentianaceae. Флора СССР, Москва–Ленинград, 1952.
- 2 Л. И. Мальшев, Г. А. Пешков, Флора Центральной Сибири, Наука, Новосибирск, 1979.
- 3 В. И. Грубов, Определитель сосудистых растений Монголии, Наука, Ленинград, 1982.
- 4 А. Ф. Гаммерман, Б. В. Семичов, Словарь тибетско-латино-русских названий лекарственного растительного сырья, применяемого в тибетской медицине, изд. БКНИИ СО АН СССР, Улан-Удэ, 1963.
- 5 Атлас тибетской медицины (Альбом), Галарт, Москва, 1994.
- 6 Данзан-Пунцок. Шэлпхрэнг: Ксилограф на тибетском языке, Агинский дацан, 1763.
- 7 Дэсрид Санчжай-Чжамсо. Вайдурья-онбо: Ксилограф на тибетском языке, Агинский дацан, т. 2, 1688–1689.
- 8 В. В. Телятьев, Целебные клады, Иркутск, 1991.
- 9 А. И. Шретер, Лекарственная флора советского Дальнего Востока, Медицина, Москва, 1975.
- 10 А. Н. Кудрин, С. М. Николаев, К. С. Лоншакова и др., Тез. докл. 5-го Съезда фармакологов УССР, Запорожье, 1985.
- 11 В. Н. Карпович, *Вопросы фармакогнозии*, 12 (1961) 201.
- 12 Л. М. Танхаева, Г. Г. Николаева, В. И. Глызин и др., *Химия природ. соединений*, 6 (1984) 788.
- 13 Л. М. Танхаева, О. Пурэб, Н. Ф. Комисаренко и др., *Растит. ресурсы*, 31 (1995) 57.
- 14 О. Purev, G. Odontyuuya, H. Oyun *et al.*, *Nat. Prod. Lett.*, 5 (1995) 261.
- 15 G. Odontyuuya, O. Purev, G. Davaa-Sambuu *et al.*, *Ibid.*, 5 (1995) 269.
- 16 S. Rodriguez, J.-L. Wolfender, K. Hostettmann, *Helv. Chim. Acta*, 79 (1996) 363.
- 17 Л. М. Танхаева, γ-Пириновые соединения растений сем. Gentianaceae и их химическое изучение: Дис. ... канд. фарм. наук, Улан-Удэ, 1997.
- 18 З. Г. Самбуева, А. В. Цыренжапов, С. М. Николаев и др., *Растит. ресурсы*, 3 (2000) 70.
- 19 С. М. Николаев, Н. В. Бодоев, Т. М. Михайлова и др., Тез. докл. VI Междунар. конф. «Биоантиоксидант», Москва, 2002.
- 20 S. Ghosal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhuri, *Phytochemistry*, 14 (1975) 2671.
- 21 H. Dhasmana, H. S. Garg, *Ibid.*, 28 (1989) 2819.
- 22 T. J. Mabry, K. R. Markham, N. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Berlin *etc.*, 1970.
- 23 В. М. Маликов, М. П. Юлдашев, *Химия природ. соединений*, 4 (2002) 299.
- 24 G. H. Stout, W. J. Balkenhol, *Tetrahedron*, 25 (1969) 1947.