

Национальная Академия наук Грузии  
Институт фармакохимии И. Г. Кутателадзе ТГМУ

**Кемертелидзе Э.П., Бенидзе М.М., Схиртладзе А.В.,  
Надараиа Н.Ш., Мерлани М.И., Амиранашвили Л.Ш.**

**СИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ  
ПРЕПАРАТОВ ИЗ ТИГОГЕНИНА  
ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ В ГРУЗИИ  
*YUCCA GLORIOSA* L. И ИЗУЧЕНИЕ  
ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА РАСТЕНИЯ**

**Тбилиси  
2018**

В книге представлены результаты собственных исследований авторов по выявлению источников синтеза стероидных гормональных препаратов. Приведены способы превращения предложенного для этой цели стероидного сапогенина **тигогенина** из растения *Yucca gloriosa* в ключевые продукты синтеза стероидов 5 $\alpha$  ряда. Из них синтезированы известные препараты различного терапевтического действия. Продолжены исследования по синтезу новых биологически активных стероидов. Изложены итоги обеспечения производства тигогенина сырьем в виде разведенных промышленных плантаций *Yucca gloriosa* в Восточной Грузии.

Описаны результаты изучения химического состава отдельных вегетативных органов *Yucca gloriosa*. Выделено до 60 стероидных гликозидов, среди них более 20 новых соединений, а также сесквитерпены, флавоноиды, стильбенов с уникальной спироструктурой и интересной биологической активностью.

Книга представит интерес для научных работников – химиков, биологов и других специалистов, изучающих биологически активные соединения синтетического и природного происхождения.

Печатается по постановлению редакционно-издательского совета  
Национальной Академии наук Грузии  
2018

ISBN

## **ВВЕДЕНИЕ**

В арсенале современной медикаментозной медицины значительное место занимают стероидные гормональные препараты, используемые для лечения самых разнообразных заболеваний, включая сердечно-сосудистые, нервно-психические, воспалительные процессы, злокачественные новообразования, оральные контрацептивы и т. п. Это обстоятельство вызывает необходимость увеличения их производства и обеспечения исходным сырьем для синтеза. Определенная часть номенклатуры (эстрогены, анаболики) производится полным синтезом из простых химических веществ. Но это экономически далеко не оправдало себя из-за сложности и многостадийности процессов.

Синтез стероидных препаратов в подавляющем большинстве случаев осуществляется на базе природных соединений, содержащих пергидроциклофенантроновую систему, преимущественно растительного происхождения: стеринов, стероидных алкалоидов, стероидных гликозидов спиростанолового ряда.

Поиск рациональных путей синтеза из доступных источников актуальная задача медицинской промышленности. В данном направлении в бывшем Советском Союзе с 50-х годов прошлого столетия были начаты исследования во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (ВНИХФИ), в институтах биоорганической химии им. М.М. Шемякина, органической химии им. Н.Д. Зелинского АН СССР, профессорами Николаем Николаевичем Суворовым, Игорем Владимировичем Торговым,

Иваном Николаевичем Назаровым и достигнуты значительные результаты.

Многообразная по своему составу флора Грузии, включающая до 4600 видов, где хорошо развиваются также и завезенные из-за границы растения, является неиссякаемым источником биологически активных соединений различных химических классов.

Именно поэтому фармакохимическая наука и химико-фармацевтическая промышленность нашей страны развивались на базе их изучения и использования. Основоположником всех направлений в данной области был академик Иовель Григорьевич Кутателадзе, директор основанного им в 1932 году Института фармакохимии. Научные результаты института прошлых лет легли в основу создания химико-фармацевтической промышленности Грузии – создания Батумского и Тбилисского химико-фармацевтических заводов.

Итоги научных исследований Института опубликованы в изданных монографиях и многочисленных научных статьях. Даная книга посвящена конкретному вопросу – выявлению стероидоносных растений, пригодных в качестве исходного сырья в синтезе стероидных гормональных препаратов. В процессе работы наше внимание было остановлено на *Yucca gloriosa* L. – юкки славной, культивируемой в качестве декоративного растения в ботанических садах и парках. Было показано, что растение это содержит стероидные гликозиды в основном одного сапогенина – тигогенина, что уже обеспечивало его выделение без колончатого хроматографирования и направили исследования для выявления возможности его использования в синтезе стероидных препаратов.

Работы велись в двух научных учреждениях: во ВНИХФИ и в Институте фармакохимии АН Грузии. Во ВНИХФИ Натальей Ивановной Меньшовой, Галиной Семеновной Гриненко и др. Совместно с Институтом фармакохимии, тигогенин был превращен в ключевые продукты синтеза – в ацетат 5 $\alpha$ -прегн-16-ен-3 $\beta$ -ол-20-она и ацетат 5 $\alpha$ -андростанол-3 $\beta$ -ол-17-она.

На Московском химико-фармацевтическом заводе «Акрихин» тигогенин успешно был превращен в ключевые продукты синтеза стероидных препаратов в производственном масштабе. Из них синтезированы метандростенол и дигидротестостерон.

Книга состоит из четырех глав – исследования по синтезу стероидных препаратов из тигогенина, проведенные за последние 25 лет; установления оптимальных условий получения тигогенина из сырья; обеспечения прочной сырьевой базой его производства; и наконец, изучения химического состава отдельных вегетативных органов юкки славной, интродуцированной в Грузии.

В книгу включены как неопубликованные, так и опубликованные в различных периодических изданиях материалы. Мы сочли целесообразным сконцентрировать их, дать соответствующие разъяснения, наметить пути дальнейших исследований и использования полученных результатов.

**Э. П. Кемертелидзе**

## Глава 1. Исследование по синтезу стероидных препаратов из тигогенина

Нет ни одной функции человеческого и животного организма, в регуляции которой в той или иной степени не участвовали бы стероидные гормоны. Они играют важную роль во всех жизненных процессах организма, на всех стадиях его развития: размножение, рост, старение, кровообращение, пищеварение, в особенности обмен веществ. Все эти процессы направляются, регулируются, стимулируются стероидными гормонами, находящимися в плотной взаимосвязи с другими гормонами, деятельностью коры головного мозга и центральной нервной системы [1].

Структура стероидов представляет собой конденсированную систему циклопентанопергидрофенантрена, в которой объединены четыре кольца – три шестичленных (A, B, C) и одно пятичленное (D) (рис. 1.1). Эта система называется «стероидным скелетом», поскольку она характерна для всех стероидов [1-3].

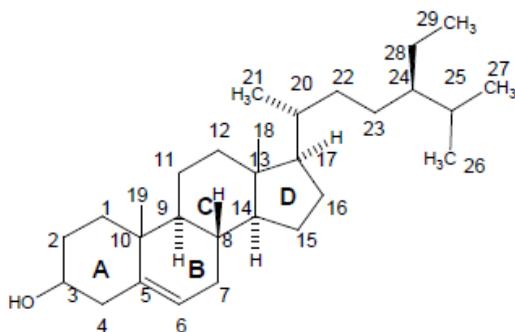


Рис. 1.1.  $\beta$ -ситостерин

В настоящее время основным стероидным сырьем являются стерины растительного - фитостерины (ФС) и животного - холестерин (ХС) происхождения. Большинство

фармацевтических гигантов в области производства стероидных препаратов, такие как Upjohn, Serl (США), Schering (Германия), Mitsubishi (Японии) и др. используют стерины в качестве сырья для синтеза стероидов.

Поиск рациональных путей синтеза стероидных препаратов из доступных растительных источников - важная и актуальная задача. В связи с этим, большое значение имеет культивируемая в Грузии юкка славная - *Yucca gloriosa* L. многолетнее, морозо- и засухоустойчивое растение и выделяемый из нее тигогенин (**1**), предложенный в качестве отечественного стероидного сырья Институтом фармакохимии им. И.Г. Кутателадзе [4].

Тигогенин является удобным исходным веществом для производства стероидных препаратов ряда  $5\alpha$ -андростана и – прегнана. Среди этого класса соединений синтезированы препараты с противораковой - медротестрона пропионат, анаболической - метандростенолон, станозолон, андрогенной активностью – местеролон, миорелексанты - панкурония бромид, пипекурония бромид, средства для анестезии - рокурония бромид, векурония бромид, альтезин и др.

Тигогенин может быть пригоден также для синтеза групп препаратов, содержащих  $\Delta^{1,4}$ -кетогруппировку; из кортикостероидов это преднизолон, дексаметазон, триамцинолон и т.п. Осуществлен синтез дигидровещества „S“ и дигидро-16-метилвещества „S“. таким образом, решается вопрос получения кортикостероидов, при поиске штаммов для их 11-гидроксирования.

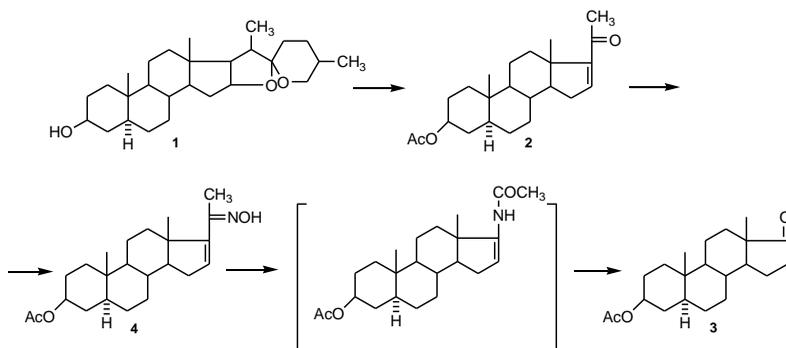
Указанные выше научные исследования синтеза стероидных препаратов на основе предложенного нами нового источника, велись в Институте фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе в тесном сотрудничестве с Всесоюзным научно-исследовательским химико-фармацевтическим институтом, под руководством и непосредственным участием видных ученых: Николая Николаевича Суворова, Михаила Давыдовича Машковского, Владимира Ильича Максимова, Валерия

Ивановича Сладкова, Наталии Ивановны Меньшовой, Галины Семеновны Гриненко. Результаты исследования публиковались в совместных статьях. За коллегиальное научное сотрудничество остаемся им искренне благодарны.

После 1992 года научные исследования по синтезу стероидных препаратов из тигогенина проводились в Институте фармакохимии И. Г. Кутателадзе авторами предложенной книги, некоторые итоги которых приводятся в данной главе и будут продолжены для дальнейшего развития этого направления.

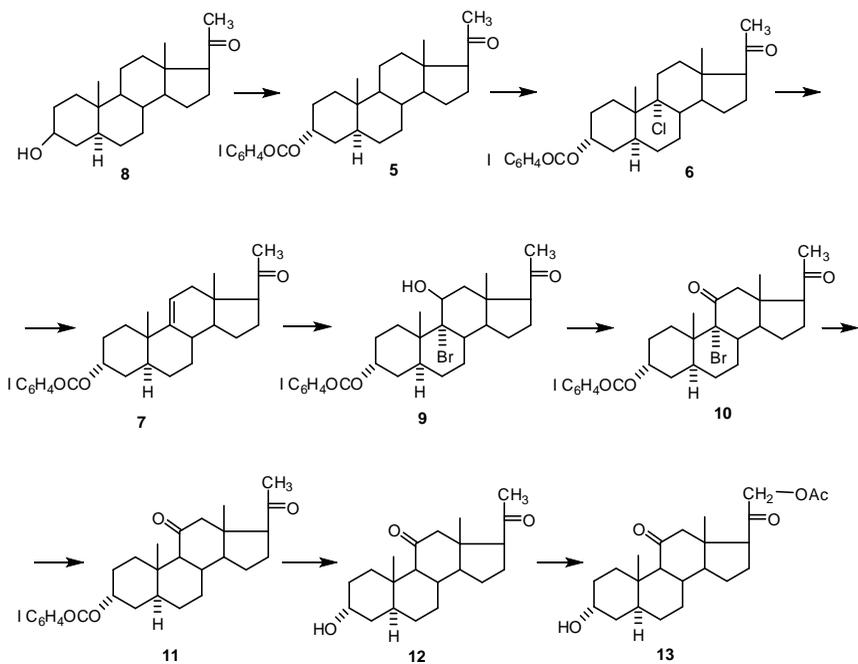
Сотрудниками института разработаны методы превращения тигогенина в ацетат прегненолона (2). Ацетализ тигогенина путем нагревания его в автоклаве в смеси уксусного ангидрида и уксусной кислоты (3:1), последующее окисление по 20(22)-двойной связи и отщепление 16 $\beta$ -эфирной группировки дает [5] ацетат прегненолона (2), с выходом 64%. По другой методике [6] выбрана окислительная деградация спирокетальной части тигогенина с использованием в качестве катализатора  $TiCl_4$ , исключая стадия автоклавирования и позволяющая проведение синтеза стероида (2) в одну стадию, при этом выход составляет 69.5%. По методу [7], также исключая стадию автоклавирования, в качестве катализатора применен  $NH_4Cl$ .

Далее разработан метод перехода ацетата прегненолона (2) в ацетат андростанолон (3), по классической схеме Шмидта-Томе, с выходом 78%, по которой оксим ацетата прегненолона (4) претерпевает бекмановскую перегруппировку [8].

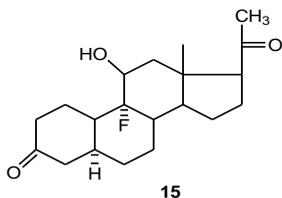
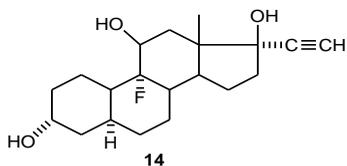


Производственные схемы синтеза кортикостероидов включают микробиологическую стадию 11-гидроксилирования. Однако микробиологические процессы в органическом синтезе достаточно трудоемки.

5 $\alpha$ -Конфигурация тигогенина, следовательно и продуктов его превращения, позволяет осуществить селективную функционализацию дезактивированных центров, в том числе и С-9 положения, по методу Бреслоу [9]. Указанный метод включает свободнорадикальное хлорирование по 9 $\alpha$ -положению 3 $\alpha$ -м-йодбензоилокси замещенного стероида (**5**) и последующее дегидрохлорирование соединения (**6**), приводящее к 9(11)-олефину (**7**). Исследована [10] возможность превращения стероида (**8**), полученного из тигогенина (**1**), химическим способом в 9(11)-ненасыщенное соединение (**7**) и при исключении микробиологического метода 11-гидроксилирования, разработана новая схема синтеза компонентов известного анестезирующего препарата „альтезин» [11] (через стадии образования стероидов (**9-11**), представляющих собой смесь 3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\alpha$ -прегнан-11,20-диона (**12**) и 21-ацетокси-3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\alpha$ -прегнан-11,20-диона (**13**) в соотношении 3:1.



9(11)-Олефин (**7**) в дальнейшем также можно использовать в качестве ключевых продуктов в синтезе [12] высокоактивных 9 $\alpha$ -фторированных стероидов, в том числе и кортикостероидов. В этом случае нет надобности проводить дегидратацию 11-спиртов, получаемых микробиологической функционализацией. Многостадийной модификацией кетонов (**2**) и (**3**) синтезированы новые 9 $\alpha$ -фторпроизводные - 9 $\alpha$ -фтор-17 $\alpha$ -этинил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -триол (**14**) и 11 $\beta$ -гидрокси-9 $\alpha$ -фтор-5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион (**15**) и изучена их тимолитическая и противовоспалительная активность, эксперименты проводились в НИИ технологии и безопасности лекарственных средств (Россия).



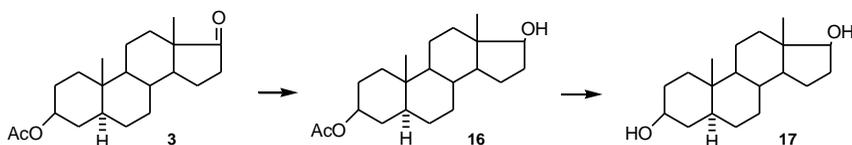
Тимолитическая активность соединений **(14)** и **(15)** оценивалась по степени инволюции тимуса [13], противовоспалительная – по торможению развития воспалительной гранулемы на месте имплантации ватных шариков [14] у адреналэктомированных крыс самцов массой 140-160 г. Вещества вводились подкожно в масляном растворе в течение 4 дней в суточной дозе 10 мг/кг. Оба изученных соединения обладают тимолитическим действием, вызывая снижение массы тимуса на 20%. Вещества **(14)** и **(15)** не обнаружили противовоспалительного эффекта.

Таким образом, впервые осуществлен переход от доступного отечественного стероидного сырья тигогенина к важным полупродуктам синтеза 9(11)-ненасыщенным стероидам 5 $\alpha$ -андростана и 5 $\alpha$ -прегнана с использованием биомиметического метода Бреслоу.

В последние годы в литературе появились работы, посвященные изучению влияния 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диола (3 $\beta$ -Адиол) на рак предстательной железы [15-19]. Доказано, что развитие рака простаты на ранних стадиях зависит от андрогенов и обычно фармакологически модулируется их блокадой [20]. Однако подобная терапия может вызвать андроген-независимый рак простаты, часто характеризующийся увеличенной агрессивностью. Установлено, что 5 $\alpha$ -восстановленное производное тестостерона – дигидротестостерон (ДГТ) ингибирует миграцию раковых клеток с помощью андроген рецептор-независимого механизма. Метаболит ДГТа – 3 $\beta$ -Адиол не связывается с андрогенными

рецепторами, в то же время эффективно связывает эстрогенный рецептор  $\beta$  (ER $\beta$ ) и является мощным ингибитором распространения клеток рака простаты путем активирования ER $\beta$ . Более того, 3 $\beta$ -Адиол, через ER $\beta$ , индуцирует появление белка Е-кадгерина, известного блокатора формирования метастазов при раке груди и простаты [17].

Разработана [21] схема синтеза 3 $\beta$ -адиола (**17**), путем превращения тигогенина (**1**) в ацетат прегненолона (**2**), из него – в ацетат эпиандростерона (**3**), дальнейшее восстановление в 5 $\alpha$ -андростан-17 $\beta$ -ол (**16**) и гидролиз до 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диола (**17**). Выход синтезированного 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диола (**17**) при этом составляет 40.8%.



Среди синтетических биоактивных стероидов важное место занимают азотсодержащие производные (азастероиды), из которых можно отметить amino-, гидросимино-, гидразино-, пиразолинопроизводные.

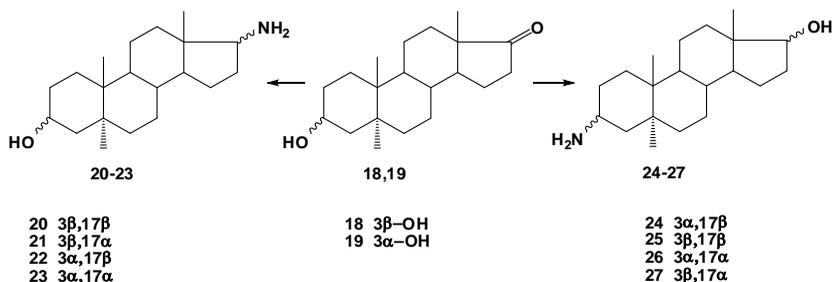
Введение в стероидную молекулу гидроксильных и аминогрупп открывает большие возможности изменения и усиления фармакологической активности природных стероидов. Кемпбел и Виллиамс рекомендовали [22] при сердечных аритмиях 3 $\alpha$ -амино-2 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -андростан-17-он – амефалон. Следовательно, есть все основания полагать, что фармакологические возможности стероидов далеко не исчерпаны и дальнейший поиск биологически активных веществ среди аминоспиртов данного ряда является актуальным.

Аминостероиды 5 $\alpha$ -андростанового ряда, при отсутствии гормональных свойств, проявляют высокую биологическую активность и используются для синтеза производных с разнообразной физиологической активностью,

включая антиаритмические, антидепрессантные и противоопухолевые свойства [22-25].

Из многочисленных радиопротекторов встречаются аминопроизводные природного и синтетического происхождения [26]. Хорошо изучена радиозащитная активность (РЗА) алициклических, ароматических и гетероциклических аминов, аминотиолов и аминоалкилтиосульфатов. Сведения о РЗА стероидных соединений довольно редки и ограничиваются лишь несколькими примерами [27,28].

С целью изучения взаимоотношения структура-активности на основе эпиандростерона (**18**) и андростерона (**19**), продуктов превращения тигогенина, нами были синтезированы [29-32] эпимерные аминоспирты  $5\alpha$ -андростана (**20-27**) [33].



Антиаритмическая активность изучена у крыс самцов массой 160-200 г без наркоза. Аконитиновая аритмия вызвана путем внутривенного введения гидробромида аконитина в дозе 50 мкг/кг. Для характеристики активности вычислена ED<sub>50</sub> в мг/кг. Острая токсичность LD<sub>50</sub> (мг/кг) определена в опытах на интактных белых мышах обоего пола массой 16-18 г. Исследуемые вещества вводились внутривенно или внутрибрюшинно в изотоническом 0.9%-ном растворе хлорида натрия или в виде взвеси с Твином-80. Значение LD<sub>50</sub>(мг/кг) рассчитано по методу [34]. Широта терапевтического действия вычислена как отношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> (табл.1.1).

**Таблица 1.1.** Антиаритмическая активность аминостероидов (20-23, 31, 32, 34-48)

Соединение	ED <sub>50</sub> , мг/кг	LD <sub>50</sub> , мг/кг	LD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub>
<b>20</b>	2.4*(1.03-3.37)	40*(31.64-65.21)	16.6
<b>21</b>	7.4* (4.9-9.9)	56*(46.79-65.21)	7.6
<b>22</b>	27.5(24.85-30.15)	185(145.95-224.05)	6.73
<b>23</b>	неактивно	98(79.65 – 116.35)	-
<b>24</b>	неактивно	>1000	-
<b>25</b>	неактивно	>1000	-
<b>26</b>	неактивно	>1000	-
<b>27</b>	неактивно	>1000	-
<b>31</b>	неактивно	410(314.32 – 505.68)	-
<b>32</b>	неактивно	270(191.9 – 348.1)	-
<b>34</b>	неактивно	270(191.9 – 348.1)	-
<b>35</b>	неактивно	>1000	-
<b>36</b>	неактивно	290(253.4 – 326.36)	-
<b>37</b>	неактивно	650(602.88 – 697.127)	-
<b>38</b>	неактивно	370(277.41 – 462.7)	-
<b>39</b>	3.5*(2.3 – 4.7)	37.0*(28.4 – 45.6)	10.6
<b>40</b>	неактивно	625(512.6 – 737.4)	-
<b>41</b>	неактивно	570(495.41 – 644.59)	-
<b>42</b>	2* (1.38 – 2.62)	42.5*(37.8-47.25)	12.9
<b>43</b>	42.0(20.13-68.87)	355.0(321.81 – 388.19)	8.45
<b>44</b>	26.0(14.29 – 37.71)	115(106.8 – 123.2)	4.42
<b>45</b>	неактивно	100(49.62 – 150.38)	-
<b>46</b>	2.8* (1.92 – 3.68)	36.0*(31.08-40.92)	12.9
<b>47</b>	3.4*(0.69 – 6.11)	17.5*(10.82 – 24.18)	5.15
<b>48</b>	неактивно	88(79.42 – 96.58)	-
Хинидин	3.3*(1.74-4.86)	78*(67.5-88.5)	23.6
Хинидин	14(9.2-18.5)	195(165.11-224.89)	13.9

\*Соединения вводили в вену, в скобках – пределы колебаний.

Изучение антиаритмической активности аминоспиртов (20-27) показало, что при аконитиновой аритмии, из четырех эпимеров 17-амино-5 $\alpha$ -андростан-3-ола (20-23), наиболее

активно предотвращает развитие нарушений ритма сердца  $3\beta,17\beta$ - и  $3\beta,17\alpha$ -стероиды (**20,21**). Изменение конфигурации при С-3 ( $3\alpha,17\beta$ -эпимер) (**22**) приводит к снижению активности, тогда как  $3\alpha,17\alpha$ -производный (**23**) неактивен вовсе. Что касается четырех эпимерных 3-амино-5 $\alpha$ -андростан-17-олов (**24-27**), ни у одного не выявлено наличия значимой антиаритмической активности.

$3\alpha,17\alpha$ -Эпимер (**26**) обладает умеренными радиопротекторными свойствами, а  $3\alpha,17\beta$ -эпимер (**24**) – незначительной активностью (табл.1.2). Остальные соединения неактивны.

РЗА соединений (**24,26**) изучена на белых беспородных мышках-самцах массой 18-20 г, в сравнении с известным радиопротектором мексамином по стандартной методике: острое  $\gamma$ -облучение  $^{137}\text{Cs}$ , мощность 171 рад/мин, доза облучения – 875 рад. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в 1% растворе за 20 мин до облучения. Эффективность соединений определяли по проценту животных, выживших через месяц после облучения (табл.1.2).

**Таблица 1.2.** РЗА аминов (**24, 26**)

Соединение	Доза (1/10 от $LD_{50}$ ) мг/кг	выживаемость, %**
контроль*	0,2 мл	0
<b>24</b>	14.4	10 $\pm$ 3
<b>26</b>	18.1	28 $\pm$ 5 <sup>a</sup>
мексамин	50	95 $\pm$ 2 <sup>b</sup>

\*Контроль – 0.9%NaCl;

\*\*выживаемость на 30-е сутки после облучения. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.001$  по отношению к контролю

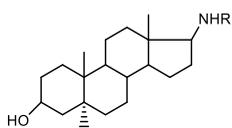
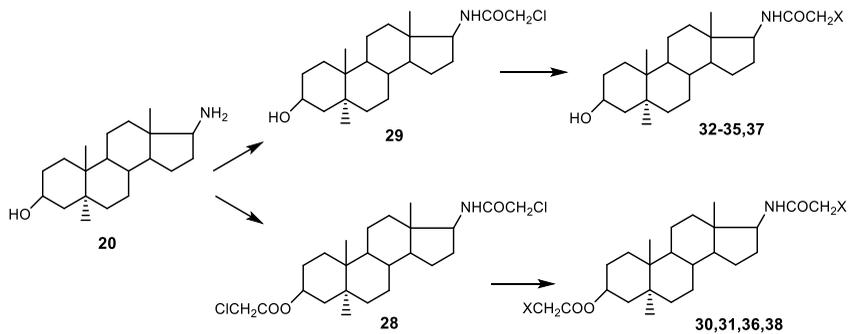
Исследование показало, что диэкваториальная ( $3\beta,17\beta$ ) ориентация гидроксид- и аминогрупп в положениях С-3 и С-17 изомерных 17-амино-5 $\alpha$ -андростан-3-олов (**20-23**) наиболее благоприятна для антиаритмической (соединение **20**), а диаксиальная ориентация ( $3\alpha,17\alpha$ ) 3-амино-5 $\alpha$ -андростан-17-олов (**24-27**) – для радиозащитной активности (стероид **26**).

Помимо этого, на проявление антиаритмической или радиопротекторной активности влияет последовательность замещения amino- и гидроксигрупп в молекуле 5 $\alpha$ -андростана (17 $\beta$ -амино-3 $\beta$ -гидрокси - (20) или 3 $\alpha$ -амино-17 $\alpha$ -гидроксипроизводное –(26).

Далее были синтезированы некоторые аминопроизводные (28-52) и изучена их антиаритмическая активность [35], которая показала (табл. 1.1), что монометилирование 17 $\beta$ -аминогруппы не оказывает заметного влияния на активность (сравни активности соединений 20 и 42, 22 и 44). Превращение первичной 17 $\beta$ -аминогруппы в третичную или четвертичную сопровождается незначительным уменьшением антиаритмической активности (соединения 46 и 47). Введение гидрокси- $\beta$ -этильного звена (соединение 39) сохраняет активность на уровне хинидина, в то время как введение amino- $\beta$ -этильного звена (вещество 41) приводит к ее потере. Несмотря на то, что поиск антиаритмиков осуществляется среди замещенных амидов, пространственно экранированных функциональными группами [36], amino-ацетильные производные 17 $\beta$ -аминостероида (стероиды 31, 32, 34-37) утрачивают способность предотвращать развитие нарушений ритма сердца у крыс.

Хлоркальциевую аритмию вызывали путем внутривенного введения раствора кальция хлорида в дозе 250-300 мг/кг. Соединения вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси с Твином-80 за 15 минут до кальция хлорида. Ни одно из исследованных соединений противоритмического действия не оказывало.

Таким образом, обобщая результаты изучения антиаритмических и радиозащитных свойств восьми изомерных аминоспиртов (20-27), сделаны некоторые выводы о зависимости структуры синтезированных стероидов от проявленной ими биологической активности: наибольшей антиаритмической активностью обладает 17 $\beta$ -амино-5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ол (20), радиозащитной – 3 $\alpha$ -амино-5 $\alpha$ -андростан-17 $\alpha$ -ол (26).



38-41

38 R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

39 R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

40 R = CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>

41 R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

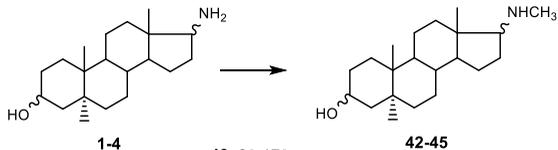
30,32 X = N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>

31,33 X = N

34 X = N

35 X = N

36,37 X = SSO<sub>3</sub>Na

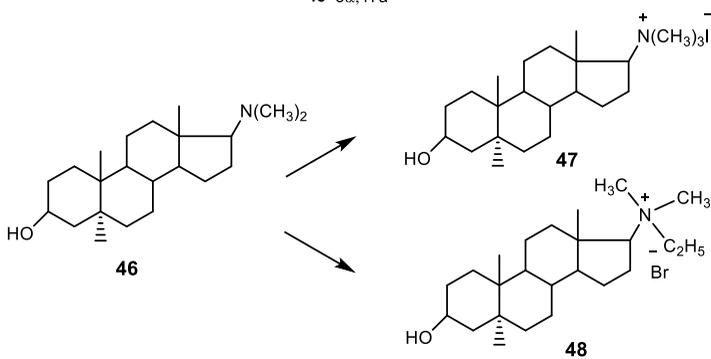


42 3 $\beta$ ,17 $\beta$

43 3 $\beta$ ,17 $\alpha$

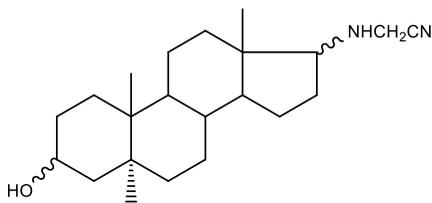
44 3 $\alpha$ ,17 $\beta$

45 3 $\alpha$ ,17 $\alpha$



В медицинской практике для общего наркоза находят применение и стероиды прегнанового ряда (виадрил, альфатезин), однако относительно центральной активности аминок спиртов 5 $\alpha$ -андростанового ряда ничего не было известно.

В данном направлении исследованы 4 изомера (**49-52**) [37], с различной ориентацией гидроксиги- и аминогрупп в положении С-3 и С-17.



- 49** 3 $\beta$ ,17 $\beta$
- 50** 3 $\beta$ ,17 $\alpha$
- 51** 3 $\alpha$ ,17 $\beta$
- 52** 3 $\alpha$ ,17 $\alpha$

**49-52**

Исследования проведены (табл.1.3) на белых беспородных мышах-самцах весом 18-20 г по показателям общего действия, влияния на спонтанную локомоцию, гипноседативное действие (утрата рефлекса переворачивания, миорелаксация), противосудорожное (влияние на судороги, вызванные стрихнином, бикукуллином и электрошоком) и антигипоксическое действие (гипоксическая гипоксия в замкнутом пространстве). Соединения вводились как внутрь, так и внутрибрюшинно в дозах 25, 50 и 100 мг/кг в виде взвеси в 1%-ном растворе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) с добавлением Твин-80. При изучении взаимодействия с судорожными средствами соединения вводили за 40-50 мин до стрихнина (1 мг/кг, п/к), бикукуллина (0.45 мг/кг, в/в) и электрошока (МЭШ) (15мА, 100имп/сек, длительностью -0.25 м.сек). Влияние на гипоксическую гипоксию у мышей изучено в дозах 50 и 100 мг/кг, внутрь.

**Таблица 1.3.** Результаты исследования биологической активности на ЦНС эфирных 17-цианометиламино-5 $\alpha$ -андростан-3-олов (**49-52**)

Соединение	Гипноседативное действие			Влияние на судорожное действие			Антигипоксическое действие ЭД <sub>50</sub> по увеличению продолжительности жизни	Острая токсичность ЛД <sub>50</sub> (мг/кг, внутрь)
	Липолокомпозиция через 30 мин (% к контролю 100%)	Удержание на вращающемся стержне, ЭД <sub>50</sub> (мг/кг, внутрь)	Утрата рефлекса переворачивания в теч. 20 сек, ЭД <sub>50</sub> (мг/кг, внутрь)	Стрихнина (1 мг/кг, п/к) ЭД <sub>50</sub> по предупред. дению тонической фазы судорог	ЭД <sub>50</sub> по предупред. ждению гибели (0,45 мг/кг, в/в)	Макс. Электрошока ЭД <sub>50</sub> по предупред. тонической фазы		
<b>49</b>	75	35 (41.4 – 28.6)	50 (62.5 – 37.5)	28 (34.3 – 21.9)	35 (43.5 – 26.5)	50 (65 – 35)	55 (63 – 47)	1000
<b>50</b>	50	>50	>100	64 (71.5 – 56.5)	>50	отсутствует	>100	750
<b>51</b>	50	50 (41.8 – 58.2)	>100	56.2 (62.3 – 50.1)	>50	100 (80 – 120)	>100	750
<b>52</b>	75	40 (46 – 34)	68 (79.3 – 56.7)	32 (39.2 – 24.8)	40 (47.2 – 32.8)	75 (87 – 63)	60 (53 – 67)	1000
Конвулкс	50	45 (51.3 – 38.7)	82 (94 – 70)	30 (38.2 – 22.8)	47 (54 – 40)	50 (62.3 – 38.7)	Не изучен	700

В результате показано, что соединения (**49-52**) в дозах, начиная с 25 мг/кг, внутрь оказывают депримирующее действие на центральную нервную систему. В зависимости от дозы отмечается седативный, гипноседативный и гипнотический эффект. Так, в интервале доз 25-50 мг/кг выявлен гипноседативный эффект, а свыше 50 мг/кг – увеличивается число животных (от 50 до 80%) с гипнотическим эффектом (свыше 2-х часов). Параллельно у животных проявляются атаксия (нарушение координации), мышечная релаксация, гиподинамия, нарушение группового поведения. По выраженности гипноседативного, противосудорожного и антигипоксического действия соединения (**49-52**) показаны в следующей последовательности: (**49**), (**52**), (**51**), (**50**).

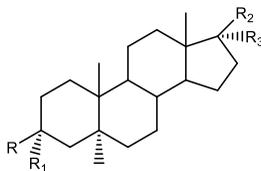
Сравнительные исследования с противосудорожным средством конвулексом (вальпроевая кислота), со сходным центральным депримирующим эффектом, показали близость фармакологической активности соединений (**49**), (**52**).

По острой токсичности величины ЛД<sub>50</sub> (по Керберу) соединения (**49-52**) сопоставимы с конвулексом и они могут быть отнесены к группе веществ со средней токсичностью.

Таким образом, в ряду производных андростана впервые обнаружена психотропная активность преимущественно центрального депримирующего плана. По отношению к судорожным средствам – стрихнину, бикикуллину, а также по защите от МЭШ указанные соединения проявляют свойства глициновых агонистов и ГАМК-миметических веществ, характерных для противосудорожных средств. Указанные соединения могут представить интерес в качестве потенциальных противосудорожных средств, а при растворимости и для наркоза.

Продолжая изучение взаимоотношения структура-активности, синтезированы некоторые производные 17β-амино-5α-андростан-3β-ола (**53-61**) [38]. Исследования их общенаркотической активности показали, что гидрохлориды аминостероидов (**59**) и (**61**) в дозах 200 и 100 мг/кг внутрь

вызывают изменение в общем состоянии и поведении животных. Соединение (**59**) вызывало у мышей успокоение, снижение ориентировочно-исследовательской активности, уменьшение числа взаимодействии между животными в группе, разобщение, нарушение периодичности в смене циклов активности и покоя. Через 20 минут после введения внутрь спонтанная активность составляла 50% по сравнению с контрольным уровнем. Продолжительность эффекта составляла свыше 2-х часов. Продолжительность бокового положения у мышей до 15 минут (контроль - 3 мин). В отличие от стероида (**59**) соединение (**61**) в дозе 100 мг/кг внутрь вызывало судороги у мышей по типу коразоловых.



53-61

53 R= OH, R<sub>2</sub>=NHCOOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H

54 R=OCOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=NHCOOCH<sub>3</sub>

55 R=OH, R<sub>3</sub>=NHCOOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H

56 R=OCOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H R<sub>3</sub>=NHCOOCH<sub>3</sub>

57 R=R<sub>3</sub>=H, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=NHCOOCH<sub>3</sub>

58 R<sub>1</sub>=OH, R<sub>3</sub>=NHCOOCH<sub>3</sub>

59 R=OH, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=(CH<sub>3</sub>)NCH<sub>2</sub>CN

60 R=OCOCH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sup>-</sup>, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=(CH<sub>3</sub>)NCH<sub>2</sub>CN

61 R=OH, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=(CH<sub>3</sub>)NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CN

Изучение общего действия показало, что за исключением соединения (**59**), ни один из исследованных стероидов не обнаружил седативных и гипнотических свойств. (Только соединение (**59**) обладает способностью потенцировать снотворное действие).

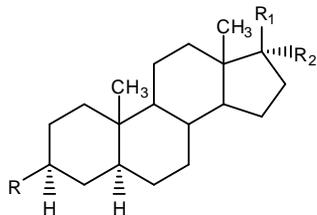
Из 9 производных 5α-андростана (**53-61**) большинство не обладало влиянием на ЦНС животных по показателям центрального депримирующего, анксиолитического и противосудорожного действия.

По всей видимости модификация структуры аминоканноаностанов путем присоединения в положение С-3 триметиламиноацильной группы (соединение **(60)** – растворимый аналог соединения **(59)**), либо ацилирование по С-3 (соединения **(54)** и **(56)**) не приводит к усилению влияния на ЦНС. В то же время присоединением к N-метильной группе при С- 17-аминометиламиноцианометильной цепи (стероид **(61)**) увеличивает токсичность и противосудорожное действие.

Продолжая поиск новых биоактивных аминоканноаностероидов, модифицированием эпиандростерона (**(18)**), синтезированы 5 $\alpha$ -андрост-2-ен-17-он (**(62)**), 17-гидроксимино-5 $\alpha$ -андрост-2-ен (**(63)**), а из них 17 $\beta$ -амино-, 17 $\alpha$ -амино-5 $\alpha$ -андрост-2-ены (**(64)**), (**(65)**) и некоторые производные 17-аминоканноаностероидов (**(42)**, **(53-56)**, **(66)**, **(67)**) [39-41]. С целью выяснения противоопухолевой активности Национальным Институтом Рака (Drug Synthesis and Chemistry Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) стероиды **(42)**, **(54)**, **(56)**, **(63)**, **(64)**, **(66)**, **(67)** протестированы на наличие противоопухолевой активности на 60 линиях раковых клеток.

Протокол исследования предусматривал определение жизнеспособности клеток по тесту реакции сульфородамина В с белками при 48-часовой инкубации с исследуемыми соединениями. Все соединения исследовались как минимум в пяти различных концентрациях (от  $1 \times 10^{-4}$  моль до  $1 \times 10^{-8}$  моль) с последующим 10-кратным разведением [42,43]. Эффективность соединений определялась по следующим параметрам: GI<sub>50</sub> (концентрация исследуемого вещества (КИВ), вызывающая снижение общего количества белка на 50%), TGI<sub>50</sub> (КИВ, вызывающая 50%-ное подавление роста клеток), LC<sub>50</sub> (КИВ, вызывающая уменьшение концентрации белка в конце эксперимента на 50% от таковой в его начале). Четыре из семи исследованных соединений: 3 $\beta$ -метоксикарбонилокси-17 $\beta$ -метоксикарбамоил-5 $\alpha$ -андростан (**(54)**), 3 $\beta$ -гидрокси-17 $\beta$ - (N-метил-N-аминоэтиламино) -5 $\alpha$ -андростан (**(67)**), 17-гидроксимино-5 $\alpha$ -андрост-2-ен (**(63)**) и 17 $\beta$ -амино-5 $\alpha$ -

андрост-2-ен (**64**) проявили выраженную противоопухолевую активность в отношении некоторых линий раковых клеток.



3-11

20, R= OH, R<sub>1</sub>= NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>= H

21, R= OH, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= NH<sub>2</sub>

42, R= OH, R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>N, R<sub>2</sub>= H

53, R= OH, R<sub>1</sub>= NHCOOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H

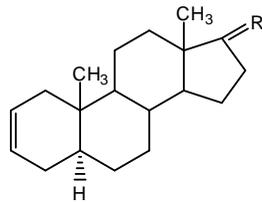
54, R= OCOOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>= NHCOOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H

55, R= OH, R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= NHCOOCH<sub>3</sub>

56, R= OCOOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= NHCOOCH<sub>3</sub>

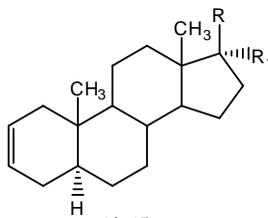
66, R= OH, R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>NCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>=H

67, R= OH, R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>= H



62, R= O

63, R=NOH



64,65

64 R=NH<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>=H

65 R<sub>1</sub>=NH<sub>2</sub>, R=H

24 **Таблица 1.4.** Противоопухолевая активность 5 $\alpha$ -стероидов (**54, 63, 64, 67**)

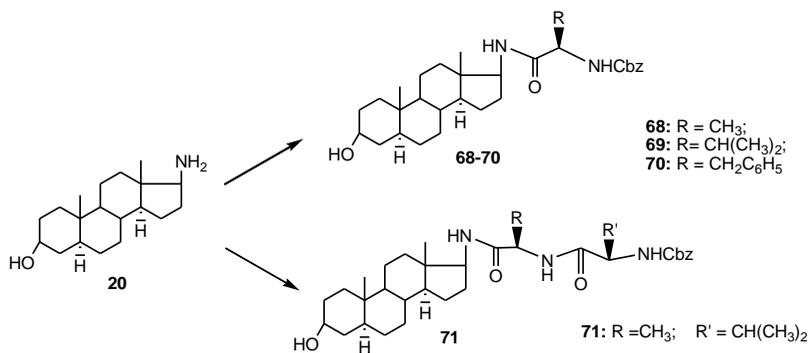
Соединение	Код NSC*	Вид опухоли	Линия клеток	-Log <sub>10</sub> GI <sub>50</sub>	-Log <sub>10</sub> TGI <sub>50</sub>	-Log <sub>10</sub> LC <sub>50</sub>
<b>54</b>	D 737255/1	Лейкемия	RPMI-8226	- 5.20	- 4.56	- 4.00
<b>67</b>	D 737253/1	Рак груди	T-47D	- 5.32	- 4.23	- 4.00
		Лейкемия	K 562 SR	- 5.58 - 5.93	- 4.98 - 5.23	- 4.01 - 4.00
<b>63</b>	D 737245/1	Рак пр. кишки	HT-29	- 6.12	- 4.58	- 4.17
		ЦНС	SF539	- 7.05	- 4.93	- 4.34
		Рак почки	RXF 393	- 6.23	- 5.04	- 4.38
		Меланома	MALME 3M	- 6.09	- 4.68	- 4.33
<b>64</b>	D 737244/1	Рак почки	RXF 393	- 6.72	- 4.98	- 4.38
		Лейкемия	HL60 (ТВ) MOLT 4	- 6.17 - 5.69	- 5.55 - 5.34	- 4.58 - 4.97
		Рак пр. кишки	COLO	- 5.89	- 5.60	- 5.30
			HCC-2998	- 5.79	- 5.52	- 5.25
			HCT-216	- 5.75	- 5.50	- 5.25
			HCT-15	- 5.78	- 5.51	- 5.23
			HT-29	- 5.79	- 5.50	- 5.21
			KM-12 SW-620	- 5.75 - 5.79	- 5.49 - 5.52	- 5.22 - 5.22

Из приведенных данных наиболее интересны показатели 17 $\beta$ -амино-5 $\alpha$ -андрост-2-ена (**64**), оказавшегося одинаково эффективным в отношении всех исследованных линий клеток рака прямой кишки.

Данные биологических исследований дают основания для продолжения поиска эффективных противоопухолевых средств среди аминопроизводных стероидов 5 $\alpha$ -ряда.

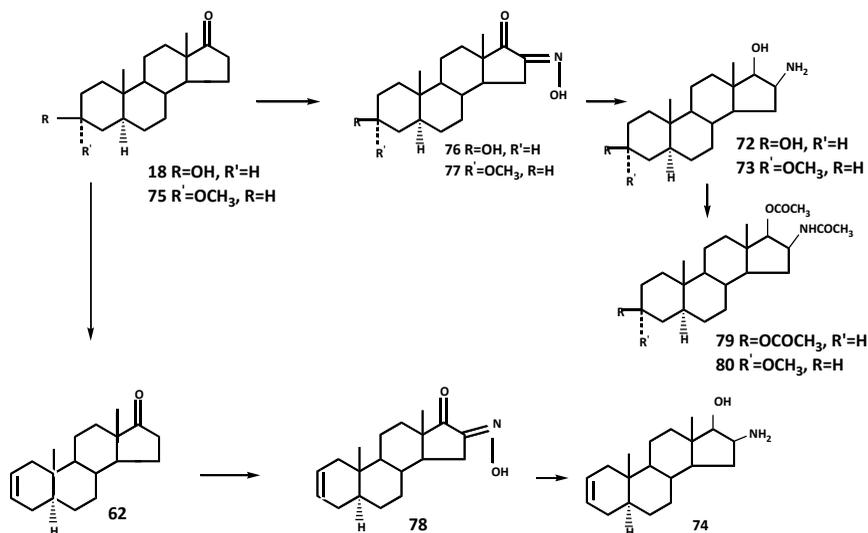
Насыщенные и ненасыщенные 17 $\beta$ -аминостероиды используются как промежуточные соединения для синтеза биологически активных производных [23]. Введением аминокислотных остатков получены пептидные аналоги амидостероидов, среди которых найдены соединения разнообразной физиологической активности, включая антиаритмические и противоопухолевые [44-46].

Для синтеза потенциальных биологически активных амидопроизводных нами изучена реакция N-ацилирования 17 $\beta$ -амино-5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ола (**20**), проявившего антиаритмическую активность. Подобная модификация амефалона - 3 $\alpha$ -амино-2 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -андростан-17-она, обладающего антиаритмической активностью, вызвала уменьшение токсичности последнего [47]. Разработав оптимальные условия реакции ацилирования, синтезированы [48] пептидные производные (**68-71**). Изучение их антивирусной активности проводилось в Национальном институте аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) университета штата Юта, США на клеточной культуре Vero 76 в отношении вирусов Rift Valley fever, Takaribe и Venezuelan equine encephalitis (штаммы MP-12, TRVL-11573 и TC-83, соответственно), значительная противовирусная активность не выявлена ни у одного из них.



С целью изучения влияния положения и конфигурации amino- и гидроксизаместителей на фармакологическую активность синтезированы [32, 49] 16-амино-5 $\alpha$ -андростан-17-олы (**72-74**). Нитрозирование кетонов (**18**), (**62**), (**75**) и дальнейшее стереоселективное гидридное восстановление 16-оксимов (**76-78**) привели к преимущественному образованию 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -аминоспиртов (**72-74**). Из продуктов гидридного восстановления (**72**), (**73**) получены 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диацетокси- и 3 $\alpha$ -метокси-17 $\beta$ -ацетокси-16 $\beta$ -ацетиламино-5 $\alpha$ -андростаны (**79**, **80**).

На основе анализа <sup>1</sup>H ПМР спектров соединений (**72-74**) строгое отнесение конфигурации заместителей при C-16 и C-17 было затруднено, из-за мультиплетного характера сигналов от 16- и 17-протонов. 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -Конфигурация стероидного аминодиола (**72**) установлена на основе данных рентгеноструктурного анализа его 3,16,17 – триацетильного производного (**79**).

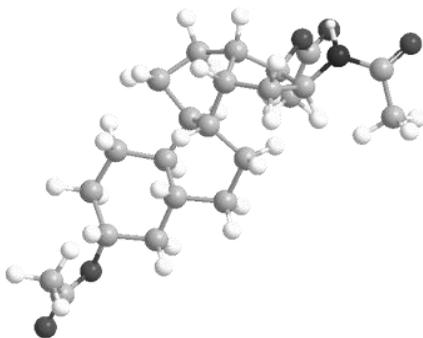


Рентгеноструктурное исследование молекулярной структуры (рис. 1.2) 16β-ацетиламино-3β, 17β-диацетокси-5α-андростана (**79**) показало, что молекула является 16β,17β-изомером. Геометрические параметры стероидного каркаса обычны для стероидов 5α-андростановой структуры: циклы А,В и С молекулы (**79**) имеют конформацию несколько искаженного кресла, цикл D - 13β, 14α-полукресла ( $\Delta C_2^{13,14} 3,7^\circ$ ). Длины всех связей близки к стандартным значениям, лишь незначительно отклоняются от них.

Величина двугранного (торсионного) угла плоскости  $N^{16}C^{16}C^{17}O^{17}$  составляет  $16.9^\circ$ , что доказывает совпадение с теоретическим предсказанием о соотношении между КССВ с величиной  $J_{16N/17H}$  9.27Гц и двугранным углом ( $\varphi$ ) по уравнению Карплуса.

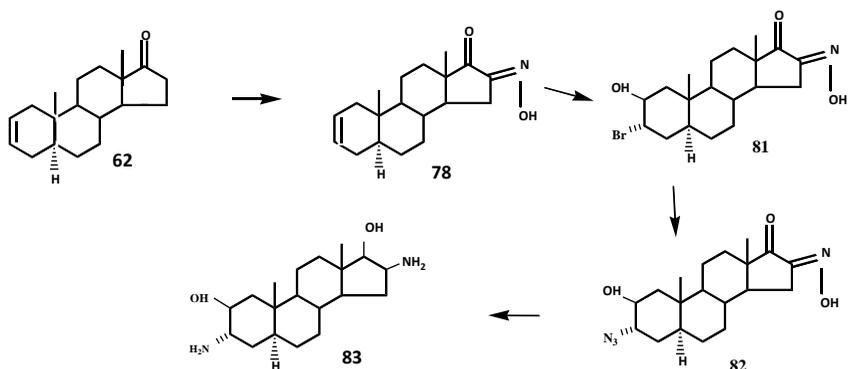
Антиаритмическая активность 3β-гидрокси- и 3α-метокси-16β-амино-5α-андростан-17β-олов **72,73** изучена у крыс самцов массой 160-200 г без наркоза. Соединения вводили внутривенно в изотоническом 0.9 % -м растворе хлорида натрия.

Проведенная работа показала, что при аконитиновой аритмии  $3\alpha$ -метокси- $16\beta$ -амино- $3\beta,17\beta$ -дигидрокси- $5\alpha$ -андростан и его  $3\alpha$ -метилловый эфир (**72,73**), вводимые крысам в виде гидрохлоридов, развитие нарушения ритма сердца не предотвращают.



**Рис. 1.2.** Молекулярная структура  $16\beta$ -ацетиламино- $3\beta,17\beta$ -диацетокси- $5\alpha$ -андростана (**79**).

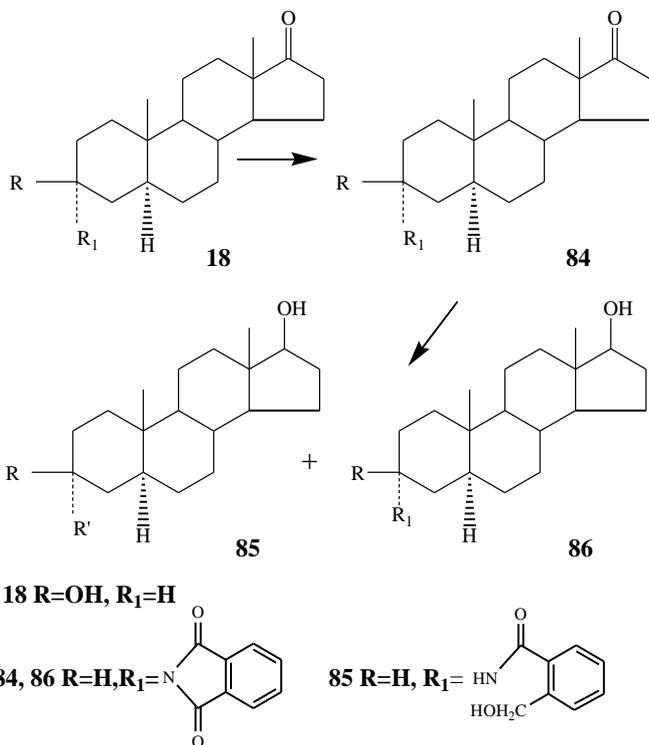
На основе  $5\alpha$ -андрост-2-ен-17-она (**62**) через стадии образования стероидов (**78**), (**81**), (**82**) нами осуществлен синтез [50] неизвестного ранее  $3\alpha,16\beta$ -диамино- $2\beta,17\beta$ -дигидрокси- $5\alpha$ -андростана (**83**), как структурного аналога недеполяризующего миорелаксанта, препарата павулон ( $2\beta,16\beta$ -дипиперидино- $3\alpha,17\beta$ -диацетокси- $5\alpha$ -андростан).



Стереоселективность процессов получения амина (**83**) контролировалась на основе данных  $^1\text{H}$  ПМР спектров, поэтому конфигурации заместителей при С-2 и С-3 не вызывали сомнений; по характеру сигналов  $16\alpha$ - и  $17\alpha$ -протонов при  $\delta$  3.24 м.д. в виде мультиплета соединения (**83**), по аналогии с аминами (**72-74**), показано, что заместители при С-16 и С-17 обладают  $\beta$ -конфигурацией. При этом было учтено доказательство конфигурации  $16\beta$ -ацетиламино- $3\beta,17\beta$ -диацетокси- $5\alpha$ -андростана (**79**) рентгеноструктурным анализом.

Как известно, трифенилфосфин-азодикарбоксилатный метод Мицунобу [51] позволяет в одну стадию стереоселективно синтезировать азотосодержащие соединения из вторичных спиртов. Используя этот метод, с применением фталимида калия, нами синтезированы [32] производные (**84-86**), которые могут представить интерес для дальнейших исследований, как синтетические аналоги известных стероидных алкалоидов.

Как известно, стероидные оксими и их производные проявляют противовоспалительную, противораковую активность [52,53]. В этой связи синтезированы стероидные оксими (**76, 77**) и изучена их противоопухолевая активность на кардиосаркоме Услера оксими [49].

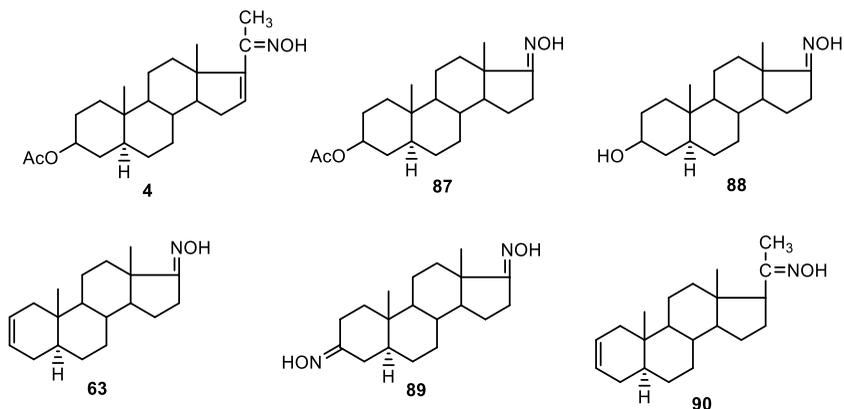


16-Оксими 3 $\beta$ -гидрокси- и 3 $\alpha$ -метокси-5 $\alpha$ -андростан-16,17-дионы (**76**, **77**), вводимые в дозах 25 мг/кг, неактивны. Повышение дозы вызывало острые токсичные явления, что приводило к гибели животных. На саркоме Йенсена соединение (**76**) не оказывало действия, в то время как его 3 $\alpha$ -метилловый эфир (**77**) тормозил рост опухоли на 33 % (ЛД<sub>100</sub> 500 мг) и гибели животных не отмечены.

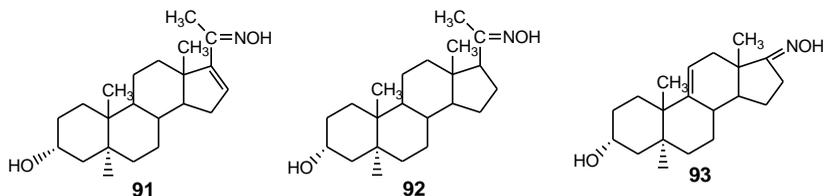
Для оксимов (**4,87-90**) по PASS программе наиболее вероятной оказалась антимикробная, противогрибковая, противовоспалительная и антиатеросклеротическая активность [54].

Аналогично спрогнозированное противовоспалительное действие оксима (**88**) совпало с данными биологического

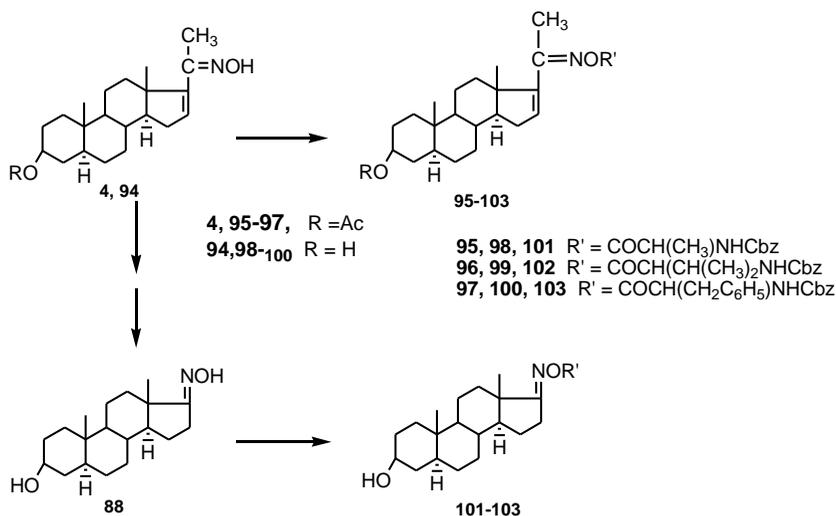
эксперимента, так как этот стероид оказался селективным блокатором фермента циклооксигеназа-2. Остальные оксимы (**4**, **63**, **87**, **89**, **90**) проявили умеренную или низкую активность. Испытания проводились в Германии, в Институте природных соединений и инфекционной биологии им. Ханса Кнолля.



Противоопухолевая активность оксимов (**91-93**) изучена на культуре клеток HeLa, предоставленной Национальной лабораторией клеточных культур Университета Пуна, Индия. Исследованию подверглись соединения (**91-93**). Умеренную активность проявил оксим (**92**), в то время как оксимы (**91**) и (**93**) оказались неактивными [55].



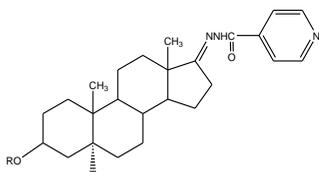
Включение, интересных с фармакологической точки зрения, двух систем в одной молекуле способствует повышению биоактивности. В литературе известны оксимы, модифицированные аминокислотами. Однако нет данных подобной модификации стероидных оксимов. Нами изучена возможность получения пептидных производных  $5\alpha$ -стероидных оксимов, промежуточных продуктов превращения тигогенина. Реакцией O-ацилирования 17-гидроксимино- $5\alpha$ -андростанолонa (**88**), 20-гидроксимино- $3\beta$ -ацетокси- и  $3\beta$ -гидрокси- $5\alpha$ -прегн-16-енолона (**4**) и (**94**) получены [56] соответствующие новые пептидные аналоги (**95-103**).



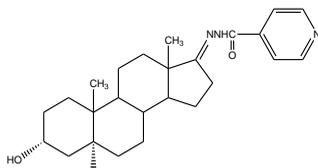
Известно, что изониазид и его производные проявляют высокую антитуберкулезную активность. В их числе оказались и некоторые изоникотиноилгидразоны (ИНГ) ненасыщенных кетостероидов [57-60], но данные о противотуберкулезной активности ИНГ насыщенных кетостероидов в литературе отсутствовали. На основе тигогенина синтезированы [61] ИНГ эпиандростерона (**104**), (**105**), андростерона (**106**), прегненолона (**107**), (**108**), прегнанолонa (**109**), андрост-

2-ен-17-она (**110**). Изучением бактериологической активности стероидов (**104-110**) в *in vitro* эксперименте устанавливалась минимальная подавляющая концентрация (МПДК) в ряду серийных разведений на среде Сотона. В качестве тест-культур были использованы *Mycobacterium tuberculosis* (штаммы: *H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>*, *M. academia*, *M. bovis* 8), условно патогенные микобактерии (штаммы: *M. kansasic*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*), сапрофиты ATCC-607 и *M. phlei*. Испытания показали, что соединения обладают высокой активностью против *M. tuberculosis* и по величине МПК почти равны изониазиду. Так же как и изониазид, они не оказывают существенного влияния на рост условно патогенных и сапрофитных микобактерий. Кроме того, изучалась переносимость соединения (**104**) для белых мышей и его терапевтическая активность при экспериментальном туберкулезе, в сравнении с переносимостью изониазида на белых беспородных мышках-самцах весом 18-20 г. Установлено, что максимально переносимая доза (МПД) составляет для изониазида 125 мг на кг вес тела, а МПК соединения (**104**) - 2000 мг/кг. Также доказано, что хроническое введение соединения мышам, зараженным *M. bovis* 8, в дозах 250-2000 мг/кг, приводит к 100% выживанию подопытных животных, при отсутствии признаков токсического действия вещества. Терапевтическое действие соединения по всем показателям сходно с действием изониазида.

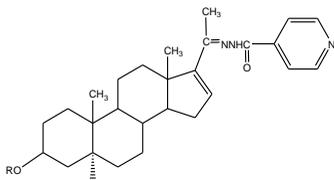
Таким образом, выявлена высокая противотуберкулезная активность изоникотиноилгидразона эпиандростерона и показано, что соединение (**104**) и его аналоги представляют интерес для дальнейшего углубленного изучения в качестве потенциальных противотуберкулезных средств.



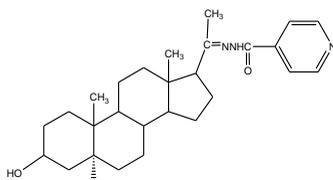
**104 R=H, 105 R=CH<sub>3</sub>CO**



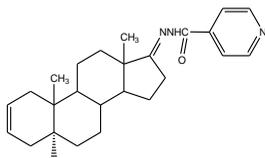
**106**



**107 R=H, 108 R=CH<sub>3</sub>CO**



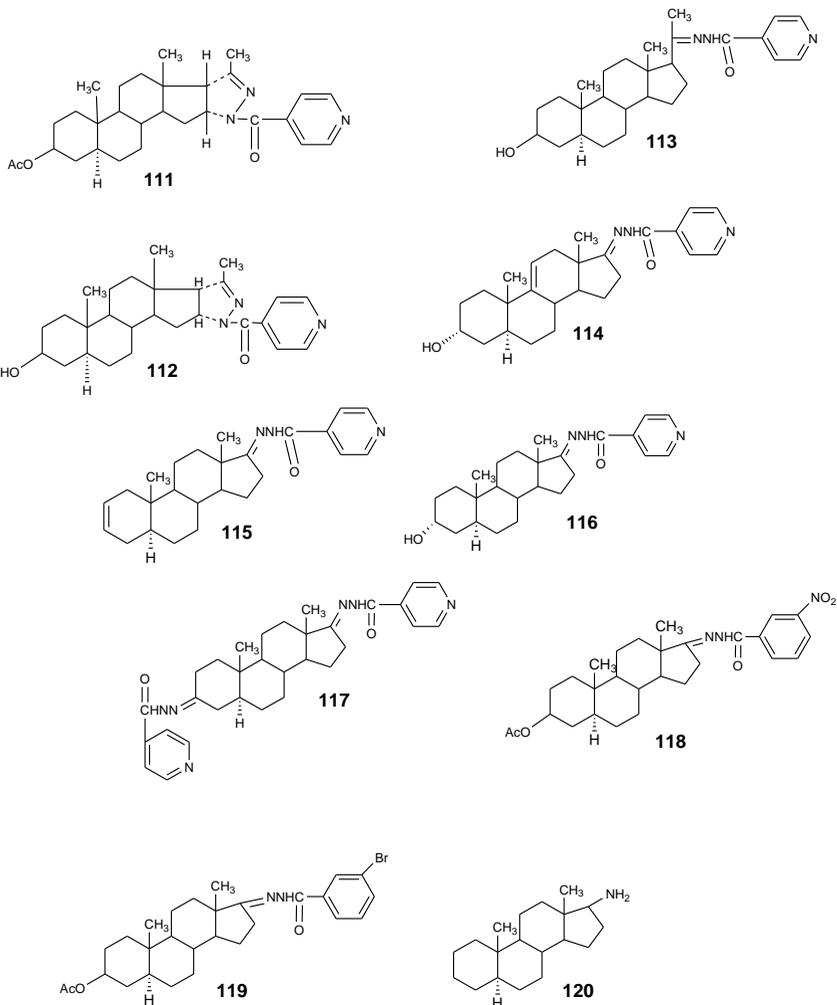
**109**



**110**

Продолжая поиск высокоэффективных противотуберкулезных средств среди стероидов 5 $\alpha$ -ряда, синтезированы новые соединения (**111-120**) [62,63]. Оценка их антимикобактериальной активности (табл.1.5) *in vitro* проводилась в соответствии с программой TAACF, координируемой Southern Research Institute (Birmingham, AL, USA) под руководством National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Первичный скрининг активности соединений в концентрации 6.25  $\mu\text{g/ml}$  в отношении штамма *M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* (ATCC 27294) в среде BACTEC 12B проводился с использованием теста MABA (Microplate Almar Blue Assay). Соединения, проявлявшие в указанной концентрации ингибирующую активность (% инг) <90%, из дальнейшего исследования исключались. На

втором этапе определялась МПК, цитотоксичность в отношении клеток VERO и индекс селективности.



По результатам второго этапа схемы ТААСФ наименьшая МПК (минимальная подавляющая концентрация) была зарегистрирована для ИНГ: **(113)** (0.1 мкг/мл), **(115)** (0.39

мкг/мл), **(116)** (0.39 мкг/мл), **(114)** (0.39 мкг/мл), **(117)** (0.78 мкг/мл) и **(112)** (0.78 мкг/мл). В то же время эти соединения проявили низкую цитотоксичность в отношении клеток VERO, показав хороший индекс селективности  $SI = IC_{50}/MPK > 12$  (Табл.1.5). Несмотря на высокую ингибирующую активность аминостероида **(120)** установить его  $SI$  не представилось возможным из-за проблем с растворимостью (даже в концентрации 1мкг/мл соединение оказалось нерастворимым в DMSO).

**Таблица 1.5.** Антимикобактериальная активность соединений **(111-120)**

Соединение	% Инг <sup>a</sup>	МПК (мкг/мл)	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	SI <sup>б</sup>
<b>111</b>	98	>6.25	6.14	
<b>112</b>	92	0,78	>10.0	>12.82
<b>113</b>	94	0,1	1.97	19.7
<b>114</b>	94	0,39	9,65	24,74
<b>115</b>	98	0,39	>6.25	>160.3
<b>116</b>	94	0,39	>10.0	>25.64
<b>117</b>	92	0,78	>10.0	>12.8
<b>118</b>	20	-	-	-
<b>119</b>	28	-	-	-
<b>120<sup>в</sup></b>	98	1.56	-	-
<b>INH</b>	—	0.025–0.05	>100	

<sup>a</sup> Против M. tbcH<sub>37</sub>Rv в концентрации 6.25 мкг/мл

<sup>б</sup>  $SI = IC_{50}/MPKM.tbc.$

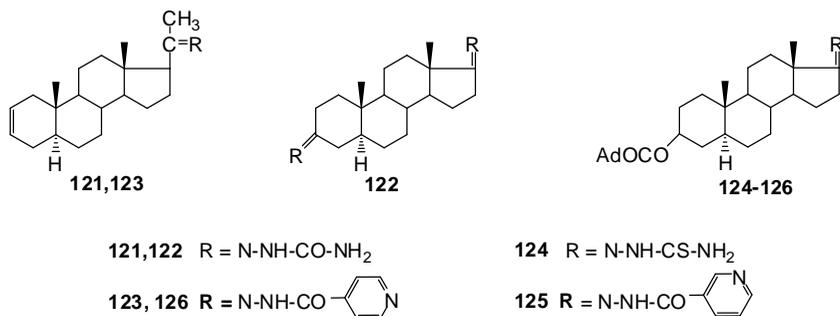
<sup>в</sup>  $SI$  – Не определен из-за проблем с растворимостью

Выявление значимой противотуберкулезной активности некоторых из синтезированных изоникотиноилгидразонов и

аминостероидов создает хорошие предпосылки для их дальнейшей модификации и дает основания считать эти соединения перспективными для создания новых противотуберкулезных средств.

Известно использование в медицинской практике некоторых производных адамантансодержащих карбоновых кислот, в частности 17 $\beta$ -(1-адамантоат)-19-нортестостерона – болманталат, отличающийся глубоким и уникальным анаболическим действием, высокой и длительной миотропной активностью. Доказано, что введение адамантанового фрагмента в молекулу стероида уменьшает андрогенную активность и приводит к появлению новых биологических свойств [64,65].

С целью изучения влияния химической структуры на биоактивность нами синтезированы [66,67] стероиды (**121-123**) и гидразоны (**124-126**), модифицированные ядром адамантана, эпиандростерона.



Противотуберкулезную активность изучали по программе ТААСФ (USA) по выявлению новых противотуберкулезных средств. Первичный скрининг соединений (**121-126**) в отношении штамма *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в среде ВАСТЕС 12В провели с использованием микропланшетного теста МАВА [68]. В исследованиях *In vitro*

установлена низкая ингибирующая активность гидразонов (**124-126**) в концентрации 6.25 мкг/мл и неактивность соединений (**121**), (**122**). Стероид (**123**), проявивший высокую активность, отобрали для последующего исследования в меньших концентрациях относительно того же штамма. Данные противотуберкулезных испытаний соединений (**121-126**) приведены в табл.1.6.

**Таблица 1.6.** Противотуберкулезная активность гидразонов (**121-126**)

<i>Соединение</i>	<i>Ингибирование*, %</i>	
	<i>I этап</i>	<i>II этап</i>
<b>121</b>	16	
<b>122</b>	0	
<b>123</b>	96	96
<b>124</b>	35	
<b>125</b>	49	
<b>126</b>	41	

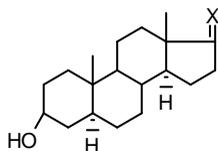
\*Минимальная ингибирующая активность у соединений (**121**), (**123**), (**124-126**) была > 6.25 мкг/мл, у (**123**) < 6.25 на I этапе и < 0.1 мкг/мл на II этапе.

Соединения, проявившие на I этапе ингибирующую активность <90%, в дальнейшем из исследования исключались. На II этапе стероид, проявивший анти-ТБ активность, исследован по отношению к тому же штамму *Mycobacterium tuberculosis*. Как выяснилось, модификация эпиандростерона адамантаном не привела к улучшению антитуберкулезной активности (стероиды **104** и **126**).

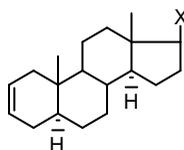
Широкий спектр биологического действия стероидов и их производных делает эти соединения перспективными для поиска новых эффективных лекарственных средств. Учитывая высокую антибактериальную, противовирусную, противоопухолевую активность гидразоно-, amino- и амидопроиз-

водных ряда андростана, эстрана и холестана [69-74], расширение круга их синтетических аналогов даст возможность обнаружения новых биологических свойств.

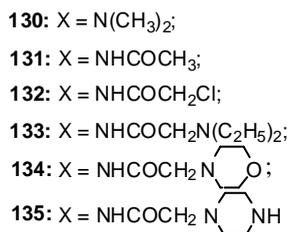
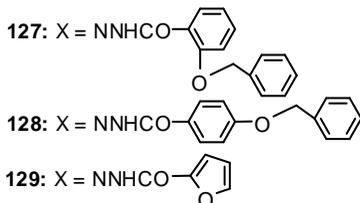
С целью изучения противовирусной активности синтезированы некоторые гидразино- и амидопроизводные 5 $\alpha$ -андростана (**127-135**) [75].



**127-129**



**130-135**



Изучение противовирусной активности стероидов (**127-135**), проводимое в NIAID университета штата Юта (США), показало, что соединение (**128**) обладает высокой, а гидразоны (**127**) и (**129**) – средней противовирусной активностью в отношении Poliovirus (клеточная культура Vero 76, штамм Type 3, WM-3); остальные стероиды (**130-135**) неактивны. В отношении Venezuelan equine encephalitis virus (клеточная культура Vero, штамм TC-83) стероиды (**130**) и (**131**) проявили среднюю, а в отношении Sars coronavirus (клеточная культура Vero-76, штамм Urbani) амид (**135**) – слабую активность; все остальные соединения неактивны. В отношении Rift Valley fever virus (на клеточной культуре Vero 76, штамм MP-12) – только гидразон (**128**), а в отношении

Respiratory syncytial virus (клеточная культура MA-104, штамм А-2) – и гидразон (129) проявили слабую активность. В отношении Influenza A virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, Takaribe virus и Dengue virus (клеточные культуры MDCK, Vero, Vero 76; штаммы California 07.2009; TRVL-11573; Type-2, New Guinea C; соответственно) соединения (127)-(135) оказались неактивны.

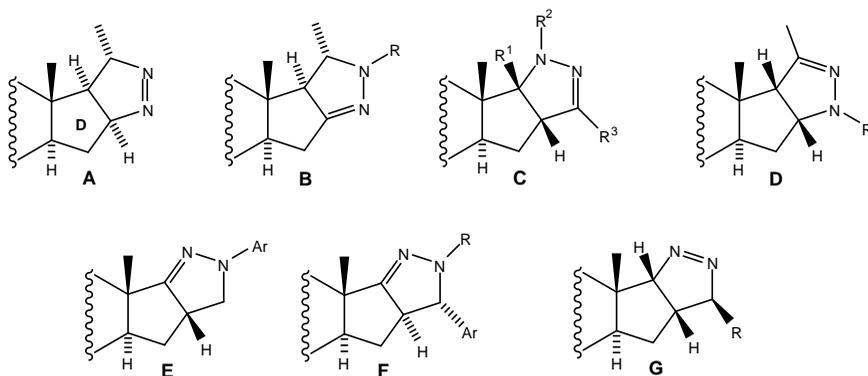
Синтетические стероиды, конденсированные с гетероциклическими соединениями, особенно широко исследованы в 60-80-х годах прошлого столетия. В это время были выявлены основные закономерности соотношений между структурой молекулы стероида и ее физиологическими функциями, что привело к созданию целого ряда препаратов широкого спектра действия [76-78].

Особое место занимают стероиды, конденсированные с гетероциклами по положениям 16,17 кольца D, интенсивное развитие химии которых отмечено в 90-х гг. XX века [79].

Производные стероидов этого ряда не утратили актуальность и по сей день. Интерес к этому классу соединений вызваны их уникальными биологическими свойствами. Помимо высокой гормональной, они проявляют и высокую антимикробную активность, являются антиоксидантами, повышают иммунитет, нормализуют давление и уровень холестерина в крови [80-84]. Количество работ, посвященных синтезу аннелированных гетероциклами стероидов, постоянно увеличивается.

Среди стероидов, конденсированных пятичленными гетероциклами, наиболее исследованы производные пиразола и дигидропиразола (пиразолина) в связи с их высокой биоактивностью. Предполагают [83], что гетероцикл, содержащий богатый электронами атом азота, играет важную роль в проявлении высокой биоактивности этих соединений.

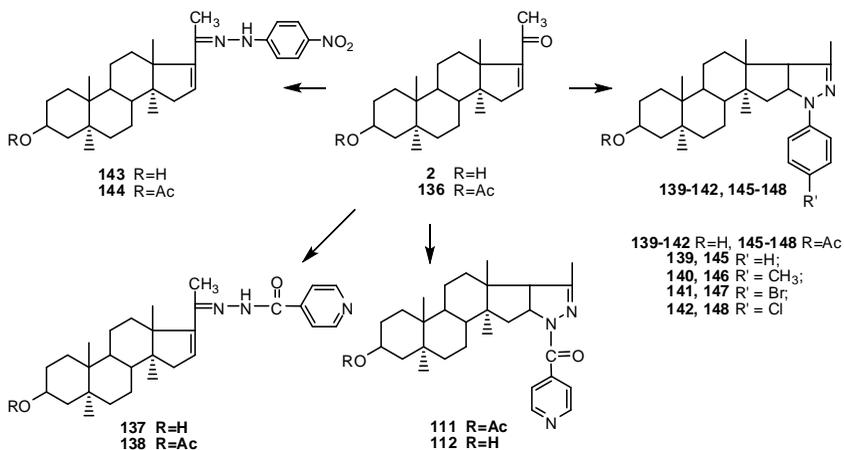
Пиразолины, конденсированные со стероидным скелетом по положениям 16,17 кольца D, можно разделить на [16,17-c]- (**A,B**), [16,17-d]- (**C**), [17,16-d]- (**D**) и [17,16-c]- типами сочленения (**E-G**).



Стероидные пиразолины также привлекают внимание как полезные синтоны в органической химии и служат предшественниками для получения пиразольных производных.

К сфере нашего интереса относятся стероидные [17,16-d] пиразолины, синтезированные на основе прегненолонов (**2**), (**136**), легкодоступных для нас исходных соединений. Сотрудниками нашего института была изучена [63,85] кислотнокатализируемая реакция конденсации кетонов (**2**), (**136**) с некоторыми гидразинами и гидразидами карбоновых кислот.

При реакции конденсации стероидного  $\alpha$ -енона с гидразинами и гидразидами карбоновых кислот при 20°C, на первой стадии образуются промежуточные гидразоны, которые при нагревании легко циклизуются в пиразолины [63,84,86,87]. Такие гидразоны (**137**), (**138**) были выделены нами [63] при взаимодействии кетонов (**2**), (**136**) с гидразидом изоникотиновой кислоты при 20°C, в процессе кипячения реакционной массы наблюдали образование соответствующих циклизированных продуктов – пиразолинов (**111**), (**112**).

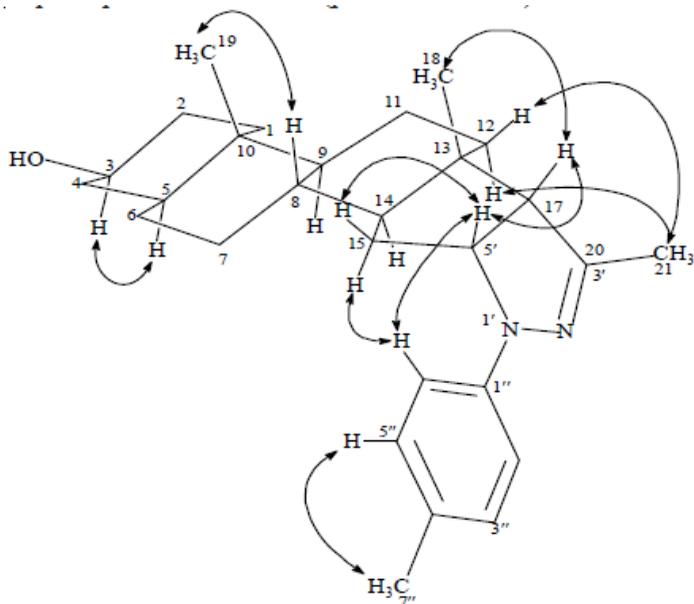


Также обнаружено, что некоторые ацилгидразоны  $\Delta^{16}$ -кетостероидов вообще не образуют пиразолинов [87]. Для соединений (**139-142**) нам не удалось выделить такие промежуточные гидразоны [85]. Очевидно, в этих случаях циклизация протекает спонтанно при комнатной температуре уже в момент образования гидразонов и идет до конца при кипячении реакционной смеси. Как известно, незамещенные алкил-, арил-, ацилгидразоны  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных соединений претерпевают внутримолекулярную циклоконденсацию, протекающую благодаря нуклеофильному присоединению NH-фрагмента по кратной связи. В большинстве случаев пиразолины получают непосредственно из производных гидразина и  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных альдегидов и кетонов без выделения гидразонов [88].

При кипячении смеси кетона (**2**) или (**136**) с *n*-нитрофенил гидразином в этаноле образовались гидразоны (**143**) или (**144**), которые не циклизовались в пиразолины. Легкость замыкания пиразолинового цикла зависит от природы заместителя в гидразонном остатке. Как ожидалось [88], протеканию реакции циклизации способствует наличие электронодонорных заместителей при аминном атоме гидразина

(пиразолины **139-142**), тогда как электроноакцепторный заместитель мешает этому процессу (гидразоны **143,144**).

Строение стероидов (**139**)-(**142**) и (**145**)-(**148**) доказано с помощью ИК-, ЯМР- и масс-спектров. Строение пиразолинов также установили при помощи одномерной и двумерной методик спектроскопии ЯМР на примере соединения (**140**) (рис.1.3 ).



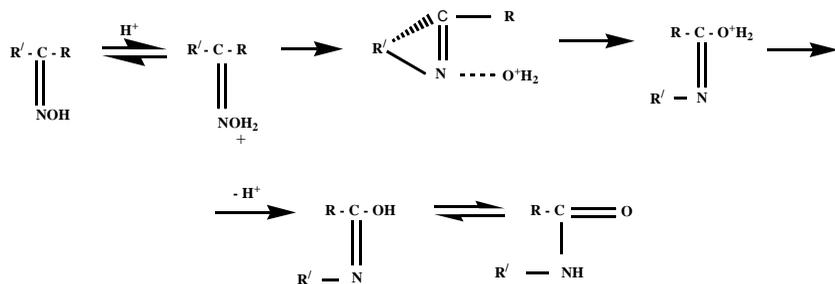
**Рис. 1.3.** NOESY– Взаимодействия в соединении (**140**)

В  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY-спектре пиразолина (**140**) отсутствовала корреляция между протоном H-14 и протонами H-16 и H-17, отмечена корреляция между протоном H-16 и протонами H-15 $\beta$ , H-17, а также между протонами H-17 и H-18. Анализ двумерного спектра  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY позволил установить пространственно сближенные протоны. Учитывая литературные данные [86] и сопоставляя их с полученными результатами, можно предположить, что гетероцикл в соединении (**140**) имеет 17 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -конфигурацию.

Изучение антивирусной активности стероидов (137), (141), (142), (146) показало, что соединения (141), (137) обладают средней, а пирозолин (142) – слабой противовирусной активностью в отношении Poliovirus (клеточная культура Vero 76, штамм Type 3, WM-3). В отношении Rift Valley fever virus (клеточная культура Vero 76, штамм MP-12) соединения (137), (142) проявляют слабую активность. В отношении Sars corona virus (клеточная культура Vero 76, штамм Urbani) и Takaribe virus (клеточная культура Vero, штамм TRVL-11573) все соединения неактивны.

В настоящее время фармакологическая значимость азотсодержащих D-гомостероидов подвергается широкому изучению, о чем свидетельствует возрастающее с каждым годом количество публикаций. Среди соединений этого класса выделяются стероиды с противоопухолевой активностью [89-91].

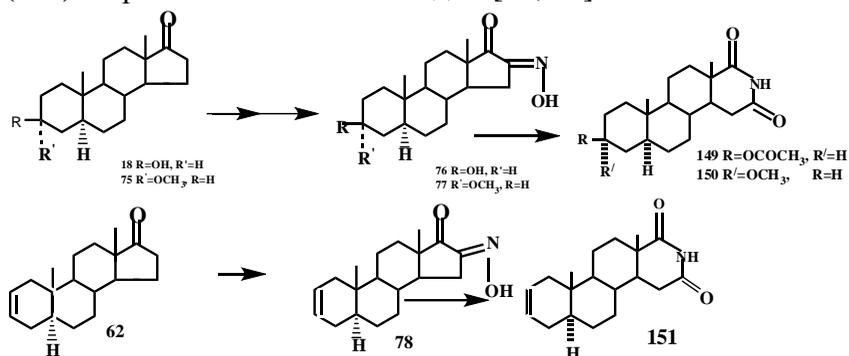
Литературные данные показали, что синтез этих соединений представляет собой сложный путь превращений. Из известных методов получения D-гомостероидов, можно выделить трансформирование (модифицирование) D-кольца 5 $\alpha$ -андростановой структуры, что легко достигается путем реакций внутримолекулярной перегруппировки, в частности, в приложении к ряду стероидных кетоксимов, для перехода от



соединений 5 $\alpha$ -андростановой структуры к структуре D-гомоандростанового ряда и получения азотсодержащих гете-

роциклических стероидных соединений, бекмановская перегруппировка открывает большие возможности. Реакция привлекает внимание своей простотой с синтетической точки зрения и высокой селективностью. Процесс проходит по механизму кислотного катализа.

С целью поиска потенциальных высокоэффективных соединений в этой серии, мы синтезировали новые производные  $5\alpha$ -D-гомоандростана на основе тигогенина **1**, который нами был трансформирован в кетоксимы (**149**), (**150**), (**151**) по ранее описанным методам [49, 92].



В синтезированных соединениях (**149-151**) трансформация D-ядра может оказать положительное влияние на биологическую эффективность, что может подтвердиться соответствующими фармакологическими исследованиями. Кроме того, на основе соединений (**149-151**) может быть осуществлен синтез новых производных D-гомо андростанового ряда.

Таким образом, проведенная работа показывает перспективность поиска новых сердечно-сосудистых, психотропных, противотуберкулезных, противовирусных и противоопухолевых препаратов среди азотсодержащих производных  $5\alpha$ -стероидов, легко доступных из отечественного стероидного сырья.

В настоящее время в области синтеза биологически активных стероидов с различными азотсодержащими заместителями работает большое количество исследователей. Интерес к азастроидам обусловлен тем, что многие соединения этого ряда обладают значительным фармакологическим потенциалом как противоопухолевые, антимикробные, антибактериальные, противотуберкулезные, антипаразитарные препараты; некоторые соединения успешно используются в практической медицине в качестве лекарств.

Анализ литературных данных последних лет, в которых сообщается о методах синтеза производных насыщенных и ненасыщенных азастроидов, обладающих высокой биоактивностью, дает возможность предположить, что направленная химическая модификация стероидной молекулы, вызывающая изменения биологической активности, в настоящее время является одним из наиболее эффективных и плодотворных способов создания новых лекарственных препаратов.

## Литература к главе 1

1. Назаров И.Н., Бергельсон Л.Д. Химия стероидных гормонов. Издательство АН СССР, Москва, 1955, 627 с.
2. Физер Л., Физер М. Стероиды. Мир, Москва, 1964, 982 с.
3. Ахрем А.А., Титов Ю.А. Стероиды и микроорганизмы. Наука, Москва, 1970, 526 с.
4. Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А. Тигогенин из *Yucca gloriosa* – возможное сырье для синтеза стероидных гормональных препаратов. Хим.-фарм.журн., 1972, 6,12, 44-47
5. Меньшова Н.И., Сорокина Н.П., Гриненко Г.С., Суворов Н.Н. Способ получения транс-диацетата 16 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -прегнен-17(20)-диола-3 $\beta$ ,20. Ав.св.СССР 389087, 1973

6. Кавтарадзе Л.К., Дабрундашвили Р.И., Меньшова Н.И., Корзинкина Н.А., Кемертелидзе Э.П. Синтез 3 $\beta$ -ацетокси-5 $\alpha$ -прегн-16-ен-20-она из тигогенина. Сообщ. АН Груз. ССР, 1988, 132, 3, 537-539
7. Sikharulidze M.I., Davitishvili M.G., Kintsurashvili L.A. The improved method of 3 $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-one preparation. Bull. Georgian Acad. Sci., 1999, 159, 2, 186-187
8. Меньшова Н.И., Корзинкина Н.А., Кемертелидзе Э.П., Надараиа Н.Ш., Давитишвили М. Г., Лицета Л.И., Грошева В.С. Получение ацетата андростанолонa – полупродукта синтеза стероидных препаратов из тигогенина. Сб. научн. тр. ВНИХФИ, 1982, 10, 83-86
9. Breslow R., Corcoran R.J., Snider B.B., Doll R.J., Khanna P.L., Kaleya R. Selective halogenation of steroids using attached aryl iodide templets. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 3, 905-914
10. Карпенко Р.Г., Гриненко Г.С., Давитишвили М.Г., Малютина О.Ф. Неензиматический синтез кортикостероидов и родственных соединений. Синтез 9,11-ненасыщенных стероидов на основе тигогенина. Хим.-фарм. журн., 1987, 21, 12, 1466-1469
11. Martindale: The extra pharmacopoeia.-28th Edition.-London, 1982, 743 p.
12. Davis B., Pearce D.R., Phillipps G.H. Steroid-containing pharmaceutical preparations. Пат. 1317184, Англия, МКИ А61К 17/00, 1973
13. Stephenson N.R. The relative evolution of adrenal corticoids by the thimus involution method. Can. J. Biochem. and Physiol., 1956, 34, 2, 253-258
14. Singer F.M., Bormon A. Antiinflammatory activities of several 9-haloderivatives of animal steroid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 1, 23-26
15. Weihua Z., Makela S., Andersson L.C., Salmi S., Saji Sh., Webster J.I., Jensen E.V., Nilsson S., Warner M., Gustafsson J.A.

A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. PNAS, 2001, 98, 6330-6335

16. Santos A.F., Huang H., Tindall D.J. The androgen receptor: a potential target for therapy of prostate cancer. Steroids, 2004, 69, 2, 79-85
17. Guerini V., Sau D., Scaccianoce E., Rusmini P., Ciana P., Maggi A., Martini P.G.V., Katzenellenbogen B.S., Martini L., Motta M., Poletti A. The Androgen Derivative 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Diol Inhibits Prostate Cancer Cell Migration Through Activation of the Estrogen Receptor  $\beta$  Subtype. Cancer Research, 2005, 65, 12, 5445-5453
18. Pak T.R., Chung W.C., Lund T. D., Hinds L. R., Clay C. M., Handa R. J. The androgen metabolite, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, is a potent modulator of estrogen receptor- $\beta$ -mediated gene transcription in neuronal cells. Endocrinology, 2005, 146, 147-155
19. Omoto Y., Lathe R., Warner M., Gustafsson J.Å. Early onset of puberty and early ovarian failure in CYP7B1 knockout mice. PNAS, 2005, 102, 2814-2819
20. Gunha G.R., Donjacour A.A., Cooke P.S., Mee S., Bigsby R.M., Higgins S.J., Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. Endocr. Rev., 1987, 8, 338-362
21. Merlani M.I, Amiranashvili L.Sh., Men'shova N.I., Kemertelidze E.P. Synthesis of 5 $\alpha$ - androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol from tigogenin. Chem. Nat. Comp., 2007, 43, 1, 97-99
22. Campbell T. J., Williams E. M. V. Electrophysiological and other effects on rabbit hearts of CCI 22277, a new steroidal antiarrhythmic drug. Brit. J. Pharmacol., 1982, 76, 337-345
23. Taylor S. D., Harris J. Efficient syntheses of 17 $\beta$ -amino steroids. Steroids, 2011, 76, 1098-1102

24. Thibeault D., Roy J., DeRoy P., Poirier D. Chemical synthesis of 2 $\beta$ -amino-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol N-derivatives and their antiproliferative effect on HL-60 human leukemia cells. *Bioor. & Med. Chem.*, 2008, 16, 9, 5062-5077
25. Mokotoff M., Zhao M., Marshall R. J., Winslow E., Wong L. K., Liao Q. J. Peptidyl aminosteroids as potential new antiarrhythmic agents. *Steroids*, 1990, 55, 399-404
26. Суворов Н. Н., Шашков В. С. Химия и фармакология средств профилактики радиационных поражений, М., 1975, 224 с.
27. Rezvani M. Treatment of radiation-induced normal tissue lesions. *Iran. J. Radiat. Res.*, 2003, 1, 2, 63-78
28. Sevaljevic L., Dobric S., Bogojevic D., Petrovic D., Koricanac G., Vulovic M., Kanazir D., Ribarac-Stepic N. M. The Radioprotective Activities of Turpentine- induced Inflammation and  $\alpha_2$  – macroglobulin: The Effecacy of the Inflammation. *J. Radiat. Res.* 2003, 44, 59-67
29. Надараиа Н. Ш., Сладков В. И., Кулешова Л.Н., Суворов Н.Н. Превращение 3 $\beta$ -ацетокси-5 $\alpha$ -андростан-17-она в 17 $\alpha$ - и 17 $\beta$ -аминопроизводные 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ола. *Ж. орг. хим.*, 1987, 23,3, 533-538
30. Надараиа Н. Ш., Сладков В. И., Суворов Н.Н. Синтез 17 $\beta$ -амино-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ола из эпиандростерона. *Ж. орг. хим.*, 1988, 24, 4, 760-765
31. Надараиа Н. Ш., Сладков В. И., Суворов Н.Н. Синтез 17 $\alpha$ -амино-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ола. *Ж. орг. хим.*, 1988, 24,7, 1472
32. Амиранашвили Л. Ш., Сладков В. И., Меньшова Н. И., Кемертелидзе Э. П., Суворов Н. Н. Синтез эпимерных 3-амино-5 $\alpha$ -андростан-17-олов. *Сообщ. АН Груз. ССР*, 1990,138, 8, 85-88
33. Nadaraia N.Sh., Amiranashvili L.Sh., Merlani M.I. Structure-activity relationship of epimeric 3,17-substituted 5 $\alpha$ -androstane aminoalcohols. *Chem. Nat.Comp.*, 2016, 52,5, 961-962

34. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Из-во АНЛ. СССР, Рига, 1959, 60-61
35. Надараиа Н.Ш., Сладков В.И., Дородникова Е.В., Машковский М.Д., Кемертелидзе Э.П., Суворов Н.Н. Синтез и антиаритмическая активность эпимерных 17-амино-5 $\alpha$ -андростан-3-олов и их производных. Хим.-фарм. ж., 1988, 22, 3, 288-293
36. Яхонтов Л.Н., Либерман С.С. Средства для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. I. Антиаритмики. Хим.-фарм. ж., 1985, 19, 11, 1306-1321
37. Надараиа Н.Ш., Сладков В.И., Паршин В.А., Дородникова Е.В., Машковский М.Д., Кемертелидзе Э.П., Суворов Н.Н. Гидрохлориды 17-цианометиламино-5 $\alpha$ -андростан-3-олов, обладающие гипноседативной, противосудорожной и антигипоксической активностью. Ав. св. СССР, №1519190, 1989
38. Мерлани М.И., Сладков В.И., Паршин В.А., Меньшова Н. И., Левина И.И., Суворов Н.Н. Синтез и фармакологическая активность производных 17-амино-5 $\alpha$ - андростан-3-ола. Хим.-фарм. ж., 1989, 23, 12, 1431 -1435
39. Merlani M.I., Amiranashvili L.Sh., Kemertelidze E.P., Papadopulos K., Yannakopulu E. Synthesis of 17 $\alpha$ -amino-5 $\alpha$ -androstane-2-ene from epiandrosterone. Chem. Nat. Comp., 2006, 42, 3, 313-315
40. Merlani M.I., Davitishvili M.G., Nadaraia N.Sh., Sikharulidze M.I., Papadopulos K. Conversion of epiandrosterone into 17 $\beta$ -amino-5 $\alpha$ -androstane. Chem. Nat. Comp., 2004, 40, 2, 144-146
41. Merlani M.I., Amiranashvili L.Sh., Mulkidzhanyan K.G., Kemertelidze E. P. Synthesis and biological activity of certain amino derivatives of 5 $\alpha$ -steroids. Chem. Nat. Comp., 2006, 42, 3, 322-324

42. Boyd M. R., Paull K. D. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.*, 1995, 34, 91-109
43. Alley M. C., Scudiero D. A, Monks P. A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine D. L., Abbott B. J., Mayo J. G., Soemaker R. H., Boyd M. R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.*, 1988, 48, 589-601
44. Pettit G.R., Smith R.L., Gupta A.K.D., Oocolowitz J.L. 3 $\beta$ -Hydroxy-17 $\beta$ -(L-prolyl)aminoandrost-5-ene. *Can. J. Chem.*, 1967, 45, 5,501-507
45. Vincze I., Hackler L., Szebdi Z., Schneider G. Aminoacylamidosteroids. *Steroids*, 1996, 61, 697-699
46. Yan A., Chan R. Y. K., Lau W.S, Lee K., Wong M.S., Xing G., Tiana G., Ye Y. Enzymatic synthesis and bioactivity of estradiol derivative conjugates with different amino acids. *Tetrahedron*, 2005, 61, 5933-5941
47. Mokotoff M., Liao Q., Wong L., Zhao M. Novel peptidyl amino steroids. *US Pat.* 4 868 167, 1989
48. Barbakadze N.N., Nadaraia N.Sh., Kakhbrishvili M. L., Onashvili E.O., Katritzky A.R., Synthesis from tigogenin of 17 $\beta$ -amino-5 $\alpha$ -androst-3 $\beta$ -ol peptide derivatives. *Chem.Nat. Comp.*, 2016, 52, 3, 445-447
49. Амиранашвили Л.Ш., Сладков В.И., Линдеман С.В., Стручков Ю.Т., Суворов Н.Н. Синтез 16 $\beta$ -амино-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -дигидрокси-5 $\alpha$ -андростана на основе эпиандростерона и структура его триацетата. *Ж. Орган. химии*, 1990, 25, 5, 1052-1058
50. Amiranashvili L.Sh., Merlani M.I, Men'shova N.I, Suvorov N.N. Synthesis of 3 $\alpha$ , 16 $\beta$ -diamino-2 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstanes on the basis of tigogenin. *Bull. Georgian Acad. Sci.* 1998, 158, 2, 273-275.

51. Mitsunobu O., Wada M., Sano T. Stereospecific and stereoselective reactions. I. Preparations of amines from alcohols. *J. Am. Chem.Soc.*, 1972, 94,2, 679-680
52. Krstic N.M., Bjelakovic M.S., Zizar Z., Pavlovic M.D., Juranic Z.D., Pavlovich V.D. Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities *Steroids*, 2007,72, 406-414
53. Cui J., Huang L., Fan L., Zhou A. A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-one steroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp. Sponges. *Steroids*, 2008, 73, 252-256
54. Sikharulidze M. I., Nadaraia N. Sh., Kakhabrishvili M. L., Barbakadze N. N., Mulkidzhanyan K. G. Synthesis and Biological Activity of Several Steroidal oximes. *Chem. Nat. Comp.*, 2010, 46, 3, 493-494.
55. Merlani M.I., Amiranashvili L.Sh., Mulkidzhanyan K.G., Shelar A.R. Synthesis and antitumor activity of some 5 $\alpha$ -steroid derivatives. *Chem. Nat. Comp.*, 2008, 44, 6, 819-820
56. Barbakadze N.N., Jones R.A., Rosario N.R., Nadaraia N.Sh., Kakhabrishvili M. L., Hall C. D., Katritzky A.R.. Chemical modificacion of oximes with N-protected amino acids. *Tetrahedron*, 2014, 70, 7181-7184
57. Cavallini G., Massarani F., Mazzuchi F., Ravenna F. Some hydrazides hydrazones and isonicotynyl hydrazones. *Farm. Sci. Tec. (Pavia)*. 1952, 7, 397-404
58. Mantegazza P., Tommasini R. Antituberculous activity of some compounds with similar structure to isonicotinohydrazines. *Atti Soc. Lombarda Sci. Med. Biol.* 1952, 7, 496-503
59. Воловельский Л.Н. Синтез противотуберкулезных веществ. *Укр. Хим. журн.* 1957, 23, 1, 72-74
60. Воловельский Л.Н. Синтез противотуберкулезных веществ. *Укр. Хим. журн.* 1957, 23, 1, 513-514

61. Merlani M.I., Sladkov V.I., Men'shova N.I., Filitis L.N., Kemertelidze E.P., Suvorov N.N. Synthesis of isonicotinoylhydrazones of  $5\alpha$ -ketosteroids on the basis of tigogenin. Bull. Georg. Acad. Sci. 1995, 153, 763-767
62. Merlani M.I., Amiranashvili L.Sh., Kemertelidze E.P., Mulkidzhanyan K.G. Synthesis and antimycobacterial activity of some steroidal derivatives of tigogenin. Chem. Nat. Comp. 2009, 45, 3, 389-392
63. Мерлани М.И., Кемертелидзе Э.П., Пападопулос К., Меньшова Н.И. Синтез из тигогенина и противотуберкулезная активность некоторых производных гидразонов  $5\alpha$ -стероидов. Биоорг. химия. 2004, 30, 5, 552-557
64. Rapala R.T., Kraay R.J., Gerson K. The Adamantyl group in medicinal agents. II. Anabolic steroids  $17\beta$ -adamantoates. J. Med. Chem., 1965, 8, 580-583
65. Ковтун В.Ю., Плахотник В.М. Использование адамантан-карбоновых кислот для модификации лекарственных средств и биологически активных соединений. Хим.-фарм. ж., 1987, 21, 8, 931-940
66. Sikharulidze M. I., Nadaraia N. Sh., Kakhbrishvili M. L., Labartkava M.O. Adamantane-containing  $5\alpha$ -steroids. Chem. Nat. Comp., 2007, 43, 6, 753-755
67. Sikharulidze M. I., Nadaraia N. Sh., Kakhbrishvili M. L. Synthesis and antituberculosis activity of several steroids from  $3\beta$ -acetoxy- $5\alpha$ -pregn-16-en-20-one. Chem. Nat. Comp., 2012, 48, 3, 423-425
68. Collins L., Franzblau S.G., Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium avium. Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 41, 1004-1009
69. Banday A. H., Shameem S. A., Jeelani S. Steroidal pyrazolines and pyrazoles as potential  $5\alpha$ -reductase inhibitors: Synthesis and biological evaluation. Steroids, 2014, 92, 13-19

70. Deive N., Rodriguez J., Jimenez C. Synthesis of cytotoxic 6E-hydroximino-4-ene steroids: structur/activity studies. *J. Med. Chem.*, 2001,44, 16, 2612- 2618
71. Choudhary M. I., Alam M. S., Rahman A., Yousuf S., Wu Y. C., Lin A. S., Shaheen F. Pregnenolone derivatives as potential anticancer agents. *Steroids*, 2011,76, 1554-1559
72. Gan C., Cui J., Su Sh., Lin Q., Jia L., Fan L., Huang Y. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. *Steroids*, 2014,87, 99-107
73. Huang Y., Cui J., Jia L., Gan C., Song H., Zeng C., Zhou A. Synthesis and evaluation of some 17-acetamidoandrostane and N,N-dimethyl-7-deoxycholic amide derivatives as cytotoxic agents: struktur/activity studies. *Molecules*, 2013, 18, 7436-7447
74. Cui J., Liu L., Zhao D., Gan C., Huang X., Xiao Q., Qi B., Yang L., Huang Y. Synthesis, characterization and antitumor activities of some steroidal derivatives with side chain of 17-hydrazone aromatic heterocycle. *Steroids*, 2015, 95, 32-38
75. Nadaraia N.Sh., Onashvili E.O., Kakhabrishvili M.L., Barbakadze N.N., Sylla B., Pichette A. Synthesis and antiviral activity of several N-containing 5 $\alpha$ -steroids. *Chem. Nat. Comp.*, 2016, 52,5, 853-855
76. Zeelen F. *Medicinal Chemistry of Steroids*. Elsevier, Amsterdam;Oxford; New York; Tokyo, 1990
77. Ахрем А.А., Титов Ю.А. Производные стероидов с конденсированными гетероциклами. *Успехи химии*, 1967, 36, 5, 745-776
78. Kamernitzky A.V., Turuta A.M. Synthesis of steroidal heterocycles. *Heterocycles*, 1977, 7,1, 547-591
79. Заварзин И.В., Черткова В.В., Левина И.С., Чернобурова Е.И. Стероиды, конденсированные с гетероциклами по положениям 16,17 кольца D. *Успехи химии*, 2011, 80, 7, 693-714

80. Abdelhalim M.M., El-Saidi M.M.T., Rabie S.T., Elmegeed G.A. Synthesis of novel steroidal heterocyclic derivatives as antibacterial agents. *Steroids*, 2007, 72, 459-465
81. Motyan G., Kovacs F., Wolfling J., Zupko I., Frank E. Microwave-assisted stereoselektive approach to novel steroidal ring D-fused 2-pyrazolines and an evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro. *Steroids*, 2016, 112, 36-46
82. Amr A.G.S., Latif N.A.A., Abdalla M.M. Synthesis of some new testosterone derivatives fused with substituted pyrazoline ring as promising  $5\alpha$ -reductase inhibitors. *Acta pharm.*, 2006, 56, 203-218
83. Shamsuzzaman, Khan M.Sh. Alam M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new steroidal cholest-5-en-7-one derivatives fused substituted pyrazoline ring. *J. Chil. Chem. Soc.*, 2009, 54,4, 372-374
84. Камерницкий А.В., Чернобурова Е.И., Черткова В.В., Заварзин И.В., Яровенко, М.М. Краюшкин В.Н. Ацилгидразоны 20-кетостероидов и их превращения. I. Синтез и свойства 1'-ацилзамещенных 3'-метиландростено [16,17-d] пиразолинов. *Биоорганическая химия*, 2007, 33, 3, 337-341
85. Nadaraia N. Sh., Kakhabrishvili M. L., Onashvili E.O., Barbakadze N. N., Getia M. Z., Pichette A., Sikharulidze M. I., Makhmudov U. S. Synthesis of several  $5\alpha$ -androstano[17,16-d]pyrazolines from tigenin. *Chem. Nat. Comp.*, 2014, 50, 6, 1024-1028
86. Zavarzin I. V., Kamernitsky A. V., Chertkova V. V., Chernoburova E. I., Yarovenko V. N., Kraushkin M. M., Kachala V. V. Synthesis of 1'-arylcarbamoylethiocarbonyl-3'-methyl-3-oxo-androst-4-eno[16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -d]pyrazolines. *ARKIVOC*, 2008, IV, 62-70.
87. Cazaux J.-B., Jacquier R., Maury G. Pyrazolines-2 steroliques: synthese et isomerisation. *Tetrahedron Lett.*, 1971,12, 41-44
88. Китаев Ю.П., Бузыкин Б.И. Гидразоны, Наука, 1974, 191 с.

89. Camoutsis C., Trafalis D. T. P. An overview on the antileukemic potential of D-homo-aza- and respective  $17\beta$ -acetamido-steroidal alkylating esters. *Invest. New Drugs*, 2003, 21, 47-54
90. Papageprgiou A., Koutsourea A.I., Arsenou E.S., Evagelia S., Fousteris M.A., Mourelatos D., Nikolaropoulos S.S. Structure-antileukemic activity relationship study of B and D-ring modified and non-modified steroidal esters of chlorambusil's active metabolite. *Anticancer Drugs*, 2005, 16, 1075-1082
91. Fousteris M. A., Koutsourea A. I., Arsenou E. S., Evagelia S., Papageorgiou A., Mourelatos D., Nikolaropoulos S. S. Structure-anti-leukemic activity relationship study of B- and D-ring modified and non-modified steroidal esters of chloranbucil. *Anti-Cancer Drugs*, 2006, 17, 511-519
92. Merlani M. I., Amiranashvili L. Sh., Kemertelidze E. P., Synthesis of Several  $5\alpha$ -D-Homosteroid Derivatives Based on Tigogenin. *Chem. Nat. Comp.*, 2014, 50, 3, 480-482

## **Глава 2. Общие сведения о стероидных гликозидах и сапогенинах**

В числе большого класса растительных стероидов особое место занимают стероидные гликозиды, обладающие свойствами сильных детергентов, образуя с водой устойчивую пену и получившие общее название «сапонины». Стероидные гликозиды характеризуются гемолитической активностью, отличаются способностью образовывать молекулярные комплексы с холестерином и некоторыми другими природными соединениями, проявляют также биологическую активность и применяются в медицинской практике.

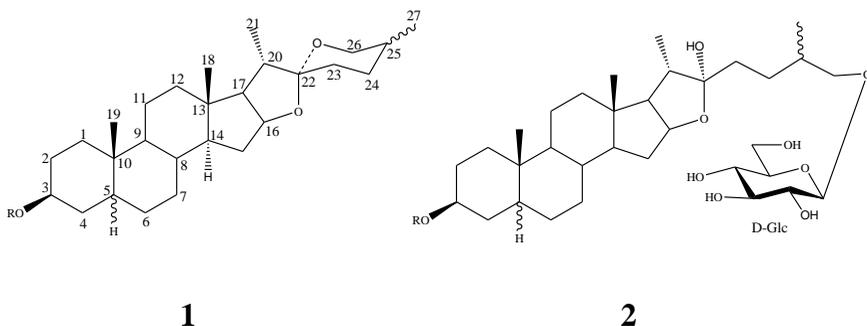
Но особое значение стероидные гликозиды приобрели после того, как было показано, что их агликоны-сапогенины являются наиболее доступным сырьем для синтеза стероидных гормональных препаратов. Из сапогенинов осуществляется синтез почти всех групп стероидных гормонов, благодаря чему все больше повышался интерес к растительным стероидам. В литературе накопилось огромное количество работ, посвященных этому классу химических соединений [1, 2].

В нашей работе, касающейся собственных результатов по изучению сапогенинов и сапонинов, кратко изложим лишь общие представления об этих соединениях.

Стероидные гликозиды в своем составе содержат моносахариды и агликоны с 27 углеродными атомами, представляющими собой пергидроциклопентанофенантроновый скелет разной степени насыщенности, окисления и сочленения боковой цепи. Известны стероидные гликозиды спиростанолового типа (1) или монодесмозиды, с шестью циклами колец

А, В, С, D, Е, F в стероидной части молекулы, со спироцентальной системой бокового кольца, и фураностаноловые (2) – бисдесмозиды, содержащие открытую F цепь с гидроксильной группой и молекулой глюкозы при C<sub>26</sub> (2). Гидроксильная группа у C<sub>22</sub> в фураностанах всегда имеет R - конфигурацию. Гидроксил C<sub>3</sub> обычно замещен углеводной частью, что и приводит к образованию стероидных гликозидов [3, 4].

Первым стероидным сапонином был дигитонин, описанный в литературе в 1875 г., полученный из семян *Digitalis purpurea* L. [5].



Затем исследования по выделению и изучению стероидных гликозидов развивались сравнительно медленно и значительно расширились лишь с 60-х годов прошлого столетия. К настоящему времени известно несколько сотен гликозидов спиростанолового и фураностанолового ряда, производные до 200 генинов. Установлению строения стероидных гликозидов посвящена многолетняя плодотворная деятельность Kiliani и Windaus, а затем блестящие исследования в этой области проведены Simpson, Jacobs, Fieser, Marker, Tschesche, Fleck и др. [3, 6, 7, 8].

В 1947 году [8, 9] было высказано мнение, а позднее описана структура стероидных гликозидов с открытой боковой цепью при C-26 фураностанолового ряда (2) [10, 11]. Связь концевой глюкозы с пентациклическим генином в фураностаноловых гликозидах весьма лабильна и легко поддается расщеплению даже в мягких условиях – эндоферментами. В гликозидах при этом происходит циклизация боковой цепи и образуются спиростанолы. В связи с присутствием в растениях фермента глюкозидазы, в одном и том же растении часто обнаруживаются гликозиды с одинаковыми генинами и сахарами, но различающиеся фрагментом при C<sub>22</sub>. Предполагают, что в растениях сначала синтезируются фураностаноловые гликозиды, а спиростаноловые образуются из них под воздействием фермента β – глюкозидазы [7, 11]. Поэтому фураностаноловые гликозиды иногда называют «протогликозидами». При взаимодействии с метанолом или этанолом, полукетальный гидроксил при C<sub>22</sub> фураностанола легко переходит в алкилпроизводные и вновь легко освобождается при гидролитическом распаде метилкетала. Поэтому гликозиды фураностанолового ряда в системах, содержащих низшие спирты на тонкослойных хроматограммах (ТСХ), обнаруживаются в виде двух близких по значению R<sub>f</sub> пятен, соответствующих 22-окси- и 22-О-алкилпроизводным [7].

Спиростаноловые и фураностаноловые гликозиды легко можно различить с помощью цветных реакций. Наиболее распространенными являются реактивы Sannie - 1% раствор ванилина и смесь уксусного ангидрида с конц. серной кислотой (12 : 1) [12] и модифицированный реактив Matthews - 0,5% ванилиновый раствор серной кислоты в этаноле (4 : 1).

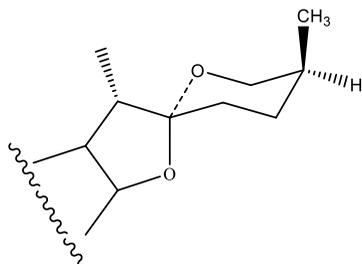
Применяется также 1% раствор ванилина в 50% фосфорной кислоте. Широко используется реактив Erlich - 1% раствор 1,4 – парадиметиламинобензальдегида в этаноле [13]. Замещение в кольцах E и F вызывает различные изменения окраски как с реактивом Sannie, так и Erlich. Спиростанолы с реактивами Sannie, Matthews окрашиваются в желтый, а фуростанолы – в зеленый цвет. С реактивом Erlich фуростанолы дают розовое окрашивание, когда спиростанолы не взаимодействуют с ним. В отличие от спиростанолов, фуростанолы при взаимодействии со спиртовым раствором холестерина, как правило, не образуют осадка [4]. Для идентификации стероидных сапогенинов применяется также насыщенный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе. Образующаяся при этом оранжево-красная окраска является специфичной для  $\Delta^{5,6}$  стероидных сапогенинов (диогенин, ямогенин и др.) [12].

Термин «спиростан» указывает на кольцевой характер системы, являющейся 16, 22, 22, 26 – диэпоксихолестаном, а как уже указывали выше, в фуростанах кольцо F раскрыто и представляет собой 16, 22 – эпоксихолестан.

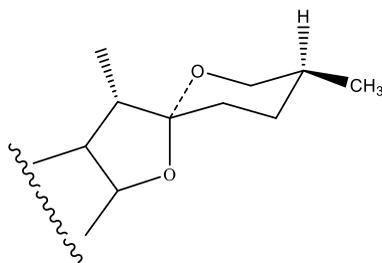
Стероидные сапогенины спиростанолового ряда содержат большое число асимметричных центров, но в природе встречаются стереоизомеры в основном по C-5 и C-25. Изомеры по C<sub>22</sub> – обнаружены лишь в R-, а по C<sub>20</sub> только в S-конфигурации. Известны сапогенины с цис- (5  $\beta$ ) и транс- (5  $\alpha$ ) – сочленением колец A/B. При C-25 образуются эимеры, содержащие C<sub>27</sub>-метильную группу в аксиальном или экваториальном положениях. В случае аксиальной ориентации C-27 метильной группы спиростаноловый сапогенин относится к 25 S- (нео) – ряду (3), а экваториальной к 25 R-

(изо) – ряду (4). Ранее неосапогенины были описаны как (25 L), а изо – (25 D) спиростаны.

Изомерные агликоны в различных условиях могут превращаться друг в друга и образовывать смесь эпимеров [7, 8].



3. 25 S (нео-)



4. 25 R (изо-)

Изомерные сапогенины отличаются от нормальных по физическим свойствам: т. пл., удельному вращению и, главным образом, ИК – спектрам. Стероидные сапогенины спиростанолового типа имеют характерные полосы в интервале  $1350 - 850 \text{ см}^{-1}$  и в особенности четкие полосы при  $850 - 870$ ,  $900$ ,  $920$  и  $980 \text{ см}^{-1}$ . В случае 25 S - конфигурации в ИК – спектре сапогенина отмечены все четыре указанные полосы поглощения и при этом интенсивность частоты при  $920 \text{ см}^{-1}$  больше, чем при  $900 \text{ см}^{-1}$ . Полосы при  $865$ ,  $900$ ,  $920$  и  $980 \text{ см}^{-1}$  с поглощением при  $900 \text{ см}^{-1}$  более интенсивным, чем при  $920 \text{ см}^{-1}$ , наблюдаются в сапогенинах 25 R – ряда [14, 15].

Спиро- и фураностанолы, отличаются некоторыми признаками в ИК-спектре. В фураностанолах резко меняется поглощение четырех полос в области  $1350-850 \text{ см}^{-1}$  и появляется уширенная полоса при  $900 \text{ см}^{-1}$ . Стероидные сапогенины имеют отрицательное значение удельного

вращения, колеблющееся в пределах  $-4,5^{\circ}$ - $132^{\circ}$ . Исключение составляют гекогенин и глориогенин.

В установлении структуры стероидов, наряду с их физико-химическими свойствами и с ИК-спектроскопией, большую информацию дает масс-спектральный анализ [16, 17],  $^1\text{ПМР}$  и ЯМР $^{13}\text{C}$  спектроскопия [18-24].

Для качественной и количественной характеристики углеводной части стероидных гликозидов используется газожидкостная хроматография (ГЖХ) моносахаридов в виде их различных производных, в частности: метиловых эфиров, ацетатов метилгликозидов, ацетатов альдонитрилов, трифтор ацетатов полиолов. Важнейшим методом для определения сахарной части гликозидов является перметилирование и идентификация образованных полностью или частично метилированных моносахаридов. Метилирование позволяет решить вопросы структурной химии гликозидов, а именно определить положение гликозидных связей между моносахаридными звеньями, степень и центры разветвлений углеводных цепей, размер окисных циклов моносахаридов и концевые моносахариды. Для простейших гликозидов эти данные позволяют определить их полную структуру, а для олигозидов общие черты строения углеводных составляющих [25, 26]. Полноту замещения ОН-групп при метилировании устанавливают с помощью ИК- (отсутствие поглощения гидроксильных групп в области  $3400\text{-}3600\text{ см}^{-1}$ ) и ЯМР- (по количеству метоксильных в спектрах) спектральным анализом. На следующем этапе расщепления гликозидных связей полностью метилированных соединений используют метанолиз 5-7%-ной хлорной кислотой в метаноле. Идентификация метилированных сахаров осуществляется БХ, ТСХ и

ГЖХ анализом [27, 28]. Для характеристики частично метилированных моносахаридов с успехом используется масс-спектрометрия, по способу, разработанному Н.К. Кочетковым и О.С. Чижовым [29].

Последовательность присоединения моносахаридов в стероидных гликозидах, конфигурация гликозидных центров определяется с помощью частичного кислотного и ферментного гидролиза, ИК- и ЯМР-спектроскопией. Не потерял значения наиболее доступный метод определения конфигурации гликозидных центров, основанный на вычислении разности молекулярных вращений гликозида и его прогенинов.

В 1939-1940 годах Marker, Rohrmann [30] показали возможность получения соединения прегнанового ряда  $\Delta^5$ , 16-прегнадиенол-3 $\beta$ -она-20 из стероидных сапогенинов сарсапогенина и диосгенина. Тем самым возникла перспектива использования стероидных сапогенинов в качестве исходных веществ в синтезе стероидных гормонов.

Стероидные гормональные препараты в основном получают полусинтезом из природных соединений, содержащих пергидроциклопентанофенантроновую систему. Промышленным исходным сырьем для синтеза гормональных препаратов являются стерины, стероидные алкалоиды и сапогенины, получаемые при гидролизе стероидных гликозидов.

Превращение диосгенина и других сапогенинов проводилось многими учеными. Но большое влияние на бурное развитие химии растительных стероидов оказала так называемая «стероидная волна», возникшая благодаря открытию лечебных средств ряда кортизона в 1949 г., что

привело к их широкому применению в терапии самых разнообразных заболеваний высокоэффективных стероидных препаратов.

В связи с этим с пятидесятих годов в ряде стран мира широко развернулись поиски растений, содержащих стероидные гликозиды, среди которых более перспективными оказались растения рода *Dioscorea*, *Agave*, содержащие диосгенин и гекогенин. Наиболее высокое количество диосгенина, достигающее до 10-13%, найдено в корневищах различных видов *Dioscorea*. *Dioscorea* – диоскорей стал универсальным промышленным сырьем для синтеза стероидных гормонов. Резкое возрастание объема производства гормональных препаратов привело к значительному истощению их природных запасов.

Одновременно с этим А. С. Лабенским проводились работы по изучению растений, продуцентов стероидных гликоалкалоидов, агликоны которых соласодин или томатыдин также относительно легко могут быть превращены в стероидные гормоны.

Во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (ВНИХФИ) В.И. Максимовым разработан оригинальный промышленный метод превращения диосгенина в ацетат  $\Delta^5$ , 16-прегнадиенол-3 $\beta$ -она-20. В 1955 г. Н. Н. Суворовым был осуществлен синтез прогестерона и кортизона, а затем и других стероидных гормонов из соласодина [31, 32].

Результаты научных исследований Н. Н. Суворова и В. И. Максимова заложили основу производства стероидных гормональных препаратов в бывшем Советском Союзе. На

химико-фармацевтическом заводе «Акрихин» был организован выпуск нескольких стероидных гормонов сначала из импортируемого диосгенина, а затем на основе соласодина, выделяемого из травянистых растений *Solanum laciniatum* Ait. – паслена дольчатого и *S. aviculare* Forst. – паслена птичьего, и основным сырьем для синтеза гормональных препаратов стал соласодин.

Паслен дольчатый и птичий были введены в культуру, разведены их промышленные плантации в Средней Азии. Производство соласодина осуществлялось на Чимкентском химико-фармацевтическом заводе. Но паслен оказался сложной культурой, трудно поддающейся промышленному размножению: повреждается насекомыми, урожайность нестабильная и, в большинстве случаев, низкая. План выпуска соласодина из года в год не выполнялся. Ввиду этого выявление других перспективных источников сырья для синтеза стероидных гормональных перпаратов оставалось актуальной проблемой.

Наряду с использованием стероидных сапогенинов в синтезе гормонов, в качестве лекарственного средства находят применение стероидные гликозиды. Способность стероидных гликозидов связываться с холестерином с образованием нерастворимого комплекса, послужила основанием создания антисклеротических препаратов Диоспонина и Полиспонина – суммы стероидных гликозидов из клубней *D. caucasica* и *D. nipponica*.

Усиленные работы Г.В. Лазурьевского, П.К. Кинтя и других [2, 33, 34] привели к выявлению антигельминтного, фунгицидного действия стероидных гликозидов. В

литературе имеются сведения относительно флебодинамического, противовоспалительного и др. эффектов стероидных гликозидов.

Учитывая все вышеизложенное, в Институте фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе Академии наук Грузии с начала шестидесятых годов Т. А. Пхеидзе, Э. П. Кемертелидзе начаты исследования флоры Грузии для выявления растений, содержащих стероидные гликозиды, как для установления возможности использования в качестве сырья в синтезе стероидных гормональных препаратов, так и для создания лечебных средств.

Здесь же следует быть отмеченным созданный в Институте фармакохимии препарат Трибуспонин на основе стероидных гликозидов *Tribulus terrestris* L. для лечения и профилактики атеросклероза и в качестве неспецифического анаболического средства, с успехом применяемый в Советском Союзе [76].

Результаты этих работ и освещены в данной книге.

## 2.1. Поиски стероидных сапогенинов во флоре Грузии

Растения – продуценты стероидных гликозидов распространены почти во всем мире, но преимущественно в районах с сухим жарким климатом. Они обнаружены в представителях 150 семейств, значительное их количество в видах растений семейств *Liliaceae*, *Agavaceae*, *Amaryllidaceae*, *Dioscoreaceae*, *Scrophulariaceae*.

Систематическое обследование богатой флоры Грузии на содержание стероидных соединений начато нами с 1959 года.

Растения для анализа в различных регионах республики собирали фармакоботанические экспедиции Института фармакохимии АН Грузии под руководством Н.А. Анели, Дж. И. Анели, Г. С. Татишвили, Т. К. Мардалеишвили, Т. С. Ментешашвили и др. Растения в основном были собраны в июне-августе.

С целью установления наличия стероидных сапонинов применялись тесты пеннообразования, гемолитической активности [35], реактивы Sannie-Lapin [12], Matthews [36] и микрометод, предложенный Wall [37], видоизмененный О. С. Мадаевой и Л. С. Четвериковой [38].

Выделение сапогенинов по полумикрометоду осуществлялось следующим образом: 25 г в/с измельченного растительного сырья извлекали 250 мл 80% этанола: из спиртоводного экстракта спирт упаривали, водную жидкость обрабатывали хлороформом и проводили ее гидролиз соляной кислотой в присутствии бензола. Образовавшиеся стероидные сапогенины из кисло-водной смеси извлекали бензолом; бензольные вытяжки промывали водой, раствором едкого кали и вновь водой до нейтральной реакции, сгущали; остаток высушивали и подвергали Б/Х, ТСХ и ИК спектральному анализу, гемолитической пробе.

Было проанализировано около 2500 растений, дикорастущих на территории Грузии, отнесенных к 128 семействам и 589 родам. Исследованы и интродуцированные в Грузии 102 вида – представители 50 семейств и 72 родов [39-47].

Полный гемолиз получили в 346, частичный – в 754 случаях. Реакцию Санье-Лапин давал 61 образец, что уже указывало на вероятность содержания стероидных сапогенинов в том случае, если желтое окрашивание не было

обусловлено флавоноидными соединениями. Такие растения подвергали определению по полумикрометоду. Образцы, дающие осадки не менее чем 20 мг, анализировали ИК-спектральным методом. Появление полосы поглощения в области  $1350-850\text{ см}^{-1}$ , причем интенсивных при 850 и 870; 900; 920 и  $980\text{ см}^{-1}$ , уже указывало на наличие спирокетальной группировки [3].

Наиболее перспективными по степени изученности, распространению или возможности введения в культуру, качественному составу оказались 30 растений, которые и были подвергнуты нами химическому исследованию, в частности все виды наперстянки, якорцев, иглицы, агав, паслена, цеструма, лука, бешорнерии, юкки. Самой значительной для наших целей оказалась *Yucca*, на изучении которой остановимся ниже.

## 2.2. Стероидные сапогенины *Yucca* L.

По содержанию стероидных соединений привлекают внимание растения рода *Yucca* – юкки семейства *Agavaceae*, объединяющие свыше 35 видов [48-51]. Юкки вечнозеленые, полукустарниковые, древовидные растения до 12 м высоты с неразвитым стеблем. Листья их жесткие, линейные и линейно-ланцетные, до 1 м длины, листорасположение спиральное. Цветки колокольчатые, пониклые, 4-7 см длины. Юкки родом из центральной и южной части Северной Америки, Мексики, Азорских островов. Они широко используются как декоративные и грубоволокнистые растения [52, 53].

В юкках синтезируются стероидные гликозиды, в основном производные: сарсапогенина, тигогенина, гитогенина, смиллагенина [7-10].

Многочисленными работами показано значительное изменение состава агликонов в одних и тех же видах юкк, произрастающих в разных географических зонах. Так, например, Wall и др. в юкках с Запада США отмечают содержание сарсапогенина, а с юга-востока и юго-запада – тигогенина и гитогенина [54, 55, 56].

В XIX веке виды юкки были введены в культуру на побережье Черного моря, на юге Украины, Северном Кавказе и Средней Азии исключительно как декоративные растения. К числу 11 видов юкк, интродуцированных в СССР, относятся: *Yucca gloriosa* L., *Y. aloifolia* L., *Y. elata* Engelm., *Y. de-Smetiana* Baker, *Y. brevifolia* Engelm., *Y. filamentosa* L., *Y. flaccida* Haw., *Y. recurcifolia* Salisb., *Y. glauca* Nutt., *Y. elephantipes* Rgl., *Y. treculeana* Carr. [52, 53].

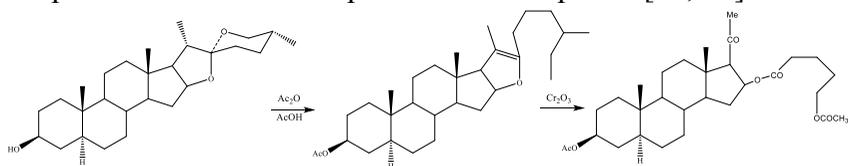
В пятидесятых годах впервые О. С. Мадаевой из корневищ *Y. filamentosa*, произрастающей на Черноморском побережье Кавказа, выделена смесь сапогенинов (0.45%), состоящая из сарсапогенина, тигогенина и гекогенина, из листьев изолирован тигогенин (0.34%) и установлено содержание хлорогенина и смиллагенина [57].

С 1960 года в Институте фармакохимии АН Грузии Т.А. Пхеидзе, Э. П. Кемертелидзе были продолжены исследования юкк, произрастающих на Черноморском побережье Кавказа, на содержание стероидных сапогенинов.

### 2.2.1. Тигогенин из листьев *Yucca gloriosa* L.

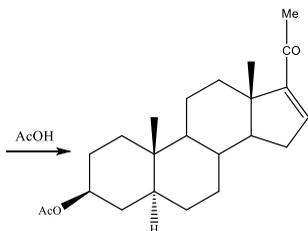
Наши исследования показали, что листья *Yucca gloriosa* L. – юкки славной содержат стероидные гликозиды производные в основном одного генина - тигогенина, количество которого в растении доходит до 1%. Остальные сапогенины присутствуют в небольших количествах и индивидуальный тигогенин можно выделить непосредственно из суммы без ее колоночного хроматографического разделения. Это обстоятельство дало основание предположить возможность использования юкки славной в качестве промышленного источника тигогенина, с целью его применения в синтезе стероидных гормональных препаратов [58].

Тигогенин из листьев юкки славной был передан во Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический Институт (ВНИХФИ) для проведения опытов по синтезу стероидных гормональных препаратов. В лаборатории химии гормонов ВНИХФИ, при нашем участии, было установлено, что тигогенин, представляющий собой 25R 5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол, легко превращается в ключевые продукты синтеза стероидных гормонов – ацетат 5 $\alpha$ -прегн-16-ен-3 $\beta$ -ол-20-она и ацетат 5 $\alpha$ -андростанол-3 $\beta$ -ол-17-она (схема 2.1.). Эти соединения могут быть использованы для синтеза ряда препаратов, имеющих транс-сочленение колец А и В 5 $\alpha$ -андростанолового и 5 $\alpha$ -прегненолового рядов [59, 60].

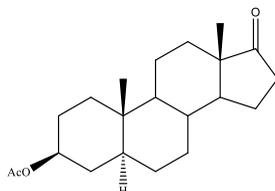


ТИГОГЕНИН

25R – 5 $\alpha$ -спиростан – 3 $\beta$ -ол



Ацетат – 5- $\alpha$ -прегненолон



Ацетат – 5- $\alpha$ -андростанолон

Схема 2.1. Превращение тигогенина в ключевые продукты синтеза стероидных гормонов

После принципиального решения вопроса использования тигогенина в синтезе стероидных гормональных препаратов, во ВНИХФИ совместно с сотрудниками Института фармакохимии АН Грузии были начаты работы по синтезу стероидных препаратов из тигогенина, а в Институте фармакохимии развернулись исследования по разработке способа получения тигогенина, решения вопросов, связанных с его производством, и разведения юкки славной в промышленном масштабе.

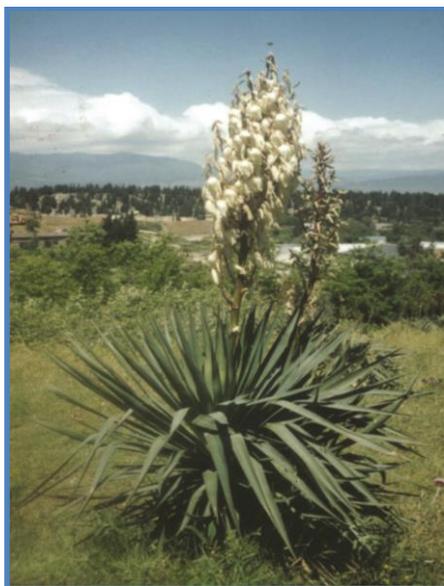


Рис. 2.1. *Yucca gloriosa* L. – юкка славная

### **2.2.2. Способ получения тигогенина из юкки славной**

Листья юкки славной волокнистые и очень плотной консистенции, поэтому их измельчение представляло определенную трудность. Наиболее пригодной для этой цели оказалась дробилка кормовая универсальная ДКУ-10.

Для удаления из листьев юкки славной хлорофилла, аморфных, жиро- и воскообразных углеродных соединений различной химической природы, имеющих аналогичную тигогенину полярность, растительный материал предварительно форэкстрагировали бинарной смесью: хлороформ – экстракционный бензин (1:1). Выделение тигогенина из листьев сначала осуществляли непосредственным гидролизом

сапонинов в сырье [61]. Гидролиз форэкстрагированного сырья проводился без его высушивания в присутствии органического растворителя, способствующего гашению пены при проведении процесса. Для расщепления гликозидов оказались подходящими 20%  $H_2SO_4$  или 10%  $HCl$ . Нейтрализацию реакционной смеси проводили 40% раствором  $NaOH$  до рН 7. Гидролизат высушивали при 70-80°C до остаточной влажности 5-8%; измельчали и сапогенины исчерпывающе экстрагировали бензином экстракционным или петролейным эфиром. Объединенные экстракты обрабатывали активированным углем, сгущали и оставляли на 10-12 часов. Выпавшие при этом кристаллы тигогенина отделяли, промывали тем же растворителем и высушивали. Выход тигогенина составляет 0.9-1.0% от исходного сырья. В маточнике оставались сопутствующие сапогенины и небольшое количество тигогенина.

Технология получения тигогенина из листьев юкки славной отработана на стендовых установках экспериментально-производственной базы Института фармакохимии. Совместно с М.Г. Карчхадзе, А.В. Гоциридзе, М.Г. Чирикашвили составлен опытно-промышленный регламент, на Батумском химико-фармацевтическом заводе ПАО «Грузхимфармпрепараты» была создана опытная установка производства тигогенина мощностью 200 кг/год, где в течение нескольких лет осуществлялся его выпуск.

Еще в 1983 году, на Московском химико-фармацевтическом заводе «АКРИХИН» в промышленных условиях проведено превращение большой партии тигогенина в ацетат 5 $\alpha$ -прегненолона по методу, разработанному Институтом фармакохимии. Получены продукты высокого качества с

хорошим выходом. Разработан опытно-промышленный регламент производства ацетата 5 $\alpha$ -андростанолонa и ацетата 5 $\alpha$ -прегненолонa.

В дальнейшем нами предложена технология тигогенина, основанная на гидролизе стероидных гликозидов, выделенных из растительного сырья, принцип которой состоит в следующем: воздушно-сухие измельченные листья юкки славной 4 раза извлекают 40% этиловым или изопропиловым спиртом, при нагревании. Из объединенных экстрактов спирт отгоняют в присутствии пеногасителя «115-136». К водному остатку прибавляют H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в расчете получения 20% в реакционной среде и равный объем бензина экстракционного. Гидролиз проводят при 70°, в продолжение 3 часов. Бензиновый слой отделяют и оставшуюся жидкость три раза извлекают этим же растворителем. Объединенные бензиновые экстракты обрабатывают 5% NaOH и сгущают. Выкристаллизованный тигогенин отделяют, промывают небольшим количеством бензина, перекристаллизовывают из этилацетата и сушат. Выход тигогенина при этом составляет 0.7-0.8%.

Данный способ имеет ряд преимуществ перед предыдущим, в частности, использование 40% спирта на первой стадии позволяет из листьев извлекать стероидные гликозиды, почти не экстрагируя при этом аморфные, жиро- и воскообразные вещества, и отпадает необходимость фор-экстрагирования сырья. Из процесса исключается гидролиз большого объема растительного материала и последующие за ним стадии нейтрализации, сушки, измельчения и экстрагирования сырья бензином. Гидролиз сравнительно небольших объемов водной жидкости стероидных гликозидов намного

облегчает процесс. Проведение гидролиза стероидных гликозидов в водной среде в присутствии бензина экстракционного способствует одновременному и сравнительно селективному извлечению образовавшихся сапогенинов и значительно сокращается технологический цикл. Очистка от красящих и фенольных соединений бензинового экстракта хорошо достигается раствором гидрата окиси натрия. Технологический процесс приобретает наиболее компактный характер, сокращается цикл и время. Экономическая целесообразность очевидна [62-64].

Принято решение организовать производство тигогенина в Восточной Грузии на Ахметском комбинате Тбилисского химико-фармацевтического завода. Проект цеха тигогенина мощностью 15 тонн/год, по предложенной технологии, выполнен Государственным проектно-изыскательным институтом «Южгипробиосинтез» (Одесса).

Тигогенин из юкки славной представляет собой белые игольчатые кристаллы с т.пл. от 190 до 210°C (в интервале 2-3°C).  $[\alpha]_D^{20}$  в пределах от -62° до -70°C (с 1.0; хлф). В ИК-спектре тигогенина и его ацетата проявляются полосы поглощения, характерные для таковых, описанных в литературе [14]. На ТСХ и Б/Х дает одно основное пятно с незначительной примесью сапогенинов, проявляемых на уровне смилагенина, гитогенина и хлорогенина. Возникла необходимость разработать способ обнаружения сопутствующих тигогенину веществ для контроля его чистоты [65]. Разработан метод хроматографического анализа тигогенина и побочных веществ на пластинках Силуфол UV-254 в системе растворителей хлороформ-этанол. Сопутствующие вещества обнаруживают в УФ-свете и обработкой парами йода. В

первом случае примеси одного характера дают бледно-голубое свечение в виде продолговатого пятна с  $R_f$  0.15 и 0.80; во втором – сопутствующие вещества другой природы под действием йода на синем фоне образуют бурые пятна с  $R_f$  0,52 и белые растянутые пятна с  $R_f$  0.21, 0.53 и 0.78, которые становятся более контрастными после выдерживания пластинки в течение одной мин при температуре 100°C. После удаления йода пластинку опрыскивают реактивом Матхеус: при этом проявляется тигогенин в виде характерного для стероидных сапогенинов желтого пятна. Весь процесс анализа длится не более чем 30 минут.

### **2.2.3. Метод количественного определения тигогенина в листьях юкки славной и в готовом продукте**

2 г в/с измельченных и просеянных сквозь сито N 3 листьев юкки славной помещают в колбу емкостью 250 мл, заливают 100 мл смеси хлороформ-петролейный эфир (1:1) и нагревают в течение 1 часа на кипящей водяной бане; жидкость отделяют фильтрованием через стеклянный фильтр N 3 в колбу вместимостью 250 мл, и сырье промывают 50 мл хлороформа. Форэкстрагированные листья заливают 40 мл 50% этанолом, нагревают в течение 30 минут на кипящей водяной бане, приливают 8 мл конц. HCl и проводят гидролиз в продолжение 3-х часов. Еще горячую массу переносят в делительную воронку и 4-5 раз извлекают по 50 мл хлороформом. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 5 г безводного сульфата натрия и упаривают; остаток растворяют в 5 мл хлороформа, переносят

в 25 мл мерную колбу и доводят объем до метки хлороформом (раствор А).

На линии старта хроматографической пластинки размером 15x20 см, с закрепленным слоем силикагеля, отмечают 4 точки на расстоянии 3 см друг от друга. В первые две точки микропипеткой наносят по 0.5 мл раствора А, в третью 0.1 мл 1% раствора тигогенина-стандарта, а четвертую оставляют для контроля.

Пластинку высушивают на воздухе и помещают в камеру для хроматографирования со смесью хлороформ-этанол (24:1). По прохождении растворителями около 18 см, ее вынимают, выдерживают сначала на воздухе, затем в сушильном шкафу при 100°С 3-5 минут. Пластинку просматривают в УФ-свете, используя ртутно-кварцевую лампу типа ПРК ( $\lambda=248,3-577,0$  нм) или опрыскивают дистиллированной водой [66]. На уровне проявленного пятна стандартного образца тигогенина отмечают зоны на испытуемых и контрольной полосках. Пластинку снова помещают в сушильный шкаф при 100° С на 10-15 минут. Сорбент с обведенных участков тигогенина переносят в колбы с притертой пробкой вместимостью 25 мл, приливают 7 мл смеси серной кислоты и уксусного ангидрида (1:9) и выдерживают в ультратермостате в течение 1 часа при 45° С. Жидкость охлаждают до 20° С, объем в мерных колбах доводят до метки хлороформом и фильтруют. Измеряют оптическую плотность фильтратов на фотоколориметре ФЭК-56 с использованием светофильтра N 3 ( $\lambda= 400 \pm 5$ ) в кюветах с толщиной слоя 20 мм.

Содержание тигогенина в сырье должно быть не менее 1%.

0.25 г исследуемого тигогенина помещают в 25 мл мерную колбу, растворяют в хлороформе и объем доводят до метки (раствор А). Дальнейший ход анализа аналогичен описанному для сырья.

Содержание тигогенина в препарате должно быть не менее 93%.

Предложенные методы количественного анализа включены в технические условия на листья юкки славной и тигогенин [66].

**Тигогенин-стандарт.** Разработан тигогенин квалификации «чистый», применяемый в качестве стандарта при анализе тигогенина. Способ состоит в следующем: к определенному количеству тигогенина прибавляют смесь спирто-хлороформа (1:1) в соотношении к сырью 1:20. Жидкость нагревают на водяной бане до полного растворения и оставляют до следующего дня при комнатной температуре. Выделившийся на поверхности жидкости слой отфильтровывают. Фильтрат сгущают до половины объема, охлаждают и кристаллы тигогенина отделяют.

Выделенный тигогенин растворяют в пятикратном количестве смеси ксилол-петролейный эфир-изопропанол (2:5:7) и нагревают на водяной бане 20-25 мин. После охлаждения жидкости кристаллы отделяют и сушат при 80°C [67]. Очищенный вышеуказанными способами тигогенин хроматографируют на колонке с оксидом алюминия (II степени активности по Брокману) в соотношении 1:30. Колонку элюируют бензолом. Фракции, содержащие индивидуальный тигогенин, объединяют и сгущают до 1/2 объема. Выделившийся белый кристаллический осадок отделяют, перекристаллизовывают из этанола в соотношении

1:80. Таким образом получают белые игольчатые кристаллы тигогенина с т.пл. 210.5-212°C (в интервале не более 1.5°C);  $[\alpha]_D^{20}$  - 64° до 66° с содержанием основного вещества 96%.

Тигогенин квалификации «чистый» в качестве стандарта выпускается на экспериментально-производственной базе Института фармакохимии АН Грузии.

Технические условия на тигогенин квалификации «чистый» (ТУ 6-09-50-2384-81) согласованы с организацией п/я А 7316 и утверждены.

#### **2.2.4. Стероидные сапогенины цветков и бутонов юкки славной**

Как уже указывалось, юкка славная обильно цветет, образует крупные с большим числом цветков соцветия. У растений, цветущих впервые, развивается одно, а в последующие годы по 3-4 соцветия. Цветение происходит весной и осенью. Массовое цветение растений, выращенных в Грузии, наблюдается в конце мая – начале июня [68]. С одного соцветия в среднем можно собрать около 150 г в/с цветков и бутонов. Однако после увядания они опадают и остаются неиспользованными.

На 1 га плантации размещается 14 000 растений (при площади питания 0.8 x 0.8 м). Ежегодно на плантации 500 га, предусмотренной для выращивания юкки славной, можно заготовить цветки и бутоны с 7 миллионов соцветий, что при вышеуказанной урожайности даст 1645 тонн в/с сырья, из которого можно производить примерно 14 тонн тигогенина.

Это весомая сырьевая база для синтеза стероидных препаратов

В связи с этим на содержание стероидных сапогенинов изучены различные части соцветия: бутоны, цветки, увядшие цветки, прицветники, цветоножки, главная ось и боковые оси, собранные при массовом цветении – в июне и в октябре. Показано, что все части соцветия юкки славной имеют идентичный качественный состав стероидных сапогенинов; основным компонентом суммы является тигогенин, при небольшом количестве смиллагенина, гитогенина и хлорогенина. Следовательно, по составу стероидных сапогенинов соцветие аналогично листьям [69]. Перекристаллизацией суммы сапогенинов цветков получали основную массу тигогенина. Наибольшее количество тигогенина накапливается в бутонах, несколько меньше в цветках и прицветниках; сравнительно мало в увядших цветках, цветоножках, осях соцветия.

Выделение тигогенина из технической суммы цветков и бутонов осуществляется перекристаллизацией из метанола; получено 0,85% вещества с т. пл. 201-204° С,  $[\alpha]_D^{20}$  - 67,5° (с. 1.0; хлф). Из маточников, оставшихся после отделения основного количества тигогенина, адсорбционным хроматографированием на оксиде алюминия изолированы индивидуальные сапогенины: смиллагенин 0.075% с т. пл. 186-189° С,  $[\alpha]_D^{20}$  - 64° (с. 1.0; хлф); тигогенин 0.06% с т. пл. 203-205° С,  $[\alpha]_D^{20}$  - 68,5° (с. 1.0; хлф); гитогенин 0.05% с т. пл. 265-268° С,  $[\alpha]_D^{20}$  - 75° (с. 0.5; хлф).

**Таблица 2.1.** Выход тигогенина из разных частей соцветия *Yucca gloriosa* L.(в % от массы в/с сырья)

Части соцветия	Место и время сбора							
	Тбил.	Шир.	Тбил.	Шир.	Тбил.	Шир.	Тбил.	Шир.
	VI.81	VI.81	X.81	X.81	VI.82	VI.82	X.82	X.82
Бутоны	1.50	1.25	0.60	0.59	1.48	1.50	0.60	0.55
Цветки	1.00	1.10	0.25	0.31	0.95	1.00	0.30	0.22
Увявшие цветки	0.55	0.48	0.20	0.25	0.50	0.45	0.25	0.15
Прицветники	1.10	1.05	0.55	0.60	0.85	0.90	0.60	0.45
Цветоножки	0.32	0.35	0.22	0.25	0.35	0.39	0.28	0.25
Главная ось	0.15	0.24	0.10	0.14	0.20	0.28	0.15	0.10
Боковые оси	0.40	0.35	0.15	0.20	0.50	0.45	0.16	0.12

\* Средние результаты с трех образцов, в трехкратной повторности

В цветках юкки славной, собранной в Тбилиси и Шираки, содержание тигогенина установлено в пределах 1.25-1.40%.

Выделение тигогенина из цветков и бутонов осуществляется технологией его производства из листьев. При этом получен продукт до 1%, по качеству отвечающий требованиям ТУ 88 ГССР 02-79.

## 2.2.5. Растительный источник тигогенина

Для обеспечения производства тигогенина растительным сырьем стало необходимым решение вопроса промышленного разведения юкки славной. На опытных полях лекарственных растений Института фармакохимии АН Грузии Алексей Моисеевич Джорбенадзе, Алла Яковлевна

Штромберг, Бадри Лукич Григолава провели исследования по изучению биологии развития юкки славной в Восточной Грузии - в Тбилиси и Ширакской степи, с контрольными посадками в Западной Грузии – Батуми и Сухуми. Наблюдения показали, что юкка славная хорошо развивается во всех условиях, но наиболее активный рост и развитие проявляет на Ширакском участке [70, 71].



Рис. 2.2. Черенки *Yucca gloriosa* L.



Рис. 2.3. Новые посадки *Yucca gloriosa* L.

В Институте разработаны новые эффективные способы вегетативного размножения ю. славной стеблевыми и листовыми черенками, корневыми отпрысками, отрезками стволов. С одного 4-5 летнего растения можно получить свыше 30-40 черенков. Причем маточные растения еще сохраняют способность к многократному образованию отпрысков. Укоренение черенков при всех способах вегетативного размножения практически 100% [71]. Растения разводятся в виде сплошной шпалеры с площадью питания 80х80 см. Продуктивность с 1 га плантации составляет 7-8 тонн в/с листьев.

Установлены приемы возделывания, условия размножения, площади питания, нормы удобрения. Прополка, внесение удобрений и другие процессы проводятся существующими сельскохозяйственными машинами.

Уборка листьев производится ручным механизированным устройством, разработанным Грузинским сельскохозяйственным институтом. Этим институтом создана специальная конструкция машины для механизированной уборки листьев и цветков.

Агрорекомендации по возделыванию юкки славной одобрены и утверждены бывшим Всесоюзным объединением «лекраспром» Министерства медицинской промышленности. Советом министров Грузии в Восточной Грузии при Земоалванском совхозе Миньсельхоза Грузии выделено 500 га земли для промышленного разведения юкки славной, где уже созданы плантации на первом этапе на 150 га. Таким образом, решается вопрос обеспечения производства тигогенина растительным сырьем.

Выведенная Институтом фармакохимии юкка славная широко использована в озеленении города Тбилиси и его окрестностей



Рис. 2.4. Цветущая плантация *Yucca gloriosa* L.

#### **2.2.6. Динамика накопления тигогенина в юкке славной, влияние различных условий сушки на его содержание**

Изучена сезонная динамика накопления тигогенина в листьях различного возраста, распределения вещества по листовой пластинке и в различных частях соцветия, а также влияние условий сушки и срока хранения сырья.

Цельные и измельченные листья и цветки высушивали при комнатной температуре в тени, на солнце, а также в термостате при температурах 37° и 60°C. С целью определения влияния срока хранения часть высушенного сырья

измельчали, часть оставляли цельными и хранили в бумажных мешках в течение 5 лет [72-74].

Определение тигогенина в образцах проводилось весовым способом, описанным на предыдущих страницах. Результаты анализов – среднее из трех-пяти параллельных опытов сведены в таблицах 2.2., 2.3. Как видно, содержание тигогенина значительно меняется в зависимости от фазы развития растения. Наименьшее количество содержится в листьях в период зимнего покоя. Эта картина особенно выражена на материале Восточной Грузии. В сухумских и батумских образцах накопление тигогенина происходит более равномерно. С конца апреля содержание тигогенина во всех образцах заметно повышается и достигает максимума в июле-сентябре. Причем, его количество в Шираки и Тбилиси выше, чем в Батуми и Сухуми. С октября содержание тигогенина уменьшается и доходит до минимума в декабре. Наилучшие результаты получены в 1968 и 1970 годах, что, по-видимому, было обусловлено благоприятными метеорологическими условиями, сложившимися для южки – сухое, жаркое лето. Суровая зима 1969 года в Восточной Грузии с морозами в 18-20°C отрицательно отразилась на накоплении тигогенина в листьях ширакских образцов, несмотря на то, что само растение в тот год хорошо перенесло необычную для Грузии зиму [72].

Содержание тигогенина в разных частях листовой пластинки не одинаково, он в основном накапливается в средней и верхней частях, а в нижней – его количество значительно меньше.

**Таблица 2.2.** Динамика накопления тигогенина в листьях *Yucca gloriosa* L. (в % от массы в/с сырья)

Место и год сбора	Месяц сбора листьев											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<b>Тбилиси</b>												
1966	0,14	0,18	0,41	0,66	0,75	0,75	0,75	1,09	1,57	0,83	0,69	0,46
1967	0,34	0,33	0,38	0,39	0,78	0,93	1,02	1,02	0,94	0,81	0,43	0,28
1968	0,29	0,38	0,36	0,55	0,85	0,93	1,57	1,18	1,38	1,24	1,10	0,24
<b>Шираки</b>												
1969	0,22	0,31	0,58	0,47	0,46	0,17	0,47	0,96	0,42	1,69	1,68	0,27
1970	0,25	0,36	0,50	0,56	0,78	0,86	0,28	1,14	1,10	1,01	0,50	0,12
<b>Сухуми</b>												
1970	0,52	0,94	0,85	0,62	0,88	1,33	1,37	0,65	1,75	1,39	0,69	0,79
<b>Батуми</b>												
1968	0,49	0,31	0,43	0,74	0,76	0,82	1,02	1,00	1,02	1,00	1,01	0,69

Исходя из вышеизложенного, сбор листьев юкки славной для производства тигогенина можно рекомендовать в июле и сентябре. Листья нужно срезать на уровне 4-5 см от ее основания.

Анализ тигогенина в листьях растения различного возраста показал, что его количество от одного до трех лет постепенно увеличивается, а затем стабилизируется и, следовательно, эксплуатацию для промышленных целей целесообразно начинать с растения трехлетнего возраста.

Как выяснилось, условия сушки оказывают большое влияние на количество тигогенина в листьях юкки славной. Его содержание в растениях, высушенных в тени и на солнце, примерно одинаково, однако сушка на солнце, во-первых, заканчивается быстрее, а во-вторых, при этом разрушается хлорофилл, что в какой-то мере облегчает процесс выделения

тигогенина. Сушка сырья в термостате при 60°C нецелесообразна, так как приводит к снижению тигогенина. Высушивание при 37°C способствует значительному увеличению тигогенина. Но сушка длится 15-20 дней, что исключает возможность применения этих условий в промышленных масштабах [73].

Измельчение листьев, цветков и бутонов во всех вариантах сушки отрицательно влияет на содержание в них тигогенина. Отсюда заключение – сырье нужно сушить в цельном неизмельченном виде [73, 74].

Наблюдения показали, что количество тигогенина при хранении в течение пяти-шести лет цельных, неизмельченных листьев, почти не снижается.

Обращает на себя внимание высокое накопление тигогенина в листьях, высохших на нижних ярусах растения, т.е. естественно отмирающих, в 1.5-2 раза превышающее таковое в зеленых – живых листьях (табл. 2.3). В последующем нами, совместно с Ц.А. Гиоргадзе, К.Г. Гуриеладзе из листьев юкки славной был выделен фермент  $\beta$ -глюкозидаза и установлено, что он находится в эпидерме листа, тогда как стероидные сапонины локализованы в мезофилле [75]. По всей вероятности, наличие фермента и гликозидов в различных клетках живого растения способствует стабильности стероидных гликозидов, находящихся в растении в фураностаноловой форме. Можно полагать, что в случае высушивания листьев при 37°C активизируется данный фермент, замыкает фураностаноловый цикл боковой цепи стероидного кольца, переводит его в спиро-ряд, чем и вызвано повышение выхода тигогенина.

**Таблица 2.3.** Влияние условий сушки на содержание тигогенина в цельных и измельченных листьях *Yucca gloriosa* ( в % от массы в/с сырья)

Условия сушки								Листья подсох- шие на растениях
на солнце		в тени		при 37°C		при 60°C		
цель- ные	измель- ченные	цель- ные	измель- ченные	цель- ные	измель- ченные	цель- ные	измель- ченные	
1.10	0.40	0.90	0.45	1.39	0.70	0.88	0.42	1.60
0.90	0.40	0.95	0.40	2.25	1.60	0.78	0.36	2.00
1.65	0.80	1.60	0.90	2.30	1.55	1.00	0.54	2.80

Итак, изучены почти все вопросы, связанные с разведением предлагаемого нами растительного источника тигогенина – юкки славной, с оптимальными условиями ее эксплуатации и переработки [53].

Опыты, проведенные в Институте, подтвердили литературные данные о том, что юкка славная малотребовательная культура, характерной особенностью которой является чрезвычайная жизнеспособность, выражающаяся в выносливости к неблагоприятным климатическим и почвенным условиям и в легком вегетативном размножении. Растение отличается морозо- и жароустойчивостью, хорошо переносит понижение температуры до  $-26^{\circ}$  и длительную засуху.

## Литература к главе 2

1. Камерницкий А.В., Абубакиров Н.К., Горовиц М.Б., Воллернер Ю.Е., Войшвилло Н.Е., Решетова И.Г., Пасешниченко В.А. Химия спиростанолов. М., Наука, 1986, 176 с.

2. Лазурьевский Г.В., Кинтя П.К. Стероидные гликозиды ряда спиростана. – Кишинев, Штиинца, 1979, 146 с.
3. Физер Л., Физер М., Стероиды. М. Мир, 1964, 972 с.
4. Tschesche R., Ludke G., Wulf G. Steroid-Saponine mit mehr als einer zuckerkette. Sarsaparillosid ein bisdesmosidisches 22-hydroxyfurostanolsaponin. Chem. Ber., 1969, 102, 4; 1253-1269
5. Schmiedeberg O. Untersuchungen über die pharmacologischwirksamen bestandteile des Digitalis purpurea. Archiv exper. path., Pharmac. 1875, 3. 16-19
6. Kiliani H. Über Digitonin. Digitogensäure und deren oxidationsprodukte. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. 1910, 43, 3. 3562-3574
7. Tschesche R., Wulf G. Chemie und Biologie der Saponine. Forstschritte der Org. naturstoffe. 1973, 30. 461-606
8. Marker R.F., Wagner R.B., Ulshafer P.R., Wittbecker E.L., Goldsmith D.P., Ruof C.H. Steroidal saponinins. J. Amer. Chem. Soc. 1947, 69, 9, 2167-2219
9. Marker R.E., Lopez I. Steroidal saponinins. Structure of the saponin glycosides. J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 10, 2389-2392
10. Tschesche R., Ludke G., Wulf G. Über Sarsapariloside, ein saponinderivat mit bisglycosidischer furostanstructure. Tetrahedron Lett., 1967, 8, 29, 2785-2790
11. Пасешниченко В.А., Гусева А.Р. Выделение и свойства стероидных сапонинов из корневищ *Dioscorea deltoidea* Wall. – Прикладная биохимия и микробиология. 1975, 11, 1, 94-101
12. Sannie M., Heitz M., Lapin M. Chromatographie de partage sur papierdes saponinines steroliques. Comp. Rend. Hebdomadaires der Seances de L'Academie des Sciences (Paris), 1951, 233, 25, 1670-1672
13. Kiyosawa S., Hutoh N., Komori T., Nohara T., Hosokawa J., Kawasaki T. Detection of prototype compounds of diosgenin and

- other spirostanol glycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, 1969, 16, 6, 1162-1164
14. Eddy C.R., Wall M.E., Scott M.K. Katalog of infrared absorption spectra of steroidal sapogenin acetates. *Anal. Chem.*, 1953, 25, 266-271
  15. Jones N., Katzennellebogen E., Dobriner K. The infrared absorption spectra of the steroidal sapogenins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, 75, 1, 158-166
  16. Budzikiewiez H., Djerassi C., Williams D.G. Structure elucidation of natural products by mass-spectrometry. San-Francisco (Calif.); Holden-day., 1964, II, 110-120
  17. Faul W.H., Djerassi C. Mass-spectrometry in structural and stereochemical problems. The mass spectrometric fragmentations of steroidal sapogenins. *Organic mass-spectrometry*, 1970, 3, 9, 1187-1213
  18. Faul W.H., Failli A., Djerassi C. Side-chain transformation and deuterium labeling in the steroidal sapogenin series. *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 8, 2571-2585
  19. Tori K., Seo S., Terul Y., Nishikaqa J., Yasada F. Carbon-13 NMR – spectra of 5 $\beta$  – steroidal sapogenins. Reassignment of the F-ring carbon signals of (25s) – Spirostans *Tetrahedron Lett.*, 1982, 22, 25, 2405-2408
  20. Agrawal P.K., Jain D.C., Gupta R.K., Thakur R.S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. Review article. *Phytochemistry*. 1985, 24, 11, 2479-2496
  21. Eggert H., Djerassi C. <sup>13</sup>C NMR spectra of sapogenins. *Tetrahedron Lett.*, 1975, 42, 3635-3638
  22. Elgamal M.H., Bedour M.S., Duddeck H. Steroidal sapogenins. Part 16. Carbon – 13 nuclear magnetic resonance spectra of some natural synthetic steroidal sapogenins. *Ind. J. Chem.*, 1980, 19, 7, 549-551
  23. Tori K., Aono K. NMR Studies of steroids. Steroidal sapogenins and their derivatives. Shionogi Kenkyusho Nempo. 1964, 14, 1, 136-155

24. Tori K., Seo Sh., Yoshimura Y., Arita H., Tomita V. Glycosidation Shifts in carbon – 13 NMR spectroscopy: Carbon – 13 signal shifts from aglycone and glucose to glycoside. *Tetrahedron Lett.*, 1977, 18, 2, 179-182
25. Nakomori S. A rapid permetilation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxide. *J. Biochemistry (Tokyo)*, 1964, 55, 2, 205-208
26. Кочетков Н.К., Хорлин А.Я., Оводов Ю.С. Тритерпеновые сапонины. Сообщение 7. Моносахаридный состав и размер углеводной части гипсозида. *Изв. АН СССР, сер. хим.* 1964, 1, 83-89
27. Gee M. Thin layer chromatography of some methylated glycosides. *Anal. Chem.* 1963, 35, 3, 350-353
28. Ovodov J.S., Pavlenko A.F. Gas-liquid chromatography of methylated D-galactose derivatives. *J. Chromatography*, 1968, 36, 531-534
29. Kochetkov N.K., Chizhov O.S. Application of mass-spectroscopy to methylated monosaccharides identification. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 83, 1, 134-136
30. Marker R.E., Rohrmann W.E. Conversion of sarsasapogenin to pregnane – 3( $\alpha$ ), 20( $\alpha$ ) – diol. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1939, 61, 12, 3592-3593
31. Суворов Н.Н. К вопросу промышленного синтеза кортизона. – *Медиц. пром-сть СССР*. 1956, 38, 22-27
32. Суворов Н.Н., Морозовская Л.М. Стероиды. VII. О механизме превращения соласодина в ацетат  $\Delta^{5,16}$  – прегнандиенол - 3 $\beta$ -она-20. – *Ж. Орган. Химии*. 1960, 30, 6, 2062-2067
33. Лазурьевский Г.В., Кинтя П.К., Пухальская Е.Ч. Стероидные гликозиды, строение и биологическая активность. – *Хим. Фарм. ж.*, 1977, 6, 19-29
34. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н. и др. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана. – *Кишинев, Штиинца*, 1987, 141 с.

35. Четверикова Л.С., Киченко В.И., Уткин Л.М. Обследование растений флоры СССР на содержание сапонинов. – В кн.: Труды ВИЛАР, 1959, вып. 11, 202-208
36. Matthews J.S. Color reagent for steroids in thin layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* 1963, 69, 1, 163-165
37. Wall M.E., Eddy C.R., McClennan M.L., Klumpp M.E. Detection and estimation of steroidal sapogenins in plants tissue. *Anal. Chem.* 1952, 24, 1337-1341
38. Мадаева О.С., Серова Н.А., Четверикова Л.С., Шейнкер Ю.Н., Киченко В.И. Обследование некоторых сапониноносных растений на содержание стероидных сапонинов. В кн.: Труды ВИЛАР, 1959, вып. 11, 229-236
39. Пхеидзе Т.А. Выявление и изучение стероидных сапонинов некоторых растений, произрастающих в Грузии. – Сб. трудов ТНИХФИ, 1960, вып. 9, 107-117
40. Пхеидзе Т.А., Мадаева О.С. Исследование некоторых сапониноносных растений, произрастающих в Грузии. – В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1967, вып. 10, 223-237
41. Пхеидзе Т.А., Кереселидзе Е.В. Поиски произрастающих в Грузии растений, содержащих стероидные сапонины. - В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1967, вып. 10, 238-270
42. Кереселидзе Е.В., Далакишвили Ц.М., Алания М.Д., Деканосидзе Г.Е., Звиададзе Л.Д., Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П. Поиски сапонино- и гликозидо содержащих растений во флоре некоторых районов Грузии. - В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1973, вып. 12, 36-57
43. Алания М.Д., Кереселидзе Е.В., Деканосидзе Г.Е., Зурабишвили Т.С., Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П. Поиски растений, содержащих биологически активные вещества во флоре некоторых районов Западной Грузии. - В кн.:

- Биологически активные вещества флоры Грузии, 1976, вып. 13, 64-69
44. Алалия М.Д., Кереселидзе Е.В., Деканосидзе Г.Е., Анели Дж.Н., Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П. Предварительный анализ некоторых растений флоры Грузии на содержание гликозидов, флавоноидов, сапонинов. - В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1979, вып. 15, 60-86
  45. Сагареишвили Т.Г., Алалия М.Д., Пачулия К.Г. Предварительный фитохимический анализ некоторых растений, интродуцированных в Сухумском ботаническом саду. - В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1979, вып. 15, 87-101
  46. Сагареишвили Т.Г., Алалия М.Д., Россинский В.И. Предварительный фитохимический анализ некоторых интродуцированных растений на Гагрском опорном пункте – ГБС АН СССР. - В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1979, вып. 15, 102-106
  47. Алалия М.Д., Деканосидзе Г.Е., Турабелидзе Д.Г., Пхеидзе Т.А., Сутиашвили М.Г., Анели Дж.Н., Кемертелидзе Э.П. Предварительный фитохимический анализ растений флоры Грузии на содержание некоторых биологически активных соединений. - В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии, 1987, вып. 16, 10-51
  48. Дендрофлора Кавказа. – Тбилиси, изд-во АН Грузии, 1959, т. 1. 406 с.
  49. Деревья и кустарники СССР. – М.-Л.: АН СССР, 1951. Т. 2, 610 с.
  50. Качалов А.А. Деревья и кустарники. – М.: Лесная промышленность. 1970. 407 с.
  51. Пилипенко Ф.С. Иноземные деревья и кустарники на Черноморском побережье Кавказа. – Л., Наука, 1978. 292 с.

52. Одишария К.Ю. Главнейшие вечнозеленые покрытосеменные растения Черноморского побережья Кавказа. – С.: Изд-во АН Грузии. 1959. 361 с.
53. Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А. Стероидные соединения некоторых растений, произрастающих в Грузии. 1993, Тб., «Мецниереба», 184 с.
54. Wall M.E., Eddy C.R., Serota S., Miminger R.E. Steroidal sapogenins. Markogenin (22b-spirostane – 2, 3β – diol). A new sapogenin isolated from *Yucca*. J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 8, 4437-4440
55. Marker R.E., Wagner R.B., Ulshafer P.R., Wittbecker E.L., Goldsmith P.Y., Ruof C.H. Isolation of the Sapogenins. J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 9, 2220-2230
56. Takeda K., Okanishi T., Shimaoka A. Studies of the steroidal components of domestic plants. Constituents of *Yucca* species. Chemical and Pharmac. Bull., 1954, 2, 2, 178-182
57. Мадаева О.С. Стероидные сапогенины, III. Сапогенины корневищ и листьев *Yucca filamentosa* с Черноморского побережья Кавказа. – Журн. общ. химии. 1958, 28, 2, 551-556
58. Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А. Тигогенин из юкки славной – возможное сырье для синтеза стероидных гормональных препаратов. – Хим. фарм. журн., 1972, 12, 44-47
59. Меньшова Н.И., Сорокина Н.П., Гриненко Г.С., Суворов Н.Н., Гуревич Ю.Р., Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А. О получении 16α-метил-5α-прегнандиол - 3β, 17α – она-20-полупродукта синтеза дексаметазона. – Хим. фарм. журн., 1974, 7, 15-17
60. Kemertelidze E., Pkheidze T., Grinenko G., Menshova N. Tigogenin, a vegetable raw-material for synthesis of steroidal Structures preparations. Planta Med. 1979, July, 16-22, 265-266
61. Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А., Карчхадзе М.Г., Бочорисвили Б.С. Получение тигогенина на полупромышленных установках. – Сообщ. АН Грузии, 1972, 3, 66, 605-608

62. Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А., Чирикашвили М.Г., Гоциридзе А.В., Карчхадзе М.Г., Джорбенадзе М.А. Способ получения тигогенина. – Ав. св. СССР № 1113940, с приор. от 19. 07. 82 г.
63. Кемертелидзе Э.П., Чирикашвили М.Г., Гоциридзе А.В., Пхеидзе Т.А., Карчхадзе М.Г., Джорбенадзе М.А. – Ав. св. СССР № 1406848, с приор. от 1. 08. 85 г.
64. Кемертелидзе Э.П., Чирикашвили М.Г., Пхеидзе Т.А., Гоциридзе А.В., Карчхадзе М.Г. Способ получения тигогенина. – Ав. св. СССР № 1113940
65. Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П. Способ обнаружения сопутствующих веществ в тигогенине. – Хим. фарм. журн., 1976, 1, 127-128
66. Сулаквелидзе Ц.П., Кемертелидзе Э.П., Чирикашвили М.Г. Способ определения стероидных сапонинов и сапогенинов. – Ав. св. СССР № 1043560, Бюл. 1983 № 35.
67. Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П., Элисабедашвили Т.А., Сепашвили И.Н. Способ получения тигогенина. – Ав. св. СССР № 549154, с приор. от 27. 10. 75. Бюл. № 9, 05.03.77.
68. Штромберг А.Я., Мурадбекова А.С. Влияние метеорологических факторов на рост соцветия и динамику цветения юкки славной. – В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии. 1976, вып. 14, 50-53
69. Бенидзе М.М. Стероидные соединения листьев юкки алоелистной и цветков юкки славной. – Автореферат. Канд. диссертация, Тбилиси, 1989
70. Джорбенадзе А.М., Штромберг А.Я., Какулия А.В. Опыт культивирования юкки славной в Ширакской степи. – Сообщ. АН Грузии. 1969, 54, 2, 365-368
71. Штромберг А.Я., Джорбенадзе А.М. Опыт культивирования юкки славной в Восточной Грузии. – Раст. ресурсы. 1970, 1, 97-103

72. Пхеидзе Т.А., Кереселидзе Е.В., Кемертелидзе Э.П. Динамика накопления тигогенина в листьях юкки славной. – В кн.: Биологически активные вещества флоры Грузии. 1976, вып. 13, 35-43
73. Пхеидзе Т.А., Леселидзе Э.М., Григолава Б.Л., Кемертелидзе Э.П. Влияние условий сушки на содержание тигогенина в листьях *Yucca gloriosa* L. – Изв. АН Гр., сер. хим., 1980, 1, 85-87
74. Пхеидзе Т.А., Бенидзе М.М., Кемертелидзе Э.П. Стероидные сапогенины соцветия *Yucca gloriosa*. - Раст. ресурсы. 1985, вып. 4, 452-455
75. Giorgadze T.A., Kemertelidze E.P., Akhvlediani K. Sh., Gurielidze K.G. Glycohydrolases from *Yucca gloriosa* Leaves – Доклады на V международной конференции по химии и биотехнологии на биологично активный продукты. 1989, 1, 499-501, с/o Jusautov, Sofia.
76. Кемертелидзе Э.П., Качухашвили Т.Н., Пхеидзе Т.А., Умикашвили Р.С., Турова А.Д., Соколова Л.Н. Новый антисклеротический препарат трибуспонин. Химико-фармац. журнал, 1982, 161, 119-122.

### Глава 3. Химический состав отдельных органов *Yucca gloriosa* L.

Предыдущие главы представленной книги в основном посвящены изучению вопросов, связанных с использованием стероидного сапогенина – тигогенина из листьев интродуцированной в Грузии *Yucca gloriosa* – юкки славной в качестве исходного сырья в синтезе стероидных гормональных препаратов. Предпосылкой этого явилось то обстоятельство, что в листьях данного растения биосинтезируются стероидные гликозиды в основном одного сапогенина – тигогенина. Необходимость требовала разработки оптимальной технологии выделения из растений тигогенина, выяснения периодов его накопления и обеспечения прочной сырьевой базой производства тигогенина.

Безусловный интерес представляет изучение стероидных гликозидов самого растения по отдельным его вегетативным органам, тем более, что произрастающие в разных климато-географических условиях растения в различных зонах могут иметь отличительный химический состав. В данной главе будут приведены исследования по указанным вопросам.

Для изучения химического состава стероидных гликозидов отдельных органов юкки славной сырье заготавливалось на Тбилисском и Ширакском опытных полях лекарственных растений Института фармакохимии им. И.Г. Кутателадзе, начиная с 1995 по 2014 гг., по мере возможности проведения экспериментов. Переработка растительного сырья, выделение и разделение стероидных гликозидов на отдельные компоненты проводились в Институте фармакохимии, а спектральные анализы веществ, из-за неимения в

Тбилиси соответствующей современной аппаратуры, проводили в Италии, в Департаменте фармацевтической науки Университета Салерно и в Австрии, в Департаменте фармакогнозии Института фармации при Университете Иннсбрука.

### 3.1. Стероидные гликозиды листьев *Yucca gloriosa* L.

200 г в/с измельченных листьев юкки славной экстрагировали 80 % метанолом один раз при комнатной температуре, дважды нагреванием на водяной бане. Из объединенных экстрактов спирт отгоняли, водную жидкость очищали от липофильных веществ хлороформом и извлекали н-бутанолом. После отгонки бутанола получено 11 г суммы стероидных гликозидов в виде желтоватого порошка. 1 мг суммы подвергнут HPLC/MS/MS анализу на Thermo Finnigan LCQ Deca ion trap mass-spectrometry. HPLC проведена на колонке с обратной фазой силикагеля (5 мм, 2.1x250мм; XTerra MS C18, Waters, Milford, MA); мобильная фаза: H<sub>2</sub>O(A) и CH<sub>3</sub>CN (B) при скорости течения 0,2 мл/мин; градиентные условия: 0 мин. – 5 % B, 55 мин. – 60 % B, 60 мин. – 90 % B.

По данным HPLC/MS/MS анализа в экстракте листьев показано наличие 24 стероидных гликозидов. Как видно из таблицы 3.1., после MS<sub>n</sub> гликозидов **1-10**, **17**, **19** и **24** фрагменты воды и гексозы (m/z18 и m/z162) были отщеплены, что характерно для фураностанолов, имеющих свободный гидроксил по C-22 и глюкозу при C-26. Все гликозиды кроме 10, 23 и 24 содержат 4-7 моносахаров при C-3 агликона.

**Таблица 3.1.** HPLC/ESIMS и ESIMS/MS фрагментированные ионы экстракта в/с листьев *Yucca gloriosa*

	Молекулярные ионы* время удерживания, мин	MS <sub>(n)</sub> фрагментированные ионы
1	1715 [M+H] <sup>+</sup> , F 22.49	1535 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1389 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 1373[M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 741[M-18-162x4-146+H] <sup>+</sup>
2	1407 [M+H] <sup>+</sup> , F 22.59	1227 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1081 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 1065 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 595 [M-18-162x4-146+H] <sup>+</sup> ; 433 [M-18-162x5-146+H] <sup>+</sup>
3	1377 [M+H] <sup>+</sup> , F 22.79	1197 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1051 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 1035 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 595 [M-18-162x3-146-132+H] <sup>+</sup>
4	1525 [M+H] <sup>+</sup> , F 26.68	1345 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1213 [M-18-162-132+H] <sup>+</sup> ; 1183 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 1051 [M-18-162x2-132+H] <sup>+</sup> ; 919 [M-18-162x2-132x2+H] <sup>+</sup> ; 433 [M-18-162x5-132x2+H] <sup>+</sup>
5	1553 [M+H] <sup>+</sup> , F 30.36	1373 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1227 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 1211 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 579 [M-18-162x5-146+H] <sup>+</sup>
6	1509 [M+H] <sup>+</sup> , F 32.20	1329 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1197 [M-18-162-132+H] <sup>+</sup> ; 1167 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 903 [M-18-162x2-132x2+H] <sup>+</sup>
7	1523 [M+H] <sup>+</sup> , F 33.10	1343 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1197 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 1181 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 903 [M-18-162x3-146+H] <sup>+</sup>
8	1245 [M+H] <sup>+</sup> , F 34.49	1065 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 903 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 741 [M-18-162x3+H] <sup>+</sup>
9	1215 [M+H] <sup>+</sup> , F 34.92	1035 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 903 [M-18-162-132+H] <sup>+</sup> ; 741 [M-18-162x2-132+H] <sup>+</sup>

Таблица 3.1. Окончание

10	921 [M+H] <sup>+</sup> , F 35.74	741 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 417 [M-18-162x3+H] <sup>+</sup>
11	1197 [M+H] <sup>+</sup> , S 36.30	1051 [M-146+H] <sup>+</sup> ; 1035 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 595 [M-146-162x2-132+H] <sup>+</sup>
12	1065 [M+H] <sup>+</sup> , S 36.77	741 [M-162x2+H] <sup>+</sup>
13	1227 [M+H] <sup>+</sup> , S 37.03	1081 [M-146+H] <sup>+</sup> ; 1065 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 433 [M-146-162x4+H] <sup>+</sup>
14	1345 [M+H] <sup>+</sup> , S 37.29	1213 [M-132+H] <sup>+</sup> ; 1183 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 1051 [M-18-162x2-132+H] <sup>+</sup> ; 433 [M-132x2-162x4+H] <sup>+</sup> ;
15	1035 [M+H] <sup>+</sup> , S 37.39	741 [M-132-162+H] <sup>+</sup>
16	1329 [M+H] <sup>+</sup> , S 37.54	1197 [M-132+H] <sup>+</sup> ; 1167 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 903 [M-132x2-162+H] <sup>+</sup>
17	1391 [M+H] <sup>+</sup> , F 37.63	1211 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1065 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 1049 [M-18-162x2-146+H] <sup>+</sup> ; 741 [M-18-162x3-146+H] <sup>+</sup>
18	1373 [M+H] <sup>+</sup> , S 37.95	1227 [M-146+H] <sup>+</sup> ; 1211 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 579 [M-146-162x4+H] <sup>+</sup>
19	1361 [M+H] <sup>+</sup> , F 38.36	1181 [M-18-162+H] <sup>+</sup> ; 1035 [M-18-162-146+H] <sup>+</sup> ; 989 [M-18-162x2+H] <sup>+</sup> ; 741 [M-18-162x2-146-132+H] <sup>+</sup> ; 579 [M-18-162x3-146-132+H] <sup>+</sup>
20	1343 [M+H] <sup>+</sup> , S 38.70	1197 [M-146+H] <sup>+</sup> ; 1181 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 903 [M-146-162x2+H] <sup>+</sup>
21	1211 [M+H] <sup>+</sup> , S 39.16	1065 [M-146+H] <sup>+</sup> ; 1049 [M-146-162+H] <sup>+</sup> ; 579 [M-146-162x3+H] <sup>+</sup>
22	1181 [M+H] <sup>+</sup> , S 39.58	1035 [M-146+H] <sup>+</sup> ; 989 [M-162+H] <sup>+</sup> ; 741 [M-146-162-132+H] <sup>+</sup> ;
23	741 [M+H] <sup>+</sup> , S 40.25	417 [M-162-162+H] <sup>+</sup>
24	597 [M+H] <sup>+</sup> , F 41.52	579 [M+H-18] <sup>+</sup> ; 417 [M-18-162+H] <sup>+</sup>

\* F – фураностанол; S – спиростанол.

5 г бутанольный экстракт в/с листьев юкки славной, предварительно форэкстрагированный хлороформом, хроматографировали на колонке силикагеля (L 100/160) с использованием мобильной фазы хлороформ-метанол-вода 26:14:3. В результате изолированы гликозиды **11** (19 мг), **15** (10 мг), **18** (27 мг), **20** (7 мг), **21** (32 мг), **22** (8 мг), **23** (20 мг) и обогащенные фракции А (152 мг), В (203 мг) и С (185 мг). HPLC анализом на колонке с обратной фазой силикагеля (7,8 x 300мм, LiChroprep RP18, 10 мм, XTerra) при разных концентрациях метанола в изократных условиях при скорости течения 2 мл/мин из обогащенных фракций были получены 7 индивидуальных фураностаноловых гликозидов. Из фракции А (65% MeOH) **10** (8 мг) и **24** (17 мг); из В (60% MeOH) **17** (12 мг) и **19** (5 мг); из С (57% MeOH) **1** (14 мг) и **5** (9 мг).

С помощью моно- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ID-JOCSY) и двухмерным ЯМР (HSQC, HMBC, COSY) экспериментов 10 гликозидов оказались известными соединениями со следующими структурами:

– (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-5 $\alpha$ -фуростан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ , 26-триол 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-5 $\alpha$ -фуростан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ , 26-триол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-5 $\alpha$ -фуростан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ , 26-триол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол, 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол, 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ ,2 $\alpha$ -диол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид-юккалоезид В;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид;

– (25R)–5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)]-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид-юккалоезид С [1-8].

Вещества **18** и **21** оказались юккалоезидами В и С, впервые выделенными нами из листьев *Yucca aloifolia* – юкки аллоэлистной [6].

Вещества, соответствующие гликозидам **1**, **5**, **19** и **24**, не описаны в литературе и являются новыми соединениями.

Фуростанол **1** – белый аморфный порошок, дает положительную реакцию с реактивом Эрлиха. Кислотный гидролиз: 10 мг вещества нагревали с 8 мл 1,0 n HCl при 95°C в течение 3 часов. Выпавший после охлаждения жидкости осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и высушивали. Получали 2 мг агликона в виде белого кристаллического порошка, с т.пл. 201-204°C. В ИК-спектре (KBr)  $\nu_{\max}$  см<sup>-1</sup> отмечены полосы поглощения: 3300 (ОН), 1030, 993, 958, 921, 895, 866; 921 < 895 (25 R). На ТСХ проявляется одно пятно на уровне тигогенина – стандарта. Смешанная проба с тигогенином не вызывает депрессию т. пл. и обнаруживается в виде неразделимого пятна. Итак, агликон фуростанола **1** идентифицирован как тигогенин. После отделения агликона фильтрат нейтрализовали на ионно-обменной колонке КУ-3, высушивали, растворяли в 1-2 капле водного метанола, наносили на Б/Х и хроматографировали в системе пиридин – бензол – бутанол – вода (5:1:5:3); проявитель: анилин – фталат. Моносахариды обнаружены на уровне: D-глюкозы, D-галактозы и L-рамнозы.

MS фуростанола **1** показывает пик положительного иона  $m/z$  1715  $[M+H]^+$  и фрагменты  $m/z$  1697  $[M+H-18]^+$ ,  $m/z$  1535  $[M+H-18-162]^+$ ,  $m/z$  1389  $[M+H-18-162-146]^+$ ,  $m/z$  1227  $[M+H-18-162x2-146]^+$ ,  $m/z$  417  $[M+H-18-162x7-146]^+$ , что соответствуют молекулярной формуле C<sub>75</sub>H<sub>126</sub>O<sub>43</sub>. В <sup>1</sup>H ЯМР спектре видны два синглета третичных метилов  $\delta$  0.82 (Me-18, с),  $\delta$  0.86 (Me-19, с), два дублета вторичных метилов  $\delta$  0.94 (Me-21, д),  $\delta$  1.00 (Me-27, д), два вторичных  $\delta$  3.68 (H-3, м),  $\delta$  4.56 (H-16), два сигнала первичной алкогольной функции  $\delta$  3.39 (H-26a, дд),  $\delta$  3.75 (H-26b, дд) и восемь аномерных сигналов  $\delta$  4.51 (H-1, Glc I), 5.03 (H-1, Glc II), 4.93 (H-1, Glc

III), 4.85 (H-1, Rha), 4.71 (H-1, Glc IV), 4.60 (H-1, Glc V), 4.38 (H-1, Gal), 4.25 (H-1, Glc VI). Состав углеводной части установлен с помощью 1D-TOCSY экспериментов (Таблица 3.3.).

**Таблица 3.2.**  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР химические сдвиги агликона фуростанола **1** - тигогенина

№	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	№	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	38.1	1.74-1.00	15	32.7	1.96-1.23
2	30.2	1.87-1.54	16	81.9	4.56
3	78.9	3.68	17	63.7	1.78
4	34.6	1.70-1.33	18	16.2	0.82
5	45.7	1.11	19	12.3	0.86
6	29.4	1.32	20	40.2	2.11
7	32.9	1.72-0.95	21	16.5	0.94
8	36.0	1.60	22	111.8	-
9	55.5	0.69	23	32.6	1.80-1.41
10	36.3	-	24	28.6	1.67-1.20
11	21.4	1.54-1.35	25	37.3	1.74
12	40.5	1.76-1.16	26	75.8	3.75-3.39
13	41.7	-	27	15.6	1.00
14	57.2	1.15			

Агликон  $5\alpha$ -ряда, что доказывается наличием химических сдвигов  $\delta$  38.1; 45.7; 55.5, соответствующих C-1, C-5 и C-9 углеродным атомам. Разница сигналов парных протонов H2-26=0.36  $^1\text{H}$  ЯМР спектре указывает, что метильная группа при C-25 имеет R-конфигурацию. Глюкоза в положении C-26 найдена с помощью НМВС корреляцией между аномерным протоном глюкозы  $\delta$  4.25 (H-1, Glc VI) и C-26 атомом агликона ( $\delta$  75.8) (Таблица 3.2.). В НМВС спектре показаны значительные корреляционные пики между аномерными сигналами сахара и гликозилированным углеродом:  $\delta_{\text{H}}$  4.51 (H-1, Glc I)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  87.2 (C-3, Glc II),  $\delta_{\text{H}}$  5.03 (H-1, Glc II)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  80.4 (C-4, Glc III),  $\delta_{\text{H}}$  4.93 (H-

1, Glc III)→  $\delta_C$  80.6 (C-2, Glc V),  $\delta_H$  4.85 (H-1, Rha)→  $\delta_C$  78.9 (C-4, Glc IV),  $\delta_H$  4.71 (H-1, Glc IV)→ $\delta_C$  87.6 (C-3, Glc V),  $\delta_H$  4.60 (H-1, Glc V)→  $\delta_C$  79.7 (C-4, Gal),  $\delta_H$  4.38 (H-1, Gal)→  $\delta_C$  78.9 (C-3, Agl ),  $\delta_H$  4.25 (H-1, Glc VI)→  $\delta_C$  75.8 (C-26, Agl).

**Таблица 3.3.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР химические сдвиги моносахаридов фураностанола **1**

№	рамноза		глюкоза I		глюкоза II		глюкоза III	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4.85	102.2	4.51	105.6	5.03	103.3	4.93	103.7
2	3.84	71.9	3.26	77.4	3.39	74.6	3.19	74.9
3	3.63	75.0	3.37	77.7	3.53	87.2	3.37	71.1
4	3.41	73.2	3.29	75.6	3.43	69.3	3.78	80.4
5	3.98	70.2	3.30	74.8	3.37	77.7	3.35	70.3
6	1.27	17.5	3.92	62.2	3.91	62.2	3.91	62.2
			3.78		3.82		3.83	
	глюкоза IV		глюкоза V		галактоза		глюкоза C-26	
№	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4.71	103.6	4.60	104.1	4.38	102.0	4.25	104.0
2	3.30	74.8	3.79	80.6	3.62	72.7	3.19	74.9
3	3.48	76.4	3.78	87.6	3.53	75.0	3.37	77.6
4	3.55	78.9	3.44	77.7	4.04	79.7	3.28	71.1
5	3.53	70.4	3.36	74.3	3.64	71.7	3.29	77.5
6	3.93	60.8	3.88	62.3	3.91	62.2	3.91	62.4
	3.63		3.67		3.82		3.72	

На основании полученных данных фураностанол **1** охарактеризован как: (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-5 $\alpha$ -фураностан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1→4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→3) -O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил -(1→2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид [7].

Установление структуры других новых фураностанолов проведено по аналогичной схеме. Мы привели спектральные данные только одного гликозида с более богатой углеводной части фураностана **1**.

Фураностан **5** – белый аморфный порошок с положительной реакцией Эрлиха. Кислотным гидролизом вещества получен тигогенин (1.2 мг) и обнаружены моносахариды D-глюкоза, L-рамноза и D-галактоза. MS показывает пик положительного иона  $m/z$  1553  $[M+H]^+$  и фрагменты  $m/z$  1373  $[M-18-162+H]^+$ , 1227  $[M-18-162-146+H]^+$ , 1211  $[M-18-162 \times 2+H]^+$ , 579  $[M-18-162 \times 5-146+H]^+$ , соответствующие молекулярной формуле  $C_{69}H_{116}O_{38}$ . К агликону в положении C-3 присоединены 5-окси- и один дезокси-сахара с аномерными сигналами  $\delta$  4.78 (H-1 Rha), 5.05 (H-1, Glc I), 4.92 (H-1, Glc II), 4.70 (H-1, Glc III), 4.62 (H-1 Glc IV), 4.39 (H-1 Gal). Сахарная цепь, связанная с агликоном, аналогична фураностанолу **1**, лишенному одной глюкозы.

Структура фураностанола **5** интерпретирована как: (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-5 $\alpha$ -фураностан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид [7].

Фураностанол **19** – белый аморфный порошок, дающий положительную реакцию Эрлиха. Кислотным гидролизом 4 мг вещества образовались тигогенин (1.0 мг) и моносахариды D-глюкоза, D-ксилоза, D-галактоза и L-рамноза. MS показывает пик положительного иона  $m/z$  1361  $[M+H]^+$  и фрагменты  $m/z$  1181  $[M-18-162+H]^+$ , 579  $[M-18-162 \times 3-146-132+H]^+$ , соответствующие молекулярной формуле  $C_{62}H_{104}O_{32}$ . Они отличаются от фураностанола **5** составом и

замещением сахаров при С-3.  $^1\text{H}$  ПМР спектр показывает аномерные сигналы 6 сахаров:  $\delta$  4.72 (H-1, Rha), 4.50 (H-1, Xyl), 4.90 (H-1, Glc I), 4.62 (H-1, Glc II), 4.39 (H-1, Gal) и 4.26 (H-1 Glc III). В НМВС спектре видны значительные корреляционные пики между аномерными сигналами сахаров и гликозилированным углеродом:  $\delta_{\text{H}}$  4.90 (H-1, Glc I)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  80.4 (C-2, Glc II),  $\delta_{\text{H}}$  4.72 (H-1, Rha)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  75.9 (C-4, Xyl),  $\delta_{\text{H}}$  4.50 (H-1, Xyl)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  87.8 (C-3, Glc II),  $\delta_{\text{H}}$  4.62 (H-1, Glc II)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  79.6 (C-4, Gal),  $\delta_{\text{H}}$  4.39 (H-1, Gal)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  78.7 (C-3, Agl),  $\delta_{\text{H}}$  4.26 (H-1, Glc III)  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  75.6 (C-26, Agl).

В результате фурустанол **19** охарактеризован как (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил 5 $\alpha$ -фурустан 3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3) – [O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид [2].

Фурустанол **24** – белый аморфный порошок с положительной реакцией Эрлиха. Кислотным гидролизом 10 мг вещества получены 7 мг тигогенина и D-глюкоза. MS показывает пик положительного иона  $m/z$  597  $[\text{M}+\text{H}]^+$  и фрагменты  $m/z$  579  $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ ,  $m/z$  417  $[\text{M}+\text{H}-18-162]^+$ , молекулярная формула  $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_9$ . В  $^1\text{H}$  ПМР спектре показаны два синглета третичных метилов  $\delta$  0.84 (Me-18, с), 0.88 (Me-19, с), два дублета вторичных метилов  $\delta$  0.98 (Me-21, д), 1.02 (Me-27, д), два вторичных  $\delta$  3.53 (H-3, м), 4.38 (H-16), две первичных алкогольных функции  $\delta$  3.41 (H-26a, дд),  $\delta$  3.77 (H-26b, дд) и аномерный сигнал глюкозы  $\delta$  4.27 (H-1, Glc, д). Замещение глюкозы в позиции С-26 установлено с НМВС корреляцией между аномерным протоном глюкозы и С-26 углеродного атома, агликона ( $\delta_{\text{C}}$  75.8).

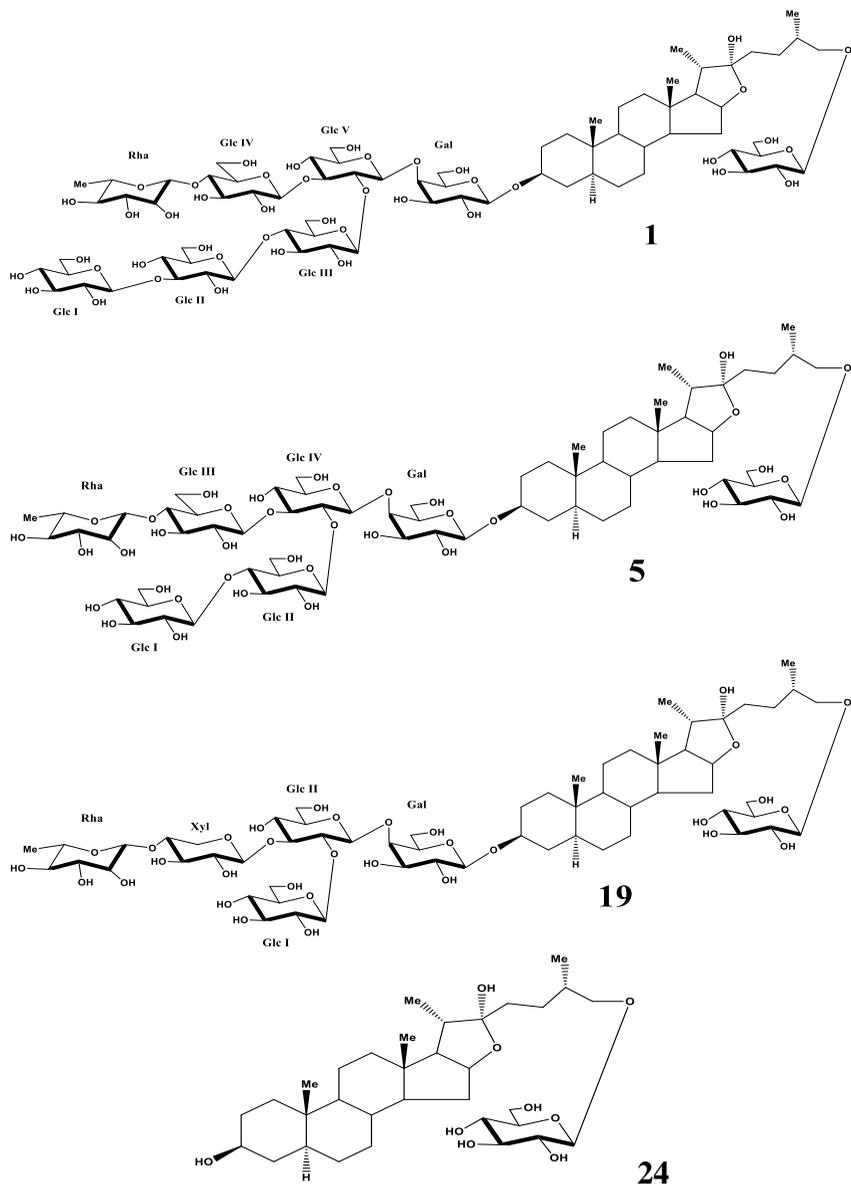


Рис. 3.1. Структуры новых гликозидов (вещств 1, 5, 19, 24)  
листьев *Yucca gloriosa*

Для фураностанола **24** предложена следующая структура: (25R)-5 $\alpha$ -фураностан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид [7].

Итак, отмечено интересное и богатое содержание стероидных гликозидов в листьях юкки славной, культивируемой в Грузии. Из 24 гликозидов 13 оказались фураностанолами, 11 – спиростанолами. Из выделенных и идентифицированных гликозидов 13 производные тигогенина, среди них 7 фураностаноловых и 6 спиростаноловых, один спиростан производный тигогенина. В углеводной части веществ доминирующий сахар глюкоза; также встречаются галактоза, рамноза и ксилоза. Все 4 новых гликозида оказались фураностанолами производными тигогенина с 1, 6, 7, 8 молекулами сахаров. Отмечается значительное количество полярных гликозидов. В числе гликозидов листьев 1 монозид, 2 биозиды, 4 тетраозиды, 10 пентаозидов, 6 гексаозидов и 1 гептаозид. Интересное содержание гликозидов листьев юкки славной создает значительную перспективу для дальнейшего их исследования и использования.

### **3.2. Стероидные гликозиды цветков и бутонов**

#### ***Yucca gloriosa* L.**

*Yucca gloriosa* – прекрасное декоративное растение; 1-2 м с длинными обильно цветущими белыми цветками и бутонами соцветиями.

После увядания цветки и бутоны опадают и являются неиспользованными отходами. Как было показано в главе 2, содержание в них тигогенина составляет 1.25-1.48 %. Все части соцветия имеют одинаковый состав сапогенинов.

Выделение из них тигогенина намного проще, чем из листьев из-за сравнительно меньшего содержания липофильных веществ и мягкости сырья. Они рекомендованы в качестве дополнительного источника производства тигогенина.

Данная часть касается изучения химического состава цветков на содержание стероидных гликозидов и выявления возможности их использования.

По методу, аналогичному для листьев, из цветков и бутонов получена сумма стероидных гликозидов в количестве 8 %. В результате многократного хроматографирования на колонке с силикагелем (КСК 50/90) при элюировании системой хлороформ-метанол-вода (65:35:8) выделены 8 индивидуальных гликозидов. В ИК-спектре веществ **1-6** появляются полосы поглощения в области  $850-980\text{ см}^{-1}$ , характерные для спиростаноловых форм, а в случае гликозидов **7-8** – уширенная полоса, указывающая на фураностаноловых гликозидов [8].

Кислотным гидролизом гликозидов **1-8** по 0.1 г выделены агликоны из гликозида **1** – смилагенин, гликозидов **2, 3, 5, 6, 7, 8** – тигогенин, а гликозида **4** – гитогенин. В углеводной части идентифицированы: **1** – глюкоза и галактоза; **2** – ксилоза, глюкоза и галактоза; гликозидах **3, 5, 7, 8** – глюкоза, галактоза и рамноза; **4, 6** – глюкоза, галактоза, рамноза и ксилоза.

С помощью  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектральных анализов доказано, что все изолированные гликозиды являются известными соединениями со следующими химическими строениями:

Гликозид **1** - (25 R)-5 $\beta$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D- галактопиранозид - юккалоезид А [9];

Гликозид **2** - (25 R)-5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D- глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -

D-глюкопиранозил-(1→4)-β-D-галактопиранозид - дегалакто-тигонин [4];

Гликозид **3** - (25 R)-5α-спиростан-3β-ол 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D- галактопиранозид - юккалоезид В [6];

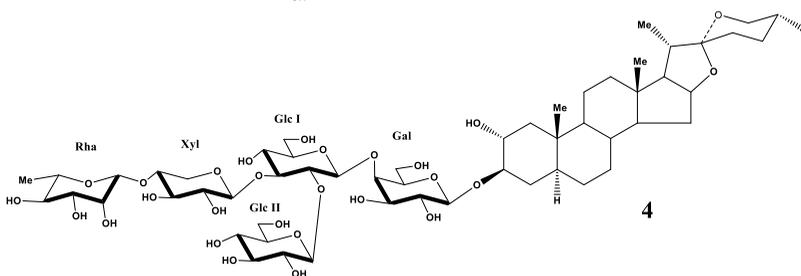
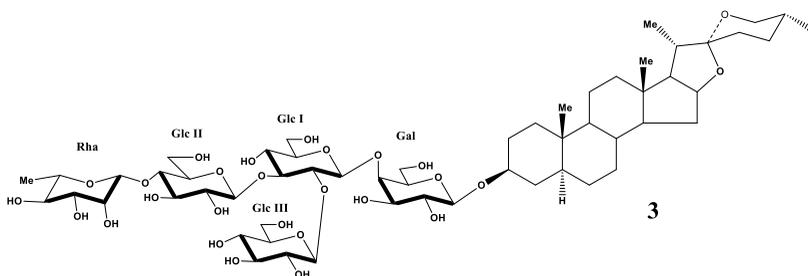
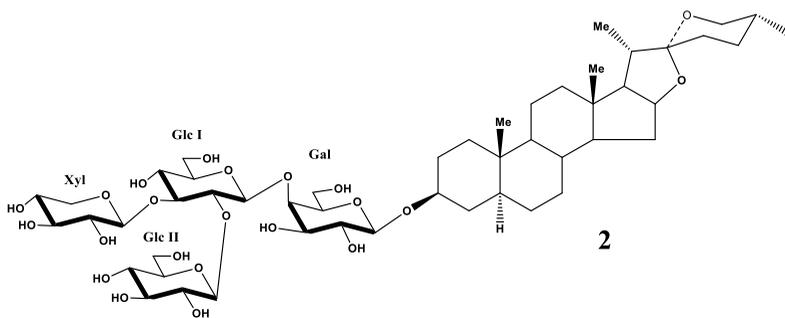
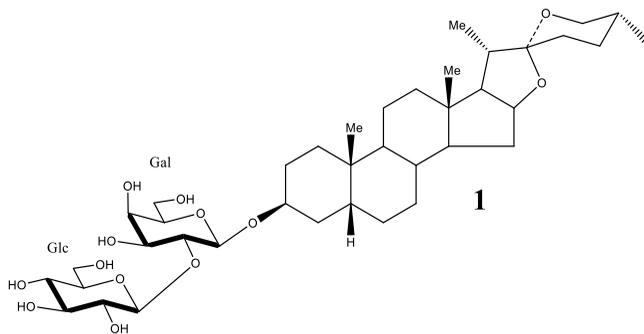
Гликозид **4** - (25 R)-5α-спиростан-2α,3β-диол 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид [7, 10];

Гликозид **5** - (25 R)-5α-спиростан-3β-ол 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид - юккалоезид С [6];

Гликозид **6** - (25 R)-5α-спиростан-3β-ол 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид - юккалоезид Е [4];

Гликозид **7** - (25 R)-26-O-β-D-глюкопиранозил-5α-фурустан-3β,22α,26-триол 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)]-O-β-D-галактопиранозид [7];

Гликозид **8** - (25 R)-26-O-β-D-глюкопиранозил-5α-фурустан-3β, 22α,26-триол 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3) O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид [7].



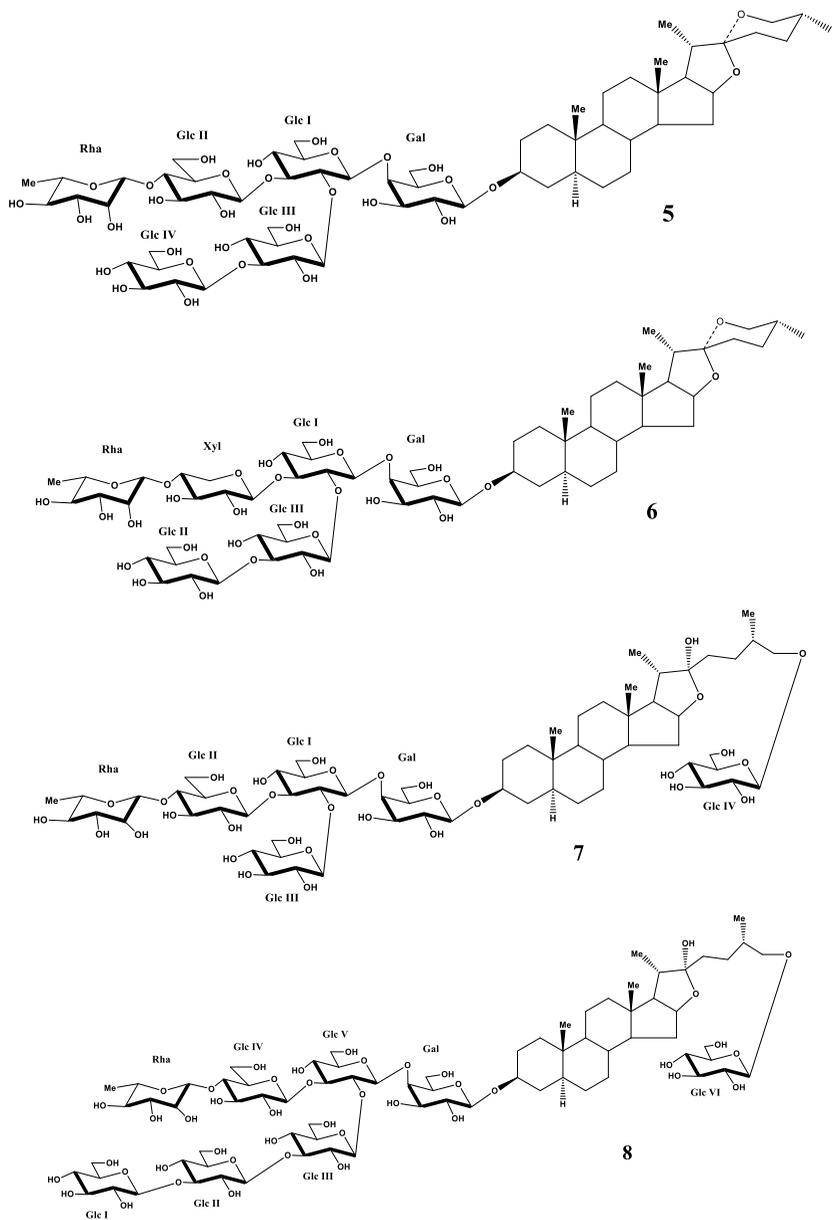


Рис. 3.2. Структуры гликозидов (веществ 1-8) цветков и бутонов *Yucca gloriosa*

Итак, из цветков юкки славной выделены 8 стероидных гликозидов, 6 спиростаноловые – 1 производный смилагенина, 1 – тигогенина, 4 тигогенина, 2 фуростаноловые гликозиды производные тигогенина.

### **3.2.1. Препарат «Алексин» из стероидных гликозидов цветков и бутонов юкки славной – стимулятор роста и развития растений**

Стероидные гликозиды – поверхностно активные вещества – характеризуются мембранотропными свойствами; они действуют на клеточные мембраны, повышают их проницаемость и регулируют водно-солевой обмен, включаются в метаболические процессы роста растений и выполняют биорегуляторные функции в обмене веществ, а при введении в культурные растения, действуют подобно фитогормонам, хотя по химической природе резко отличаются от них. Это и дает возможность использования стероидных сапонинов в аллелопатии – воздействии растительных веществ на развитие растений для повышения их устойчивости, урожайности и создания экологически чистой агросистемы.

В этом направлении был изучен суммарный препарат стероидных гликозидов цветков и бутонов юкки славной, названный нами «Алексином» в честь заслуженного агронома Грузии Алексея Моисеевича Джорбенадзе, который внес значительный вклад в изучение биологии развития юкки славной и создания промышленных плантаций растения.

В лаборатории физических методов Научного центра сельскохозяйственной биотехнологии Грузии Г.И. Данелия и М.Д. Канделаки установили, что предпосевная обработка

семян пшеницы, ячменя, фасоли, сои, рапса, помидора низкими концентрациями водных растворов алексина значительно повышает энергию и способность их всхожести, способствует ускорению и улучшению развития корневой системы, увеличению высоты проростков, количества боковых корней и т.п. Причем высокие показатели сохраняются и в условиях солевого стресса. В параллельных опытах с известным биорегулятором растений гибберелином по всем параметрам показано превосходство алексина [11, 12].

Под действием алексина в растениях наблюдается активирование ферментативных процессов, идущих с участием радикальных пар, происходит более интенсивный гидролиз запасных питательных веществ и энергично растут молодые проростки. Более крепкие и хорошо развитые растения обладают повышенной устойчивостью к абиотическим условиям внешней среды. Их фотосинтетический аппарат интенсивно поглощает энергию, которая в дальнейшем используется для синтеза органических соединений, что, в конечном счете, приводит к повышению урожайности растений и сокращению периода вегетации [11].

Для полевых опытов рекомендована предпосевная обработка семян 0.0025-0.005% водным раствором алексина 4-12 часовой экспозицией с последующим подсушиванием.

Изучение воздействия алексина на рост и развитие сельскохозяйственных культур в лабораторных и полевых условиях проводилось в Институте защиты растений Левана Канчавели, Институте земледелия Юлона Ломоури, в Институте садоводства, виноградарства и виноделия, Государственной инспекцией по испытанию и защите селекционных достижений [5, 13-16]. Во всех случаях показано

положительное влияние низких концентраций водных растворов препарата. Стимулятор комплексно действует на отдельные органы растений, на компоненты, обуславливающие их развитие, на все признаки, определяющие элементы структуры урожая.

В Институте защиты растений установлено, что предпосевная обработка семян фасоли и сои 0.002-0.005% водными растворами алексина стимулирует энергию прорастания и способность всхожести семян на 80-100%, увеличивает образование фитоалексинов и почти полностью ингибирует прорастание спор патогенных грибов, тем самым усиливаются защитные реакции растений к болезням. Повышение урожайности фасоли и сои составляет 32 %. Полевые опыты, проведенные в Институте земледелия, подтвердили благоприятное влияние препарата на бобовые культуры, урожайность фасоли увеличилась на 16-20%, на 12 дней сократился ее вегетативный период [14].

В результате лабораторных экспериментов и производственных опытов (на Асуретской и Дманисской станциях) Государственной инспекцией по испытанию и защите селекционных достижений растений, установлено существенное возрастание показателей силы роста и развития пшеницы и ячменя при предпосевной обработке 0.005% раствором препарата. Энергия прорастания и всхожести семян повышается на 16,6%. Темпы роста составили для пшеницы 30.6%, а ячменя – 32.7%. Усиление развития корневой системы пшеницы равняется 22.3%, а ячменя – 31.1%. Высота растений на 7-14 см больше по сравнению с контролем, увеличивается количество продуктивных стеблей. Колосование и полное созревание пшеницы и ячменя

совершилось на 3-9 дней раньше, чем в контрольных посадках. Число зерен в одном колосе увеличивается на 6-9 шт., а масса отдельных зерен на 0.1-0.5 г. Все это приводит к повышению урожайности пшеницы на 31.2%, ячменя – на 34.5% [13] (Табл. 3.4). В аналогичных экспериментах в Институте земледелия отмечено возрастание урожайности пшеницы и ячменя в пределах 35-45% [13]. При предпосевной обработке семян сои и фасоли 0.015 и 0.005% растворами алексина повышение урожайности сои составило 70.1% и 57.3%, а для фасоли 31.6% и 47.2% соответственно [14] (Табл. 3.5.).

**Таблица 3.4.** Влияние алексина на урожайность пшеницы и ячменя (концентрация 0.005%) [13].

Объекты	Высота растений, см	Урожайность зерна с одного растения, г	Урожайность т/га	Увеличение урожайности по сравнению с контролем, %
<b>пшеница</b>				
контроль	91.5	4.6	3.2	100
алексин	98.5	5.9	4.2	131.2
<b>ячмень</b>				
контроль	71.0	2.9	2.9	100
алексин	84.5	3.7	3.9	134.5

**Таблица 3.5.** Влияние алексина на урожайность сои и фасоля [14].

Концентрация препарата, %	Соя		Фасоль	
	Урожайность с одного растения, г	Увеличение урожая, %	Урожайность с одного растения, г	Увеличение урожая, %
контроль	145	□	130	□
0.0015	212	70.1	172	31.6
0.005	248	57.3	214.8	47.2

Кроме зернобобовых культур эффективность алексина исследовалась на овощных растениях – картофеле и помидорах. Ростостимулирующая активность алексина изучалась на пяти промышленных сортах картофеля: «Колете», «Корети», «Сиера», «Фелиста», «Пальма». Растения опрыскивались 0.005% раствором алексина в период их полной всхожести или в фазе бутонизации и цветения. Стимулирующий эффект отмечен во всех сортах, но наиболее высокие показатели получены на «Корети», когда урожайность клубней картофеля увеличилась на 40%. В среднем повышение урожайности составило 20-22%. (Табл. 3.6.). По данным Института Академии аграрной науки Украины под действием алексина на 47% увеличилась урожайность картофеля.

Недавно в литературе появились данные Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН о том, что экзогенные фураностаноловые гликозиды в низкой концентрации способны индуцировать у клеток картофеля адаптивный ответ, проявляя при этом непосредственно антиоксидантное действие, что может приводить к снижению уровня липопероксидации в условиях окислительного стресса. Это в свою очередь будет способствовать повышению урожайности растений [18].

**Таблица 3.6.** Влияние алексина на урожайность картофеля (концентрация препарата 0,005%) [15]

Название сорта	Вес клубней в лунке, кг		Урожайность т/га		Увеличение урожайности %
	контр.	опыт	контр.	опыт	
«Колете»	0.29	0.37	12.1	14.7	21.5
«Корети»	0.29	0.38	12.0	16.9	40.8
«Сиера»	0.27	0.29	10.2	11.8	15.7
«Фелиста»	0.36	0.41	13.5	16.8	24.8
«Пальма»	0.30	0.34	12.4	15.2	22.6

По наблюдениям Института защиты растений, предпосевная обработка семян помидора 0.001-0.002% раствором препарата с последующим однократным опрыскиванием саженцев значительно улучшает развитие растения, а урожайность плодов увеличивается на 55.9-59.9%. В обработанных экземплярах увеличивается активность фермента каталазы, участвующего в окислительно-восстановительном процессе обмена веществ, образующиеся мощные стебли придают растениям устойчивость к абиотическим факторам [14].

В Институте земледелия им. Юлона Ломоури Л.А. Нозадзе предложено опрыскивание саженцев помидора 0.007% раствором алексина на 8-10 день после их пересадки в почву и повторно в период полного цветения. При этом прирост урожайности плодов составляет 17.3%, а полученная продукция по своим биохимическим показателям является высококачественной. На 40-60% уменьшается количество зараженных вирусом экземпляров, отмечено повышение содержания хлорофилла в листьях, а плоды приобретают темно-красную окраску.

В Институте садоводства, виноградарства и виноделия установлена высокая эффективность использования 0.002-

0.005% водных растворов алексина на физиолого-биофизические показатели и агротехнику виноградной лозы. Так, например, интенсивность произрастания привитых саженцев составила 68.4 %, рост побегов 50.4%, при показателях 26.3% и 9.5% в контрольных опытах. Выход первосортных привитых саженцев возрастает на 36.9%. Отмечено значительное увеличение содержания пластидных пигментов в листьях и т.п. [16].

Предложенный стимулятор способствует увеличению урожайности лекарственных растений и усилению биосинтеза биологически активных вещества. Так, например, при предпосевной обработке семян *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea* G. Don) – барвинка розового 0.001—0.002% водными растворами алексина на 24-29% повышается всхожесть семян, до 13-15 см увеличивается высота саженцев, на 24-26% возрастает количество отпрысков и соответственно увеличивается диаметр кроны. Масса надземной и подземной частей растения увеличивается на 30-40%, а содержание в них биологически активных алкалоидов индольной группы повышается от 0.49% до 0.97% (97 %) [20] (Таблица 3.7.).

**Таблица 3.7.** Влияние алексина на урожайность *Catharanthus roseus* G. Don и на содержание в них алкалоидов [20]

Концентрация препарата, %	Урожайность ц/га	Увеличение по контролю, %	Количество суммы алкалоидов, %
контроль	4.2	100	0.49
0.001	5.5	130.9	0.74
0.002	5.9	140.5	0.97
0.005	5.1	121.4	0.26

Таким образом, доказана хорошая ростостимулирующая эффективность стероидного препарата – алексина. Но область его применения в аллелопатии этим не ограничивается - препарат можно успешно использовать на других сельскохозяйственных растениях: кукурузе, бахчевых и овощных культурах, винограде, в цветоводстве. Большие возможности открываются и для применения его в стрессовых условиях.

Алексин аморфный порошок коричневого цвета, горький на вкус, хорошо растворяется в воде, легко биодegradируется, нетоксичен ( $LD < 50$  мг/кг), генетической активностью не характеризуется, экологически чистый и обеспечивает получение чистой продукции. Использование алексина технически просто и безопасно [11, 12, 17, 21].

Алексин содержит фуру- и спиростаноловых гликозидов исходного сырья до 40%. Выход препарата из цветков и бутонов юкки славной составляет 7-8% [22].

Алексин прошел государственную регистрацию (№ 20369753-001-2015) и разрешено его применение на практике.

Разрешены все вопросы, связанные с производством алексина, налажен его выпуск для широкого практического применения и полного удовлетворения потребности.

### **3.2.2. Фунгицидная активность стероидных гликозидов юкки славной**

Стероидные гликозиды *Yucca gloriosa* L. проявляют различную фармакологическую активность. В том числе имеются сведения об антимикробной, фунгицидной их активности и использовании в качестве консервантов пищевых продуктов [23-25]. Это дало нам основание провести

исследования гликозидов юкки славной в данном направлении.

Сумма гликозидов цветков юкки славной – в виде стимулятора роста и развития растения препарат «Алексин» разделяли колоночным хроматографированием на спиростаноловую и фуростаноловую фракции, изолировали также доминирующие спиростаноловые компоненты – юккалоезиды В и С. Фунгицидное действие всех объектов в отношении 18 патогенных для человека дрожжевых штаммов, дерматофитов и нитевидных грибов изучались в опытах *in vitro* в лаборатории ботаники, криптогамии и молекулярной биологии фармацевтического факультета Марсельского института Средиземноморского Университета. Минимальная фунгицидная концентрация (МFC) определялась по методу разведения в агаре [26]. Все образцы растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Концентрации для тестов были в диапазоне 1.9-2000 мкг/мл в случае алексина и спиростаноловой фракции, для индивидуальных гликозидов В и С 0.39-100 мкг/мл. Финальная концентрация в DMSO не превышала 1%. Минимальная ингибиторная концентрация (MIC) была установлена при первой концентрации образования видимого роста после инкубационного времени (48 ч для дрожжевых грибов, 5-15 дней для дерматофитов и нитевидных грибов). В качестве препарата сравнения фунгицидной активности для дрожжевых и нитевидных грибов был использован амфотерицин, а для дерматофитов кетоконазол.

Алексин проявил активность в отношении некоторых тестируемых штаммов, однако наиболее эффективно действует против дерматофитов (МFC – 15.6 мкг/мл) кроме случая *Trichophyton soudanense* (31.2 мкг/мл). Фунгицидное

действие спиростаноловой фракции оказалось намного сильнее, чем алексина, и МФС в большинстве случаев находится в пределах 3.9-15.6 мкг/мл, кроме *Candida lusitanica*, *C. kefyr* и нитевидных грибов. МФС юккалоезидов В и С в отношении большинства штаммов колеблется в диапазоне 0.39-6.25 мкг/мл и приближается к таковой препаратов сравнения в случае дерматофитных грибов, кроме *Epidermophyton floccusum*. Фунгицидная активность как спиростаноловой фракции, так и индивидуальных гликозидов против нитевидных грибов низкая. Фуростаноловая фракция гликозидов фунгицидную активность не проявляет [27].

Фунгицидную активность стероидных сапонинов приписывают к их способности образовывать комплексы стеролами грибным мембран, посредством этого образуются поры и теряется цельность мембран [28, 29]. Исследования показали терапевтический потенциал спиростаноловых гликозидов из цветков *Yucca gloriosa*, также более или менее умереннее алексина против дерматофитов [27].

### **3.2.3. Стероидные гликозиды листьев юкки славной, подсохших на растениях, и их фунгицидная активность**

Листья нижних ярусов куста юкки славной на 3-4-м году жизни подсыхают. При профилактическом уходе за растением их обрезают и выбрасывают. Наши наблюдения показали, что подсохшие живого растения листья содержат только спиростаноловые гликозиды. По всей вероятности, фуростанолы в процессе высыхания превращаются в соответствующие спироформы. Принимая во внимание фунгицидную

активность именно спиростаноловых гликозидов [27] и наличие их источников в виде бросовых отходов плантации юкки славной, были проведены работы по выделению и изучению гликозидов из данного сырья [2].

Измельченные подсохшие листья освобождали от липофильных веществ форэкстракцией гексаном или петролейным эфиром, а затем трехкратно экстрагировали спиртом при нагревании на водяной бане. Объединенные спиртовые экстракты фильтровали и сгущали до  $\frac{1}{4}$  объема. При охлаждении в жидкости выпадает осадок, который отделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. Полученный таким образом аморфный порошок светло-желтого цвета в количестве 4-5% от взятого растительного сырья – сумма стероидов, по данным ТСХ анализа состоит из 8 спиростаноловых гликозидов, а фуростаноловые проявляются лишь в виде следов. Количественное содержание стероидных гликозидов в сумме составляет не менее 45%.

Для изучения химического состава сумму эту растворяли в смеси спирт-хлороформ, 1:1.5, и наносили на хроматографическую колонку с силикагелем в соотношении 1:100, в качестве мобильной фазы использовали систему хлороформ – метанол – вода, 26:14:3. В результате изолированы 4 гликозида. Их химические структуры установлены изучением продуктов кислотного гидролиза и с использованием современных спектральных методов. Три гликозида **1**, **2**, **3** охарактеризованы соответственно как юккалоизиды А, В и С, выделенные нами ранее из листьев юкки алоэлистной [6, 9].

Гликозид **4** является новым соединением. ESI/MS данного вещества дает пик иона  $m/z$  1203  $[M+Na]^+$  и значительный фрагмент  $m/z$  1057  $[M+Na-146]^+$ , указывающий

на отщепление дезоксисахара. В  $^1\text{H}$  ПМР-спектре (ДМСО) гликозида появляются сигналы 4 метильных групп стероида (хим. сдвиг  $\delta$  м. д.) 0.70 (с, Me-18), 0.77 (с, Me-19), 0.88 (д, Me-21), 0.72 (д, Me-27); двух вторичных – 3.51 (м, H-3) и 4.26 (м, H-16) и двух первичных – 3.39 (дд, H-26a) и 3.19 (дд, H-26b) протонов алкогольной функции; 5 аномерных сигналов протонов с  $\delta$  4.19, 4.40, 4.55, 4.71 и 4.65.

1D-TOCSY, COSY и HMBC экспериментами установлено, что гликозид этот содержит 2 остатка глюкозы, по одному – галактозы, ксилозы и рамнозы.

В ЯМР-спектре сигнал  $\delta$  109.1 (C-22) четвертичного углеродного атома указывает на спиростаноловый тип гликозида. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектре агликона химические сдвиги углеродных атомов  $\delta$  37.0 (C-1), 44.6 (C-6), 54.3 (C-9) подтверждают принадлежность стероида к  $5\alpha$ -ряду. HMBC спектр показывает значительные корреляционные пики между  $\delta_{\text{H}}$  4.19 (H-1 Gal) и  $\delta_{\text{C}}$  77.0 (C-3 Agl);  $\delta_{\text{H}}$  4.40 (H-1 Glc I) и  $\delta_{\text{C}}$  80.6 (C-4 Gal);  $\delta_{\text{H}}$  4.71 (H-1 Glc II) и  $\delta_{\text{C}}$  81.0 (C-2 Glc I);  $\delta_{\text{H}}$  4.55 (H-1 Xyl) и  $\delta_{\text{C}}$  86.3 (C-3 Glc I);  $\delta_{\text{H}}$  4.65 (H-1 Rha) и  $\delta_{\text{C}}$  74.1 (C-4 Xyl).

Полученные данные позволили нам предложить для гликозида **4** химическое строение: (25R)  $5\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[ $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

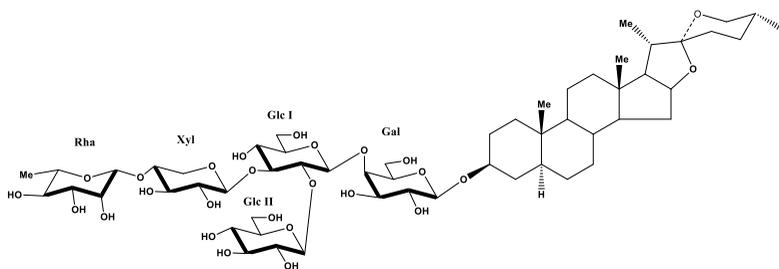


Рис. 3.3. Структура нового гликозида из подсохших на растении листьев

Результаты изучения фунгицидной активности суммы спиростаноловых гликозидов из подсохших на живом растении листьев юкки славной сведены в таблицу 3.8.

**Таблица 3.8.** Фунгицидная активность спиростаноловых гликозидов *Yucca gloriosa* L. in vitro

Штаммы		МFC (мкг/мл)*	
		А**	В***
Дрожжевые грибы	<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	> 50	25
	<i>Candida albicans</i> 38248	25	6.25
	<i>Candida albicans</i> Y 0109	> 50	25
	<i>Candida tropicalis</i> IP 1275-81	> 50	25
	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	6.25	6.25
	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	25	6.25
	<i>Candida kefir</i> Y0106	> 50	> 50
	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	25	6.25
	<i>Candida lusitaniae</i> CBS 6936	> 50	> 50
	<i>Cryptococcus neoformans</i> (клинический)	3.12	3.12
Дерматофиты (клинические)	<i>Trichophyton rubrum</i>	6.25	3.12
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	12.5	6.25
	<i>Microsporium canis</i>	6.25	3.12
	<i>Microsporium gypseum</i>	6.25	6.25

\* МFC - минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл

\*\* А – суммарный препарат из листьев, подсохших на живом растении

\*\*\* В – спиростаноловая фракция цветков

Как и следовало ожидать, активность суммарного препарата из подсохших на растении листьев ниже, чем у чистых фракций спиростаноловых гликозидов. Однако в концентрациях 6.25-12.5 мкг/мл суммарный препарат ингибирует клинические виды штаммов дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Tr. rubrum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*; вызывает необратимое ингибирование патогенных грибов различных штаммов *Candida*, а также клинического вида *Cryptococcus neoformans* в диапазоне концентраций 3.12-25 мкг/мл [2].

Полученные результаты дают основание предположить возможность использования суммы спиростанолов из подсохших на растении листьев юкки славной в качестве фунгицидного средства наружного применения. Разработана лекарственная форма в виде 1% мази под названием «глюриофуцин»; основой была подобрана на 100 г мази: парфюмерное масло (ТУ 18-2/56-84) – 76 г и моноглицерид дистиллированный (ГОСТ-42-26-76) – 23г. Глюриофуцин не характеризуется сенсибилизирующим, местнораздражающим, аллергизирующим действием и не проявляет системного токсического действия. Препарат рекомендован для клинической апробации при грибковых заболеваниях кожи, вызванных инфекцией штаммами *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, в частности при микроспории, руброфитии и эпидермофитии [30].

### 3.2.4. Сесквитерпеновые гликозиды цветков

#### *юкки славной*

Многокомпонентный состав цветков юкки славной дал нам основание допустить в них наличие сесквитерпенов, представляющих собой самую обширную группу всех терпенов (их несколько тысяч), по множеству структурных вариантов и разнообразию типов углеродного скелета. Классификация сесквитерпенов построена по степени циклизации углеродного скелета: ациклические, моноциклические, бициклические, сесквитерпены [31].

Продолжая изучение химического состава юкки славной из 70% метанольного экстракта цветков и бутонов выделены и идентифицированы 3 сесквитерпеновых гликозида (**1-3**). Все они являются новыми соединениями и новым классом для рода *Yucca*.

#### **Экстракция и выделение.**

200 г в/с измельченного сырья извлекали 70% метанолом. Из экстракта спирт отгоняли, водную жидкость очищали хлороформом, переносили на колонке Diaion HP-20 и элюировали градиентной системой H<sub>2</sub>O/MeOH 10:0→0:10, получали 4 фракции (500 мл каждый) водный (61 г), 30% метанол (2.5 г), 80% метанол (11 г), метанол (1.5 г). Из 30% метанольного элюата хроматографированием на колонке Sephadex LH-20 и с силикагелем изолированы вещества **1** (2.3 мг), **2** (1.9 мг), **3** (2.7 мг).

<sup>1</sup>H ПМР спектр вещества **1** показывает для винильной АВХ системы дублет дублетов при δ 5.98 (1H, J=17.3, 10.7 Гц), 5.28 (1H, J=17.3, 1.5 Гц), 5.06 (1H, J=10.7, 1.5 Гц), 5.61 (1H, J=15.6, 6.6 Гц) и два дублета при δ 5.63 (1H, J=15.6 Гц), 5.13

(1H, J=9.4 Гц); четыре синглета метильной группы  $\delta$  1.68, 1.29, 1.29, 1.28; один дублет дублета дублетов гидроксиметинового протона  $\delta$  4.84 (1H, J=9.4, 8.4, 3.7 Гц); четыре метиленовых протона  $\delta$  2.71 (1H, д, J=6.6 Гц), 2.73 (1H, д, J=6.6 Гц), 1.96 (1H, дд, J=14.5, 8.4), 1.63 (1H, дд, J=14.5, 3.7) и два аномерных протона  $\delta$  4.36 (1H, д, J=7.8 Гц), 4.23 (1H, д, J=7.8 Гц) (Таблица 3.10). В COSY эксперименте видны перекрестные пики между протонами винилных групп  $\delta$  5.28 $\leftrightarrow$ 5.06 $\leftrightarrow$ 5.98;  $\delta$  5.63 $\leftrightarrow$ 5.61), между олефинным протоном при  $\delta$  5.13 и протоном  $\delta$  4.84, последний коррелирует с протонами метиленной группы при  $\delta$  1.96 и 1.63. Олефинный протон при  $\delta$  5.61 коррелирует с дублетом метиленной группы  $\delta$  2.73. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре отмечены двадцать семь углеродов, которые с помощью DEPT и HSQC экспериментов идентифицированы как четыре метил  $\delta$  29.9, 29.9, 28.5, 16.9, четыре олефинный метил  $\delta$  145.9, 141.2, 126.2, 125.5, один карбинольный метин  $\delta$  72.2, три метилен  $\delta$  112.1, 47.9, 43.1, один из которых олефинный  $\delta$  112.1, три четвертичных  $\delta$  140.0, 73.9, 71.1 и двенадцать углеродов сахарной части (Таблица 3.9.). Все спектральные данные указывают на наличие сесквитерпенового гликозида типа **нероледола** [32]. Конфигурация у C-5 атома ( $\alpha$ -H форма) установлена с химическими сдвигами и J-значениями [7, 32, 33]. Окончательная структура вещества **1** установлена с помощью HMBC эксперимента, где видны значительные корреляционные пики между аномерными протонами и гликозилированными углеродами [ $\delta$  4.23 (H-1')/ $\delta$  72.2 (C-5)] и  $\delta$  4.36 (H-1'')/ $\delta$  69.8 (C-6'). По данным  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров и J-значениями оба сахара являются D-глюкозами.

**Таблица 3.9.**  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные вещества **1-3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz,  $\delta$  в м.д.) из цветков и бутонов юкки славной

Атом С	1	2	3
1	112.1	112.1	112.2
2	145.9	145.9	145.9
3	73.9	73.9	73.9
4	47.9	48.1	47.9
5	72.2	72.2	72.1
6	126.2	126.7	126.2
7	140.0	139.8	140.7
8	43.1	43.0	40.5
9	125.5	127.4	26.6
10	141.2	137.4	130.5
11	71.1.	73.6	132.7
12	29.9	70.5	67.8
13	29.9	24.3	21.8
14	16.9	17.0	16.9
15	28.5	28.8	28.5
1'	100.3	100.3	100.3
2'	74.8	74.8	74.7
3'	77.8	77.8	77.7
4'	71.5	71.4	71.4
5'	77.1	77.1	77.0
6'	69.8	69.9	69.9
1''	104.6	104.5	104.6
2''	84.8	74.9	74.7
3''	77.7	77.6	77.6
4''	71.4	71.3	71.4
5''	77.8	77.8	77.8
6''	62.4	62.5	62.6
1'''			102.6
2'''			75.0
3'''			77.9
4'''			71.5
5'''			77.7
6'''			62.6

Исходя из полученных данных, структура вещества **1** представляет собой (1E,3S,5R,6E,9E)-5-O-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-O-β-D-глюкопиранозил-3,5,11-тригидрокси-3,7,11-триметилдодека-1,6,9-триен.

Вещество **2** отличается от **1** наличием экзометиленной группы при C-11 δ 3.38, д, J=11.8 Гц и 3.28, д, J=11.8 Гц, вместо метила (Таблица 3.10).

**Таблица 3.10.** <sup>1</sup>H ПМР данные вещества 1-3 (CD<sub>3</sub>OD, 600 МГц, δ в м.д., J в Hz) цветков и бутонов юкки славной

Атом	1	2	3
1a	5.28 дд, J=17.3, 1.5	5.28 дд, J=17.3, 1.5	5.28 дд, J=17.3, 1.5
1b	5.06 дд, J=10.7, 1.5	5.07 дд, J=10.7, 1.5	5.08 дд, J=10.7, 1.5
2	5.98 дд, J=17.3, 10.7	5.97 дд, J=17.3, 10.7	5.97 дд, J=17.3, 10.7
4a	1.96 дд, J=14.5, 8.4	1.96 дд, J=14.5, 8.4	1.96 дд, J=14.5, 8.4
4b	1.63 дд, J=14.5, 3.7	1.64 дд, J=14.5, 3.7	1.62 дд, J=14.5, 3.7
5	4.84 ддд, J=9.4, 8.4, 3.7	4.84 ддд, J=9.4, 8.4, 3.7	4.84 ддд, J=9.4, 8.4, 3.7
6	5.13 д, J=9.4	5.17 д, J=9.4	5.13 д, J=9.4
8	2.73, 2.71 д, J=6.6;	2.75 (2H) д, J=6.6	2.07 м, 2.05 м
9a, b	5.61 дд, J=15.6, 6.6	5.67 дд, J=15.6, 6.6	2.26 м; 2.20 м
10	5.63 д, J=15.6	5.60 д, J=15.6	5.39 т, J=7.1
12a	1.29 с	3.38 д, J=11.8	4.32 д, J=11.5
12b		3.28 д, J=11.8	4.23 д, J=11.5
13	1.29 с	1.24 с	1.80 с
14	1.68 с	1.69 с	1.69 с
15	1.28 с	1.28 с	1.28 с
1'	4.23 д, J=7.8	4.23 д, J=7.8	4.23 д, J=7.8
2'	3.17 дд, J=9.0, 7.8	3.17 д, J=9.0, 7.8	3.18 дд, J=9.0, 7.8
3'	3.29*	3.30*	3.29*
4'	3.38*	3.37*	3.37*
5'	3.34*	3.35*	3.34*
6'a	4.14 дд, J=11.5, 1.8	4.14 дд, J=11.5, 1.8	4.13 дд, J=11.5, 1.8
6'b	3.80 дд, J=11.5, 5.0	3.79 дд, J=11.5, 5.0	3.79 дд, J=11.5, 5.0
1''	4.36 д, J=7.8	4.36 д, J=7.8	4.36 д, J=7.8
2''	3.22 дд, J=9.0, 7.8	3.22 дд, J=9.0, 7.8	3.23*
3''	3.35*	3.36*	3.37*
4''	3.29*	3.29*	3.28*

**Таблица 3.10.** Продолжение

5''	3.28*	3.29*	3.29*
6''a	3.88 дд, J=11.8, 2.0	3.88 дд, J=11.8, 2.0	3.87 дд, J=11.8, 2.0
6''b		3.67 дд, J=11.8, 5.6	3.67 дд, J=11.8, 5.6
1'''			4.24 д, J=7.9
2'''			3.22*
3'''			3.36*
4'''			3.29*
5'''			3.24*
6'''a			3.87 дд, J=11.8, 2.0
6'''b			3.69 дд, J=11.8, 5.6

\* - перекрыто другими сигналами

Таким образом, вещество **2** охарактеризовано как (1E,3S,5R,6E,9E)-5-O-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-O-β-D-глюкопиранозил-3,5,11,12-тетрагидрокси-3,7,11-триметилдодека-1,6,9-триен.

<sup>1</sup>H ПМР спектр вещества **3** показывает олефинные протоны АВХ системы при δ 5.97 (1H, дд, J=17.3, 10.7 Гц), 5.39 (1H, т, J=7.1 Гц), 5.28 (1H, дд, J=17.3, 1.5 Гц), 5.13 (1H, д, J=9.4 Гц) и 5.08 (1H, дд, J=10.7, 1.5 Гц); три метильные группы δ 1.80, 1.69, 1.28 (каждый 3H, с), восемь метиленовых протонов δ 4.32 (1H, д, J=11.5 Гц), 4.23 (1H, д, J=11.5 Гц), 2.26 (1H, м), 2.20 (1H, м), 2.05 (1H, м), 2.07 (1H, м), 1.96 (1H, дд, J=14.5, 8.4 Гц), 1.62 (1H, дд, J=14.5, 3.7 Гц), гидроксиметиновый один протон при δ 4.84 (1H, ддд, J=9.4, 8.4, 3.7 Гц) и три аномерных протона δ 4.36 (1H, д, J=7.8 Гц), 4.24 (1H, д, J=7.9 Гц), 4.23 (1H, д, J=7.8 Гц) (Таблица 3.10). <sup>13</sup>C ЯМР спектр показывает три метильные группы при δ 28.5, 21.8, и 16.9, четыре метиленовые группы (δ 67.8, 47.9, 40.5 и 26.6), кислородсодержащий один третичный δ 72.1 и один четвертичный углерод δ 73.9, шесть олефинных δ 145.9, 140.7, 132.7, 130.5, 126.2 и 112.2 и три аномерных углерода δ 104.6, 102.6, 100.3 (Таблица 3.9). По данным <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектров все три сахара – глюкоза. Последовательность их замещения была установлена с помощью двумерного

НМВС спектра, который показывает значительные корреляционные пики между  $\delta$  4.36 (H-1'') и  $\delta$  67.8 (C-12),  $\delta$  4.24 (H-1'') и  $\delta$  69.9 (C-6'),  $\delta$  4.23 (H-1') и  $\delta$  72.1 (C-5). В результате структура вещества **3** установлена как (1E,3S,5R,6E,10E)-(12-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-5-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-3,5,12-тригидрокси-3,7,11-триметилдодека-1,6,10-триен.

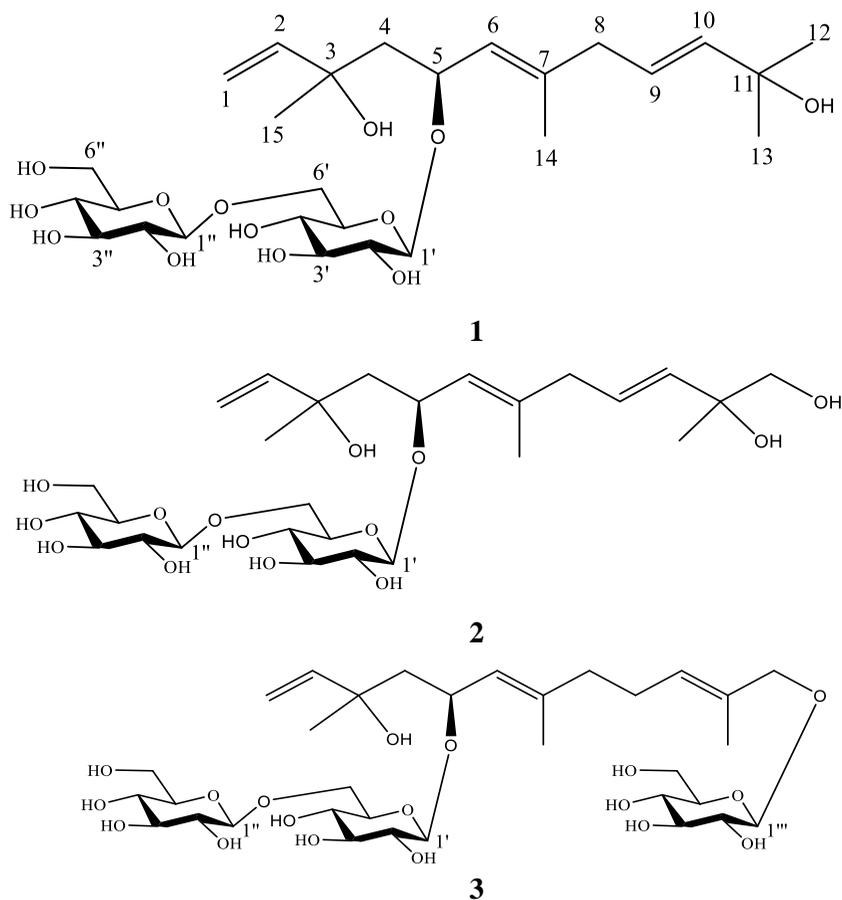


Рис. 3.4. Структуры новых сесквитерпенов (веществ **1-3**) цветков *Yucca gloriosa*

(1E,3S,5R,6E,9E)-5-O-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-O-β-D-глюкопиранозил-3,5,11-тригидрокси-3,7,11-триметилдодека-1,6,9-триен - **1**

(1E,3S,5R,6E,9E)-5-O-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-O-β-D-глюкопиранозил-3,5,11,12-тетрагидрокси-3,7,11-триметилдодека-1,6,9-триен - **2**

(1E,3S,5R,6E,10E)-(12-O-β-D-глюкопиранозил)-5-O-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-O-β-D-глюкопиранозил-3,5,12-тригидрокси-3,7,11-триметилдодека-1,6,10-триен - **3**

### **3.2.5. Фенолкарбонные кислоты и флавоноиды цветков юкки славной**

В процессе изолирования стероидных гликозидов цветков и бутонов юкки славной появились вещества фенольной природы.

Продолжая исследование химического состава цветков юкки славной 200 г в/с измельченного растительного материала экстрагировали 70% метанолом. После отгонки спирта водную жидкость очищали хлороформом, переносили на колонке Diaion HP-20 и элюировали градиентной системой H<sub>2</sub>O-MeOH (10:0–7:3), собирали 2 фракции по 500 мл. Из водного элюата после отгонки растворителя остается твердый остаток в количестве 61 г, из 30% метанола – 2.5 г. Последний хроматографировали последовательно на колонках Sephadex LH-20 и силикагеле. Были изолированы 6 индивидуальных соединений – вещества **1** (2.3 мг), **2** (1.9 мг), **3** (2.7 мг), **4** (6.3 мг), **5** (4.2 мг), **6** (4.1 мг).

Структуры полученных веществ установлены по физико-химическим показателям, данными УФ и ЯМР ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , HSQC, COSY, HMBC) спектроскопии.

Вещество **1**. Белый порошок,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ , т.пл. 208-210°C. УФ-спектр:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 230, 315 нм.  $^1\text{H}$  ПМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 7.87 (д,  $J=8.7$  Гц, Н-2 и Н-6), 6.81 (д,  $J=8.7$  Гц, Н-3 и Н-5).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 123.5 (С-1), 133.0 (С-2, С-6), 115.7 (С-3, С-5), 163.1 (С-4), 170.5 (С-7). Полученными данными, сравнением с достоверным образцом и с литературными сведениями его идентифицировали с **п-оксибензойной кислотой** [34].

Вещество **2**. Белый порошок с желтоватым оттенком,  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , т.пл. 166-168°C. УФ-спектр:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 235, 320 нм.  $^1\text{H}$  ПМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 7.12 (д,  $J=2.0$  Гц, Н-2), 6.80 (д,  $J=8.0$  Гц, Н-5), 7.03 (дд,  $J=2.0, 8.0$  Гц, Н-6), 7.44 (д,  $J=16.0$  Гц, Н-7), 6.40 (д,  $J=16.0$  Гц, Н-8), 3.89 (с, ОМе).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 127.8 (С-1), 112.0 (С-2), 149.2 (С-3), 148.0 (С-4), 116.0 (С-5), 122.8 (С-6), 144.7 (С-7), 116.5 (С-8), 171.5 (С-9), 56.2 (ОМе). Сравнением с литературными данными, достоверным образцом он охарактеризован как **феруловая кислота** [34].

Вещество **3**. Белый порошок,  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$ , т.пл. 206-209°C. УФ-спектр:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 228, 310 нм.  $^1\text{H}$  ПМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 7.43 (д,  $J=8.7$  Гц, Н-2 и Н-6), 6.80 (д,  $J=8.7$  Гц, Н-3 и Н-5), 7.56 (д,  $J=16.0$  Гц, Н-7), 6.29 (д,  $J=16.0$  Гц, Н-8).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 127.6 (С-1), 130.6 (С-2, С-6), 116.1 (С-3, С-5), 161.0 (С-4), 145.3 (С-7), 116.7 (С-8), 172.0 (С-9). Вещество **3** оказалось **п-кумаровой кислотой** [34].

Вещество **4**. Желтый порошок,  $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 2H_2O$ , т.пл. 187-190°C,  $[\alpha]_D^{20}$  - 35.9° (с 0.3; метанол), УФ-спектр:  $\lambda_{max}$  ( $C_2H_5OH$ ) 260, 360 нм.  $^1H$  ПМР ( $CD_3OD$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 6.21 (д, J=2.0 Гц, Н-6), 6.40 (д, J=2.0 Гц, Н-8), 7.67 (д, J=2.0 Гц, Н-2'), 6.88 (д, J=8.0 Гц, Н-5'), 7.63 (дд, J=2.0, 8.0 Гц, Н-6'), 5.22 (д, J=7.8 Гц, Н-1 Glc), 4.52 (д, J=1.8 Гц, Н-1 Rha).  $^{13}C$  ЯМР ( $CD_3OD$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 158.4 (С-2), 135.0 (С-3), 179.3 (С-4), 162.7 (С-5), 99.8 (С-6), 164.9 (С-7), 94.6 (С-8), 158.5 (С-9), 105.1 (С-10), 123.0 (С-1'), 117.1 (С-2'), 149.7 (С-3'), 145.6 (С-4'), 115.7 (С-5'), 123.2 (С-6'), 104.4 (С-1 Glc), 102.1 (С-1 Rha). Вещество **4** идентифицировано как **кверцетин 3-О-рутинозид - рутин** [35].

Вещество **5**. Желтый порошок,  $C_{27}H_{30}O_{15}$ . т.пл. 206-208°C,  $[\alpha]_D^{20}$  - 29° (с 0.15; этанол), УФ-спектр:  $\lambda_{max}$  ( $C_2H_5OH$ ) 267, 353 нм.  $^1H$  ПМР ( $CD_3OD$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 6.13 (д, J=2.0 Гц, Н-6), 6.31 (д, J=2.0 Гц, Н-8), 7.99 (д, J=8.5 Гц, Н-2' и Н-6'), 6.82 (д, J=8.5 Гц, Н-3' и Н-5'), 5.23 (д, J=7.8 Гц, Н-1 Glc), 4.52 (д, J=1.8 Гц, Н-1 Rha).  $^{13}C$  ЯМР ( $CD_3OD$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 159.0 (С-2), 134.2 (С-3), 175.5 (С-4), 161.9 (С-5), 100.0 (С-6), 165.2 (С-7), 94.8 (С-8), 157.5 (С-9), 104.5 (С-10), 122.7 (С-1'), 132.1 (С-2', С-6'), 116.0 (С-3', С-5'), 161.5 (С-4'), 104.4 (С-1 Glc), 102.2 (С-1 Rha). Вещество оказалось **кемпферол 3-О-рутинозидом** [35].

Вещество **6**. Желтый порошок,  $C_{28}H_{32}O_{16} \cdot 2H_2O$ , т.пл. 179-181°C,  $[\alpha]_D^{20}$  - 31.5° (с 0.3; диметилформаид), УФ-спектр:  $\lambda_{max}$  ( $C_2H_5OH$ ) 254, 356 нм.  $^1H$  ЯМР ( $CD_3OD$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д.): 6.20 (д, J=2.0 Гц, Н-6), 6.40 (д, J=2.0 Гц, Н-8), 7.94 (д,

J=2.0 Гц, Н-2'), 6.91 (д, J=8.0 Гц, Н-5'), 7.62 (дд, J=2.0, 8.0 Гц, Н-6'), 5.23 (д, J=7.8 Гц, Н-1 Glc), 4.53 (д, J=1.8 Гц, Н-1 Rha), 3.94 (с, OMe). <sup>13</sup>C ЯМР (CD<sub>3</sub>OD, 600 МГц, δ в м.д.): 158.8 (C-2), 135.4 (C-3), 179.3 (C-4), 163.0 (C-5), 99.7 (C-6), 166.0 (C-7), 94.5 (C-8), 158.5 (C-9), 105.6 (C-10), 122.9 (C-1'), 114.2 (C-2'), 148.2 (C-3'), 150.6 (C-4'), 115.8 (C-5'), 123.6 (C-6'), 104.4 (C-1 Glc), 102.4 (C-1 Rha), 56.6 (OMe). Вещество **6** охарактеризовано как **изорамнетин 3-О-рутинозид** [35].

Все описанные вещества из *Yucca gloriosa* L. выделены и идентифицированы впервые.

### 3.3. Стероидные гликозиды плодов *Yucca gloriosa* L.

На родине, в естественных местах произрастания все виды юкки опыляются ночной молью из рода *Pronuba Yuccasella*. Единственный самоопыляемый вид - *Yucca aloifolia*. Что касается *Yucca gloriosa*, то о ней в литературе есть такое указание – «Никто еще никогда не видел плодов, ни на родине, ни в садах, и поэтому полагают, что моль, содействовавшая опылению этого вида, вымерла» [36].

В 2009 г. на нескольких экземплярах *Yucca gloriosa* Ширакского участка лекарственных растений Института фармакохимии появились плоды, которые были выявлены и собраны начальником участка Бадри Лукичом Григолава. Причина этого редкого явления неизвестна. Плоды цилиндрической формы, шестигранные, трехгнездовые, в гнездах в два ряда расположены сердцевидно-овальные многочисленные семена. Семена прорастали, имели хорошую всхожесть и дали нормальные саженцы. Плоды собраны в количестве 150 г, их разделяли на семена 55 г и перикарпий

95 г. Из семян выделена 10% сумма стероидных гликозидов, а из перикарпия – 12%.

Исследованием суммы гликозидов семян изолированы 2 спиростаноловых гликозида, оказавшиеся известными соединениями: юккалоезид А (25R) – 5 β-спиростан-3β-ол 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-галактопиранозид и тимосапонин – (25S)-5β-спиростан-3β-ол 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-галактопиранозид [9, 37].

Из суммы стероидных гликозидов перикарпия выделено 11 гликозидов, среди них 3 вещества известные химическим строением: (25R)-5β-спиростан-3β-ол 3-О-β-D-галактопиранозид [38]; (25S)-5β-спиростан-3β-ол 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→2)-О-β-D-галактопиранозид – тимосапонин [39]; - (25R)-5β-спиростан-3β-ол 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-О-β-D-галактопиранозид [40].

Вещества **1-8** оказались новыми соединениями, структуры которых установлены с помощью одно- и двумерных ЯМР ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, COSY) и масс-спектрологии (ESI-MS).

Спектральные данные ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  выделенных веществ сведены в табл. 3.11-3.15.

Вещество **1**.  $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_9$ . Аморфный белый порошок,  $[\alpha]_D^{20}$  - 14° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS (m/z 611.819);  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ESI/MS m/z 611  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , MS-MS, m/z 417  $[\text{M}-162-18-14+\text{H}]^+$ .

В спектре  $^1\text{H}$  ПМР вещества **1** видны сигналы четырех метильных групп при δ 0.76 (3H, с, Me-18), 0.80 (3H, с, Me-19), 0.95 (3H, д, J=6.8 Гц, Me-21), 0.89 (3H, д, J=7.0 Гц, Me-27), двух протонов вторичной алкогольной функции δ 3.56 (1H, м, H-3), 4.32 (1H, дд, J=14.3, 7.2 Гц, H-16), двух метилен протонов δ 3.77 и 3.29 (по одной 1H, м, H-26a,b) и одного

аномерного протона  $\delta$  4.25 (1H, д,  $J=7.8$  Гц, H-1 Glc). Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР показал сигналы двух вторичных алкогольных функций при  $\delta$  71.3 (C-3) и 81.7 (C-16) и одной первичной  $\delta$  76.5 (C-26), что свидетельствовало о фураностаноловом строении гликозида (табл. 3.11). R-конфигурацию при C-25 установили разницей химических сдвигов между протонами H2-26 ( $\Delta\text{ab} = 0.48$  м.д.), так как известно, что  $\Delta\text{ab} > 0.57$  м.д. у 25 S-гликозидов, а  $\Delta\text{ab} < 0.48$  м.д. у 25 R-гликозидов [41]. В гликозиде при C-22 замещен метоксирадикал, а при C-26  $\beta$ -D-глюкоза, это установлено НМВС корреляционными пиками между протоном сигнала метила  $\delta$  3.13 (3H, с) и 113.2 (C-22), сигнала аномерного протона глюкозы  $\delta$  4.25 (1H, д) и C-26 агликона ( $\delta$  76.5). Сигналы спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР  $\delta$  1.07 (1H, м, H-5) и 45.4 (C-5) указывали на 5 $\alpha$  ряд гликозида. Сопоставляя спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР с литературными данными агликон вещества **1** идентифицировали как (25R)-5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол-тигогенин [8]. Здесь же отметим, что акликоном всех описанных ниже новых гликозидов оказался тигогенин (таблица 3.11).

140 **Таблица 3.11.** Данные ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  аналитической части веществ **1-8** (600 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, δ, м.д.)

Атом С	<b>1*</b>		<b>2-4</b>		<b>5-8</b>	
	δ <sub>С</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>С</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>С</sub>	δ <sub>H</sub>
1	37.5	1.67, 0.94	38.1	1.59, 0.88	38.1	1.60, 0.88
2	32.0	1.77, 1.38	30.6	1.70, 1.35	30.8	1.70, 1.35
3	71.3	3.56	77.9	3.49	77.9	3.49
4	38.8	1.53, 1.25	35.6	1.58, 1.13	35.6	1.58, 1.14
5	45.4	1.07	45.7	0.99	45.7	0.99
6	29.2	1.25 (2H)	30.0	1.28, 1.21	30.0	1.28, 1.21
7	32.7	1.66, 0.85	33.6	1.59, 0.83	33.4	1.59, 0.83
8	35.6	1.51	36.2	1.45	36.0	1.44
9	54.9	0.62	55.3	0.60	55.3	0.60
10	36.2	-	37.3	-	37.3	-
11	21.6	1.48, 1.27	22.2	1.43, 1.20	22.2	1.43, 1.20
12	40.5	1.68, 1.09	41.0	1.63, 1.06	40.9	1.64, 1.05
13	41.5	-	41.9	-	41.8	-
14	56.8	1.06	57.3	1.04	57.2	1.03
15	32.2	1.94, 1.21	33.0	1.86, 1.11	33.0	1.84, 1.08
16	81.7	4.32	81.7	4.23	81.9	4.20
17	63.4	1.72	63.6	1.63	64.4	1.61
18	17.1	0.76	18.0	0.68	17.8	0.70
19	12.9	0.80	13.8	0.75	13.7	0.75
20	39.7	2.07	42.8	1.78	40.9	1.89

Таблица 3.11. Продолжение

21	15.8	0.95	16.2	0.87	17.4	0.87
22	113.2	-	110.2	-	111.1	-
23	30.2	1.23 (2H)	32.6	1.57, 1.45	31.7	1.46 (2H)
24	28.8	1.50, 1.15	29.9	1.53, 1.21	28.9	1.44, 1.11
25	34.0	1.74	31.4	1.50	34.5	1.63
26	76.5	3.77, 3.29	67.3	3.38, 3.17	75.2	3.49, 3.26
27	17.7	0.89	18.8	0.71	18.5	0.84
OMe	47.8	3.13				

\* Спектр снят в CDCl<sub>3</sub>

Исходя из полученных данных, вещество **1** охарактеризовали как (25 R)-5 $\alpha$ -фуростан-22-метокси-3 $\beta$ ,26-диол 26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

Вещество **2**. C<sub>62</sub>H<sub>102</sub>O<sub>31</sub>. Аморфный белый порошок, [ $\alpha$ <sub>D</sub><sup>20</sup> - 47° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS (m/z 1343.455 [M+H]<sup>+</sup> ESI/MS m/z 1343 [M+H]<sup>+</sup>, MS-MS<sub>n</sub> m/z 1214.5 [M+H-132]<sup>+</sup>, 1049.5 [M+H-132-162]<sup>+</sup>, 1065.5 [M+H-132-146]<sup>+</sup>, 903.5 [M+H-132-146-162]<sup>+</sup>, 741.5 [M+H-132-146-162x2]<sup>+</sup>, 579.5 [M+H-132-146-162x3], 417.5 [M+H-132-146-162x4].

В спектре <sup>1</sup>H ПМР вещества **2** видны сигналы четырех метильных групп при  $\delta$  0.68 (3H, с, Me-18), 0.75 (3H, с, Me-19), 0.87 (3H, д, J=6.8 Гц, Me-21), 0.71 (3H, д, J=7.0 Гц, Me-27), двух протонов вторичной алкогольной функции при  $\delta$  3.49 (1H, м, H-3), 4.23 (1H, дд, J=14.3, 7.2 Гц, H-16), двух метилен протонов  $\delta$  3.38 и 3.17 (по одной 1H, м, H-26a,b) и шести аномерных протонов  $\delta$  4.18 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Gal), 4.35 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Xyl), 4.38 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc I), 4.48 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc II), 4.65 (1H, д, J=2.4 Гц, H-1 Rha), 4.69 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc III). Качественный и количественный составы углеводной части установили спектрами COSY и HSQC, а последовательность их замещения – HMBC спектром, где видны значительные корреляционные пики между аномерными протонами сахара и атомами углерода:  $\delta$ <sub>H</sub> 4.35 (H-1 Xyl) и  $\delta$ <sub>C</sub> 83.5 (C-4 Rha),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.65 (H-1 Rha) и  $\delta$ <sub>C</sub> 77.3 (C-4 Glc II),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.48 (H-1 Glc II) и  $\delta$ <sub>C</sub> 88.1 (C-3 Glc I),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.69 (H-1 Glc III) и  $\delta$ <sub>C</sub> 80.8 (C-2 Glc I),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.38 (H-1 Glc I) и  $\delta$ <sub>C</sub> 80.5 (C-4 Gal),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.18 (H-1 Gal) и  $\delta$ <sub>C</sub> 77.9 (C-3 Agl) (табл. 3.12).

**Таблица 3.12.** Данные  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР сахарной части веществ **2, 6** (600 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , м.д.)

Атом C	Gal		Glc I		Glc II		Glc III		Rha		Xyl		Glc-26*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$												
1	102.4	4.18	105.0	4.38	104.0	4.48	103.9	4.69	101.4	4.65	106.5	4.35	104.4	4.06
2	73.1	3.18	80.8	3.52	75.4	3.06	75.8	2.94	72.0	3.57	75.8	2.95	74.8	2.90
3	75.2	3.32	88.1	3.56	77.6	3.22	78.0	3.17	71.9	3.61	78.1	3.09	78.2	3.09
4	80.5	3.76	77.9	3.13	77.3	3.37	75.2	3.04	83.5	3.38	70.9	3.23	71.5	3.01
5	70.3	3.21	75.2	3.04	70.9	3.13	76.9	3.25	68.3	3.95	67.4	3.66	75.0	3.04
6	62.2	3.69	62.1	3.69	61.4	3.58	62.3	3.69	19.2	1.10		3.00	62.5	3.69
		3.36		3.52		3.42		3.37						3.39

Следовательно, вещество **2** представляет собой (25 R)-5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

Вещество **3** C<sub>69</sub>H<sub>114</sub>O<sub>37</sub>, аморфный белый порошок [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -14° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS m/z 1535.621 [M+H]<sup>+</sup> ESI/MS m/z 1535 [M+H]<sup>+</sup>, MS-MS<sub>n</sub> m/z 1227.5 [M+H-162-146]<sup>+</sup>, 1065.5 [M+H-162x2-146]<sup>+</sup>, 741.5 [M+H-162x4-146], 417.5 [M+H-162x6-146].

Вещество **3** от вещества **2** отличается сахарной частью, где видны сигналы семи аномерных протонов:  $\delta$ <sub>H</sub> 4.18 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Gal), 4.28 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc V), 4.38 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc I), 4.47 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc II), 4.65 (1H, д, J=2.4 Гц, H-1 Rha), 4.69 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc III), 4.82 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc IV). С помощью НМВС спектра установлена последовательность их замещения:  $\delta$ <sub>H</sub> 4.28 (H-1 Glc V) и  $\delta$ <sub>C</sub> 88.8 (C-3 Glc IV),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.82 (H-1 Glc IV) и  $\delta$ <sub>C</sub> 79.9 (C-4 Glc III),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.65 (H-1 Rha) и  $\delta$ <sub>C</sub> 77.1 (C-4 Glc II),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.47 (H-1 Glc II) и  $\delta$ <sub>C</sub> 87.9 (C-3 Glc I),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.69 (H-1 Glc III) и  $\delta$ <sub>C</sub> 80.8 (C-2 Glc I),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.38 (H-1 Glc I) и  $\delta$ <sub>C</sub> 80.5 (C-4 Gal),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.18 (H-1 Gal) и  $\delta$ <sub>C</sub> 77.9 (C-3 Agl) (табл. 3.13).

Таким образом для вещества **3** предложена структура: (25 R)-5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

**Таблица 3.13.** Данные  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР сахарной части веществ **3, 7** (600 МГц, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.)

Атом	Gal		Glc I		Glc II		Glc III		Glc IV		Glc V		Rha		Glc-26*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$														
1	102.5	4.18	105.0	4.38	104.2	4.47	103.8	104.4	4.06	4.82	105.3	4.28	101.4	4.65	104.4	4.06
2	73.1	3.19	80.8	3.53	75.4	3.07	75.3	74.8	2.90	3.17	75.3	3.03	71.9	3.58	74.8	2.90
3	75.1	3.31	87.9	3.57	76.9	3.24	71.3	78.2	3.09	3.34	78.0	3.12	72.0	3.38	78.2	3.09
4	80.5	3.77	78.0	3.13	77.1	3.37	79.9	71.5	3.01	3.12	75.4	3.08	73.1	3.17	71.5	3.01
5	70.3	3.21	75.3	3.04	70.9	3.13	70.6	75.0	3.04	3.18	78.2	3.06	70.3	3.80	75.0	3.04
6	62.2	3.69	62.1	3.69	61.4	3.58	62.4	62.5	3.69	3.69	62.1	3.71	19.3	1.07	62.5	3.69
		3.36		3.52		3.42			3.39	3.36		3.38				3.39

**Таблица 3.14.** Данные  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР сахарной части веществ **4, 8** (600 МГц, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.)

Атом	Gal		Glc I		Glc II		Glc III		Glc IV		Glc V		Rha		Xyl		Glc-26*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$																
1	102.5	4.18	105.0	4.38	104.2	4.47	103.8	4.69	102.8	4.82	105.3	4.28	101.5	4.65	106.5	4.35	104.4	4.06
2	73.1	3.19	80.8	3.53	75.4	3.07	75.3	2.92	74.3	3.17	75.3	3.03	72.0	3.58	75.9	2.95	74.8	2.90
3	75.1	3.31	87.9	3.57	76.9	3.24	71.3	3.17	88.8	3.34	78.0	3.12	71.9	3.62	78.3	3.07	78.2	3.09
4	80.5	3.77	78.0	3.13	77.1	3.37	79.9	3.57	70.7	3.12	75.4	3.08	83.4	3.39	70.7	3.22	71.5	3.01
5	70.3	3.21	75.3	3.04	70.9	3.13	70.6	3.15	78.0	3.18	78.2	3.06	68.4	3.97	67.5	3.66	75.0	3.04
6	62.2	3.69	62.1	3.69	61.4	3.58	62.4	3.68	62.2	3.69	62.1	3.71	19.2	1.10		3.00	62.5	3.69
		3.36		3.52		3.42		3.38		3.36		3.38						3.39

**Таблица 3.15.** Данные  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР сахарной части веществ **1, 5** (600 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , м.д.)

Атом С	5												1	
	Gal		Glc I		Glc II		Glc III		Rha		Glc 26*		$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$												
1	102.4	4.18	105.0	4.38	104.0	4.48	103.9	4.69	101.4	4.65	104.4	4.06	103.5	4.25
2	73.1	3.18	80.8	3.52	75.4	3.06	75.8	2.94	71.9	3.58	74.8	2.90	74.4	3.33
3	75.2	3.32	88.1	3.56	77.6	3.22	78.0	3.17	72.0	3.38	78.2	3.09	76.5	3.53
4	80.5	3.76	77.9	3.13	77.3	3.37	75.2	3.04	73.1	3.17	71.5	3.01	71.1	3.57
5	70.3	3.21	75.2	3.04	70.9	3.13	76.9	3.25	70.3	3.80	75.0	3.04	75.9	3.34
6	62.2	3.69	62.1	3.69	61.4	3.58	62.3	3.69	19.3	1.07	62.5	3.69	62.8	3.87
		3.36		3.52		3.42		3.37				3.39		3.80

Для табл. 3.12-3.15 Glc-26\* - только для фуруранолов.

Вещество **4** C<sub>74</sub>H<sub>122</sub>O<sub>41</sub>, аморфный белый порошок [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 29° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS m/z 1667.776 [M+H]<sup>+</sup> ESI/MS m/z 1667 [M+H]<sup>+</sup>, MS-MS<sub>n</sub> m/z 1535 [M+H-132]<sup>+</sup>, 1504 [M+H-162], 1372 [M+H-132-162]<sup>+</sup>, 1211 [M+H-132-162x2]<sup>+</sup>, 1065 [M+H-132-146-162x2], 903 [M+H-132-146-162x3]<sup>+</sup>, 741 [M+H-132-146-162x4], 579.5 [M+H-132-146-162x5], 417.5 [M+H-132-146-162x6].

В спектре <sup>1</sup>H ПМР вещества **4** видны сигналы восьми аномерных протонов сахара, от вещества **3** отличается наличием одной молекулы ксилозы, замещенной в четвертом положении рамнозой, что установлено корреляционным пиком между  $\delta$  4.35 (H-1 Xyl) и  $\delta$  83.4 (C-4 Rha) (табл. 3.14).

Итак вещество **4** имеет строение: (25 R)-5 $\alpha$ -спиростан-3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

Вещество **5**, C<sub>63</sub>H<sub>106</sub>O<sub>33</sub>. Аморфный белый порошок [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 45° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS m/z 1391.496 [M+H]<sup>+</sup> ESI/MS m/z 1391 [M+H]<sup>+</sup>, MS-MS<sub>n</sub> m/z 1211 [M+H-18-162]<sup>+</sup>, 1065 [M+H-18-162-146]<sup>+</sup>, 903 [M+H-18-146-162x2]<sup>+</sup>, 741 [M+H-18-146-162x3], 579 [M+H-18-146-162x4], 417 [M+H-18-146-162x5].

В спектрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР вещества **5** видны характерные сигналы стероидного скелета (табл. 3.11). В спектре <sup>13</sup>C сигналы соответственно гемиацетальной и первичной алкогольной функций  $\delta$  111.1 и 75.2 указывают на фураностанольную структуру гликозида [3]. Спектр <sup>1</sup>H показал сигналы шести

аномерных протонов сахара:  $\delta$  4.06 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc IV), 4.18 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Gal), 4.38 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc I), 4.48 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc II), 4.65 (1H, д, J=2.4 Гц, H-1 Rha), 4.69 (1H, д, J=7.8 Гц, H-1 Glc III). Последовательность их замещения установлена НМВС спектром, где видны значительные корреляционные пики между аномерными протонами сахара и атомами углерода:  $\delta_{\text{H}}$  4.06 (H-1 Glc IV) и  $\delta_{\text{C}}$  75.2 (C-26 Agl),  $\delta_{\text{H}}$  4.65 (H-1 Rha) и  $\delta_{\text{C}}$  77.3 (C-4 Glc II),  $\delta_{\text{H}}$  4.48 (H-1 Glc II) и  $\delta_{\text{C}}$  88.1 (C-3 Glc I),  $\delta_{\text{H}}$  4.69 (H-1 Glc III) и  $\delta_{\text{C}}$  80.8 (C-2 Glc I),  $\delta_{\text{H}}$  4.38 (H-1 Glc I) и  $\delta_{\text{C}}$  80.5 (C-4 Gal),  $\delta_{\text{H}}$  4.18 (H-1 Gal) и  $\delta_{\text{C}}$  77.9 (C-3 Agl) (табл. 3.15).

На основании полученных результатов вещество **5** представляет собой 26-O- $\beta$ -D- глюкопиранозил (25 R)-5 $\alpha$ -фу-  
ростан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -  
D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-  
O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

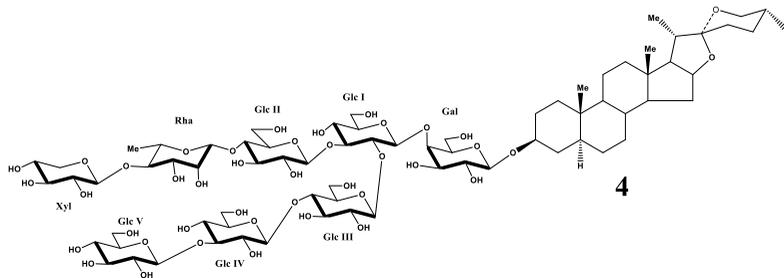
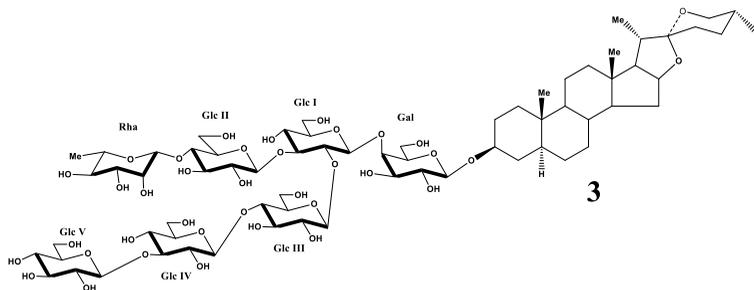
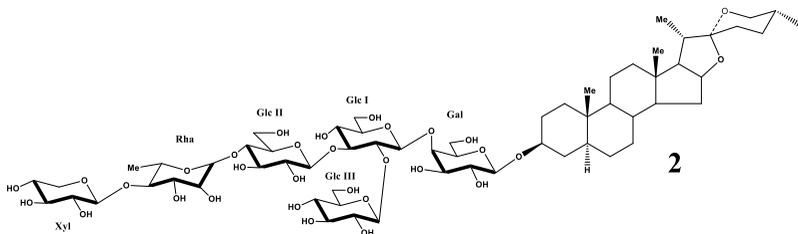
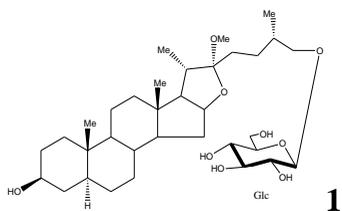
Вещество **6**, C<sub>68</sub>H<sub>114</sub>O<sub>37</sub>. Аморфный белый порошок [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -  
49° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS m/z 1523.611 [M+H]<sup>+</sup>. ESI/MS  
m/z 1523 [M+H]<sup>+</sup>, 1343 [M+H-18-162]<sup>+</sup>, 1211 [M+H-18-162-  
132]<sup>+</sup>, 1065 [M+H-18-162-132-146]<sup>+</sup>, 903 [M+H-18-146-132-  
162x2]<sup>+</sup>, 741 [M+H-18-146-132-162x3]<sup>+</sup>, 579 [M+H-18-146-132-  
162x4]<sup>+</sup>, 417 [M+H-18-146-132-162x5]<sup>+</sup>.

Вещество **7**, C<sub>75</sub>H<sub>126</sub>O<sub>43</sub>. Аморфный белый порошок [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -  
15° (с 1.0; DMSO). HR-TOF-MS m/z 1715.777 [M+H]<sup>+</sup>. ESI/MS  
m/z 1715 [M+H]<sup>+</sup>, 1535 [M+H-18-162]<sup>+</sup>, 1373 [M+H-18-162x2]<sup>+</sup>,  
1227 [M+H-18-146-162x2-146]<sup>+</sup>, 1065 [M+H-18-162x3-146]<sup>+</sup>,  
903 [M+H-18-146-162x4]<sup>+</sup>, 741 [M+H-18-146-162x5]<sup>+</sup>, 579  
[M+H-18-146-162x6]<sup>+</sup>, 417 [M+H-18-146-162x7]<sup>+</sup>.

Вещество **8**, C<sub>80</sub>H<sub>134</sub>O<sub>47</sub>. Аморфный белый порошок [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 32° (с 1.0; DMSO). Спектральные данные <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР сведены в табл. 3.11 и 3.12. HR-TOF-MS m/z 1847.892 [M+H]<sup>+</sup>. ESI/MS m/z 1847 [M+H]<sup>+</sup>, 1667 [M+H-18-162]<sup>+</sup>, 1535 [M+H-18-162-132]<sup>+</sup>, 1373 [M+H-18-162x2-132]<sup>+</sup>, 1227 [M+H-18-162x2-132-146]<sup>+</sup>, 1065 [M+H-18-162x3-146-132]<sup>+</sup>, 903 [M+H-18-146-132-162x4]<sup>+</sup>, 741[M+H-18-146-132-162x5]<sup>+</sup>, 579 [M+H-18-146-132-162x6], 417 [M+H-18-146-132-162x7]<sup>+</sup>.

Вещество **6**, как и вещества **7** и **8**, фураностанолы. Сахарная часть вещества **6** идентична веществу **2**, вещества **7** – веществу **3**, а вещества **8** – веществу **4**.

Исходя из полученных данных, структуры веществ **6**, **7** и **8** установлены как: 26-O-β-D-глюкопиранозил 25(R)-5α-фураностан-3β,22α,26-триол 3-O-β-D-ксилопиранозил-(1→4)-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид (**6**); 26-O-β-D-глюкопиранозил 25(R)-5α-фураностан-3β,22α,26-триол 3-O-α-L-Rhap-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид (**7**); 26-O-β-D-глюкопиранозил 25(R)-5α-фураностан-3β,22α,26-триол 3-O-β-D-ксилопиранозил-(1→4)-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-[O-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-глюкопиранозил-(1→2)]-O-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозид (**8**).



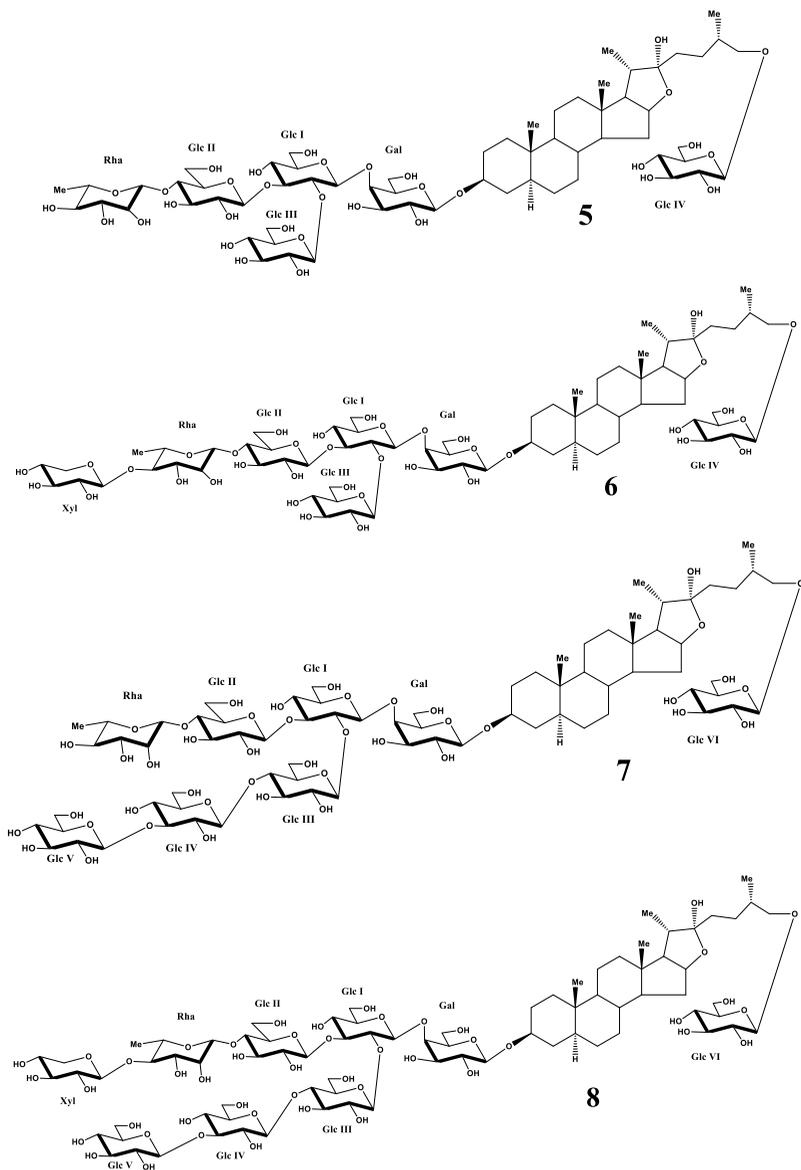


Рис. 3.5. Структуры новых гликозидов (веществ **1-8**) перикарпия плодов *Yucca gloriosa*

Следовательно, гликозиды семян юкки славной представлены в основном спиростаноловыми формами, из них выделены и идентифицированы биозиды смиллагенина – юккалоезид А и сарсасапогенина – тимосапонин. Из перикарпия изолированы 11 стероидных гликозидов : 6 спиростаноловых и 5 фуростаноловых, среди них 2 производные смиллагенина, один – сарсасапогенина, а остальные 8 новые соединения оказались производными тигогенина [42].

Наблюдения за уникальным случаем появления плодов на *Yucca gloriosa* будут продолжаться.

### **3.4. Стероидные гликозиды стеблей *Yucca gloriosa* L.**

*Yucca gloriosa* L. образует мощные неразвитые стебли, которые составляют 30-35% общей массы всего растения. В предыдущие годы нами показано содержание в стеблях стероидных сапогенинов – смиллагенина, тигогенина, гекогенина, неогитогенина, а также спиростанолового гликозида – юккалоезида А [43].

Для изучения стероидных гликозидов от стеблей отделяли темноцветную кожуру, грубо измельчали и сушили на воздухе. 300 г в/с измельченных стеблей извлекали 70% метанолом при нагревании на водной бане. Из экстракта спирт отгоняли, водную жидкость очищали хлороформом и переносили на колонке Diaion HP-20. Элюировали градиентной системой  $H_2O-MeOH \rightarrow 10:0 \rightarrow 0:10$ . Получены 4 фракции по 500 мл каждый. Из водного элюата после отгонки растворителя остается 75.1 г твердого остатка, из 30% MeOH – 1.7 г, 80% MeOH – 10.2 г и MeOH – 1.1 г. Остатки хроматографировали на колонке Sephadex LH-20 и затем

силикагелем. Изолированы 5 индивидуальных соединений. Вещество **1** - 10 мг, **2** - 6 мг, **3** - 5 мг, **4** - 7 мг, **5** - 12 мг.

Структуры веществ установлены с помощью моно- и двухмерных ЯМР ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, COSY) и масс-спектрологии (ESI/MS). Один из них (**3**) оказался новым, а остальные известными соединениями идентифицированы как: 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид кофейной кислоты (**1**) [44]; 26-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил (25R) 5 $\beta$ -фураностан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-О- $\beta$ -D-галактопиранозид (**2**) [3]; 25(S) 5 $\beta$ -спиростан-3 $\beta$ -ол-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-О- $\beta$ -D-галактопиранозид (**4**) [45]; (25R) 5 $\beta$ -спиростан-3 $\beta$ -ол-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-О- $\beta$ -D-галактопиранозид (**5**) [9].

В спектре  $^1\text{H}$  ПМР вещества **3** видны сигналы четырех метильных групп при  $\delta$  1.08 (3H, с, Me-18), 0.99 (3H, с, Me-19), 1.04 (3H, д, J=6.7 Гц, Me-21), 1.10 (3H, д, J=6.7 Гц, Me-27), двух протонов вторичной алкогольной функции  $\delta$  4.08 (1H, м, H-3), 4.34 (1H, м, H-16), двух метилен протонов  $\delta$  3.93 и 3.29 (по одной 1H, м, H-26ab), и двух аномерных протонов  $\delta$  4.40 (1H, д, J=7.9 Гц, H-1 Gal), 4.66 (1H, д, J=7.5 Гц, H-1 Glc).  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр показывает сигналы двух вторичных алкогольных функций  $\delta$  76.0 (C-3) и 80.5 (C-16) и одной первичной  $\delta$  65.9 (C-26), что указывает на спиростаноловое строение гликозида (табл. 3.16). S конфигурация при C-25 установлена разницей химических сдвигов между протонами H2-26 ( $\Delta\text{ab}=0.64$  ppm). Сигналы спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР  $\delta$  1.97 (1H, м, H-5) и  $\delta$  37.0 (C-5) указывают на 5 $\beta$  ряд гликозида. Кетонная группа при C-12 доказана в HMBC спектре корреляционным пиком между  $\delta$  1.08 (3H, с, Me-18) и  $\delta$  215.8 (C-12). Таким образом, агликон представляет собой (25S) 5 $\beta$ -спиростан-3 $\beta$ -

ол-12-он или **виллагенин** [46]. Качественный и количественный состав углеводной части установлен спектрами COSY и HSQC, а последовательность их замещения HMBC спектром, где видны значительные корреляционные пики между аномерными протонами сахара и атомов углерода:  $\delta_{\text{H}}$  4.40 (H-1 Gal) и  $\delta_{\text{C}}$  76.0 (C-3 AgI),  $\delta_{\text{H}}$  4.66 (H-1 Glc) и  $\delta_{\text{C}}$  79.0 (C-2 Gal).

**Таблица 3.16.** Данные  $^{13}\text{C}$ - и  $^1\text{H}$  ЯМР вещества **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д., J в Гц) стеблей юкки славной

Атом C	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$	Атом C	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$
1	30.7	1.56, 1.34, м	22	110.8	-
2	27.6	1.45, 1.19, м	23	29.7	1.62, 1.43, м
3	76.0	4.08, м	24	26.8	1.44, 1.34, м
4	30.9	1.86, 1.54, м	25	28.4	1.68, м
5	37.0	1.97, м	26	65.9	3.93, 3.29, м
6	27.3	1.92, 1.43, м	27	16.2	1.10, д (6.7)
7	27.0	1.55, 1.42, м	D-Gal		
8	35.7	2.03, м	1	101.4	4.40, д (7.9)
9	43.2	1.86, м	2	79.0	3.84, дд (8.5, 7.9)
10	36.7	-	3	75.0	3.68, дд (8.5, 2.9)
11	38.4	2.45, 2.07, м	4	70.2	3.84, дд (2.9, 1.2)
12	215.8	-	5	76.2	3.48, м
13	56.4	-	6	62.2	3.75, дд (12.0, 2.0)
14	57.5	1.23, м			3.70, дд (12.0, 4.5)
15	31.7	2.15, 1.51, м	D-Glc		
16	80.5	4.34, дд (14.5, 7.5)	1	104.3	4.66, д (7.5)
17	54.8	2.49, м	2	76.0	3.20, дд (9.0, 7.5)
18	16.3	1.08, с	3	77.7	3.37, дд (9.0, 9.0)
19	24.3	0.99, с	4	71.8	3.25, дд (9.0, 9.0)
20	43.2	1.79, м	5	78.1	3.28, ддд (9.0, 4.5, 2.0)
21	13.5	1.04, д (6.7)	6	62.9	3.84, дд (12.0, 2.0)
					3.67, дд (12.0, 4.5)

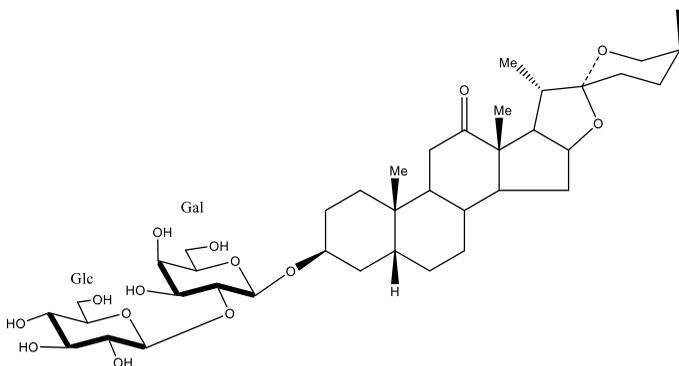


Рис. 3.6. Структура нового гликозида (вещества **3**) стеблей *Yucca gloriosa*

Исходя из полученных данных, вещество **3** охарактеризовано как 25(S) 5 $\beta$ -спиростан- 3 $\beta$ -ол-12-он 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-0- $\beta$ -D-галактопиранозид. Виллагенин гликозид с таким набором моносахаров в литературе не описан, и вещество это является новым соединением.

Следовательно, из очищенных от кожуры стеблей выделены и идентифицированы 5 соединений, из них глюкопиранозид кофеиновой кислоты; один фуростаноловый гликозид производный смиллагенина, 3 спиростаноловые, среди них один производный смиллагенина – юккалоезид А и – один сарсасапогенина – тимосапонин. Как доказано, один гликозид является новым соединением, производным кетосапогенина – виллагенина [47].

Таким образом можно констатировать отличие химического состава стеблей *Yucca gloriosa* от других ее органов.

### 3.5. Стероидные гликозиды корневищ *Yucca gloriosa* L.

*Yucca gloriosa* образует мощную корневую систему, большей частью которой является корневище. Масса корневища одного 5-10-летнего растения составляет 3-4 кг в/с сырья.

Корни, кожура корневища, кожура стеблей стероидов не содержат. В них биосинтезируются фенольные соединения стильбенового класса.

Корневище богато стероидными гликозидами, общая сумма которых доходит до 6%, состоит из не менее чем 11 компонентов. В отличие от листьев и цветков в корневище накапливаются стероиды не 5 $\alpha$ , а 5 $\beta$  ряда.

#### 3.5.1. Выделение и характеристика стероидных гликозидов корневищ юкки славной

200 г освобожденных от кожуры измельченных в/с корневищ извлекали 80% и конц. метанолом. Из объединенных экстрактов спирт отгоняли, остаток высушивали под вакуумом и фракционировали между гексаном (4 г), водой (32 г) и н-бутанолом (11 г).

Для разделения подобрана колонка и мобильная фаза по комбинации анализирующих веществ и определяющих матриц. Использование Atlantis C18 колонки и градиентной системы привели к хорошим результатам разделения бутаноловой фракции корневищ.

Положительный ионный электрораспылительный LC-MS анализ осуществлен в пределах 190-1260 Amu [48-50]. Описаны 12 основных компонентов: m/z 917 (вещества **1** и **3**),

m/z 915 (вещество **2**), m/z 1199 (вещество **4**), m/z 903 (вещества **5** и **7**), m/z 757 (вещества **6** и **9**), m/z 755 (вещество **8**), m/z 741 (вещества **10-12**). Ионным скринингом и LC-MS методом идентифицированы все выделенные вещества **1-12**, структуры которых установлены с использованием NMR экспериментов [48-50].

2 г бутанольного экстракта хроматографировали через колонку силикагеля (100x2,5 см, 100/160  $\mu$ м Merck), промывали градиентной системой хлороформ-метанол (9:1→0:10). Собирали элюаты по 8 мл, получали 225 фракций; их объединяли по отдельным фракциям: А (25 мг), В (36 мг), С (120 мг) и D (37 мг). Из колонки силикагеля непосредственно были получены два индивидуальных спиростаноловых гликозида – вещества **10** (40 мг) и **11** (62 мг). Фракции А-D разделяли на ВЭЖХ (Rp-HPLC) с рефракторным детектором на колонке с обратной фазой (Waters XTerra Prep MSC 18, 7.8x300 мм) и промывали метанолом разной концентрации в изократных условиях. Из фракции А (57% MeOH, скорость течения 2 мл/мин) выделены вещества **2** (3,5 мг  $t_R=30.4$  мин) и **1** (5.2 мг,  $t_R=36.8$  мин). Из фракции В (65% MeOH, скорость течения 2 мл/мин) изолированы вещества **6** (3.8 мг,  $t_R=16.7$  мин), **8** (4.2 мг,  $t_R=23.8$  мин), **12** (7.4 мг,  $t_R=38.6$  мин), **3** (1.2 мг,  $t_R=24.2$  мин); из фракции С (60% MeOH, скорость течения 2 мл/мин) – вещества **5** (5.2 мг,  $t_R=38$  мин) и **7** (2.2 мг,  $t_R=41.2$  мин); из фракции D (65% MeOH, скорость течения 2 мл/мин) - вещества **9** (1.5 мг,  $t_R=25.9$  мин) и **4** (1.2 мг,  $t_R=28.8$  мин).

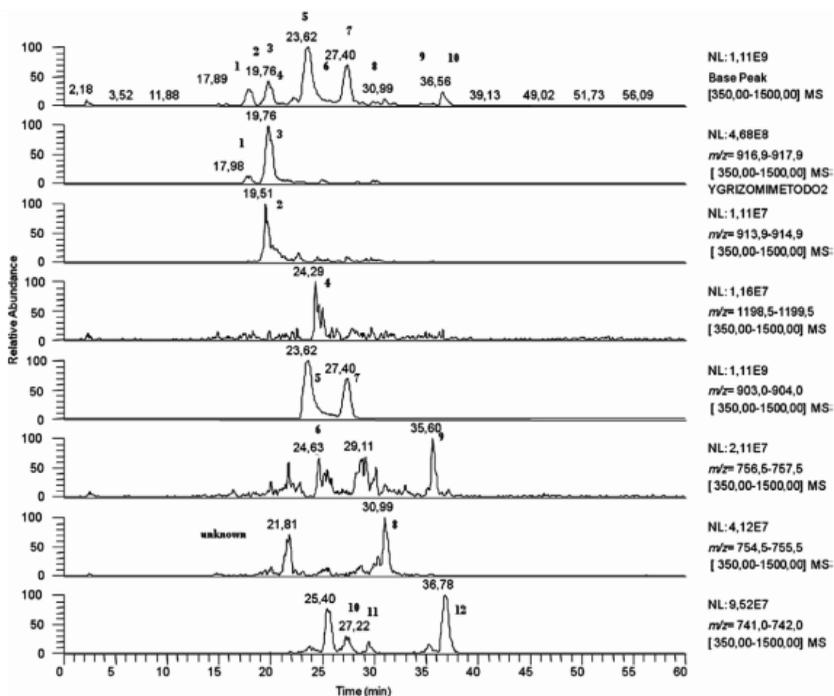


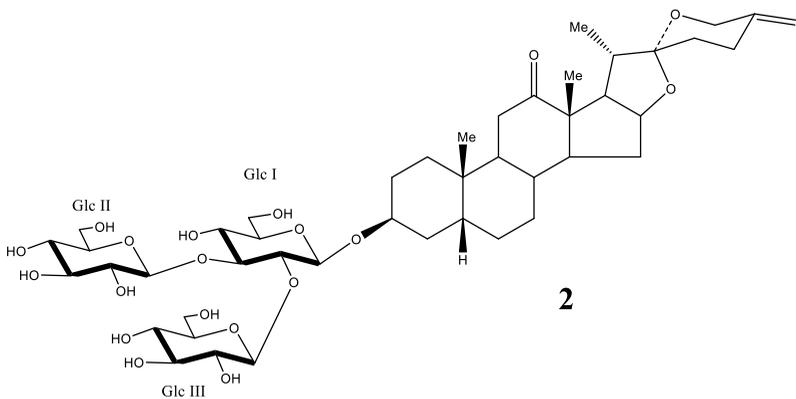
Рис. 3.7. Позитивный ионный способ LC-MS анализа бутанольного экстракта корневищ *Yucca gloriosa*. Хроматограммы полного ионного потока и выделенных ионов для веществ **1-12**

Для вещества **2** HRMALDITOF масс-спектр ( $m/z$  937.4412  $[M+Na]^+$ ) соответствует формуле  $C_{45}H_{70}O_{19}$ . ESI-MS спектр показывает основной ионный пик  $m/z$  937.4  $[M+Na]^+$ , а MS/MS этого иона  $m/z$  775.4  $[M+Na-162]^+$ , который отмечает отщепление гексозы. В  $MS^3$  спектре пик  $m/z$  613.4  $[M+Na-162 \times 2]^+$  показывает удаление второй гексозы и под конец в  $MS^4$  спектре пик  $m/z$  451.4  $[M+Na-162 \times 3]^+$  указывает на потери третьей гексозы. В  $^1H$  ПМР спектре вещества **2** появляются сигналы двух четвертичных метильных групп при

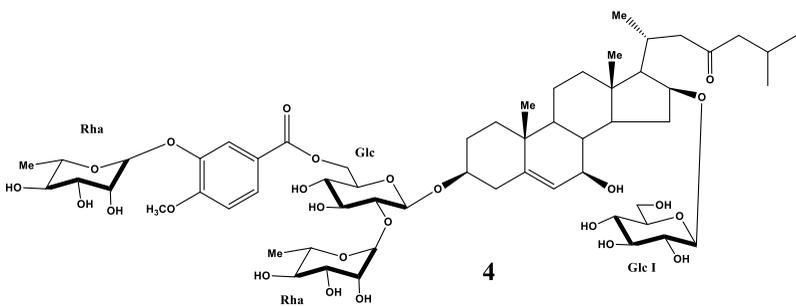
$\delta$  1.11 (3H, c) и 1.12 (3H, c), вторичных метильных групп  $\delta$  1.05 (3H, д, J=6.6 Гц), протоны экзометилена  $\delta$  4.81 и 4.72 (каждый 1H, уд c), сигналы двух протонов метила  $\delta$  4.31 и 3.87 (каждый 1H, д, J=12.1 Гц), также три аномерных протона  $\delta$  4.96 (1H, д, J=7.5 Гц), 4.68 (1H, д, J=7.5 Гц) и 4.51 (1H, д, J=7.5 Гц). В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре агликона вещества отмечены сигналы при  $\delta$  215.6 кетогруппы,  $\delta$  110.1 кетальной функции, один первичный  $\delta$  65.3 и два вторичных спиртовой функции  $\delta$  75.4 и 80.7. Следовательно агликон представляет собой спиростанол, содержащий кето-группу. На основании HSQC и HMBC корреляционных спектров агликон вещества **2** охарактеризован как 5 $\beta$ -спиростан 25(27)-ен-3 $\beta$ -ол-12-он или шидигерагенин В, который впервые изолирован из *Yucca schidigera* [24].

Химические сдвиги всех трех сахарных остатков подсчитаны комбинацией 1D-TOCSY и DQF-COSY спектральных анализов, а  $^{13}\text{C}$  ЯМР химические сдвиги их соответствующих углеродов по HSQC спектру (таблица 3.18). Эти данные доказывают наличие остатков трех  $\beta$ -глюкопиранози. Гликозилированные сдвиги отмечаются при атомах углерода: C-3 Glc I ( $\delta$  87.6), C-2 Glc I ( $\delta$  78.9) и C-3 ( $\delta$  75.4). В углеводной части последовательность замещения была установлена HMBC спектром, который показывает значительные корреляционные пики между сигналами аномерных протонов и углеродных резонансов ( $\delta_{\text{H}}$  4.51 (H-1 Glc I)/  $\delta_{\text{C}}$  75.4 (C-3),  $\delta_{\text{H}}$  4.96 (H-1Glc II)/  $\delta_{\text{C}}$  87.6 (C-3 Glc I) и  $\delta_{\text{H}}$  4.68 (H-1 Glc III)/  $\delta_{\text{C}}$  78.9 (C-2 Glc I).

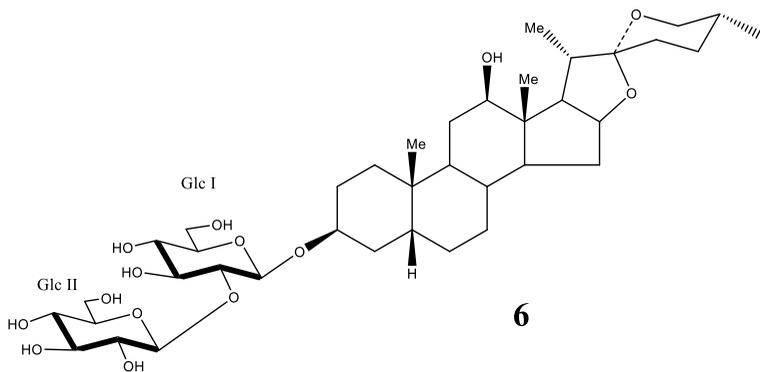
Исходя из всего указанного, новое соединение **2** имеет структуру 5 $\beta$ -спиростан 25(27)-ен-3 $\beta$ -ол-12-он 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[ $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид.



2



4



6

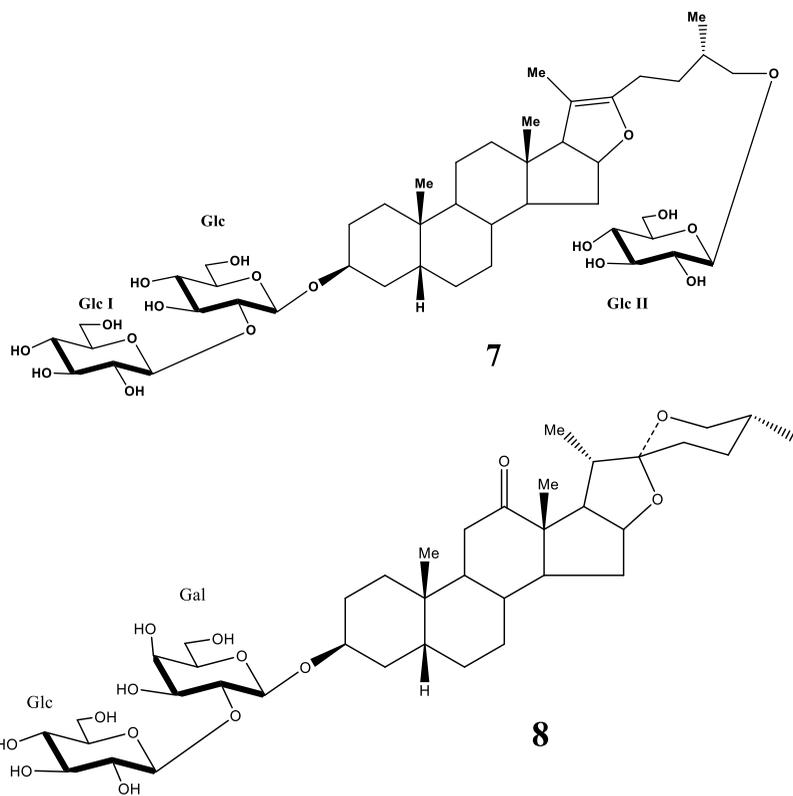


Рис. 3.8. Новые гликозиды (вещества **2**, **4**, **6**, **7**, **8**) из корневищ *Yucca gloriosa*

Молекулярная формула вещества **8** установлена HRMALDITOF анализом, как  $C_{39}H_{62}O_{14}$  ( $m/z$  777.4041  $[M+Na]^+$ ). ESI-MS спектр показывает основной ионный пик  $m/z$  777.4  $[M+Na]^+$ , а MS/MS этого иона  $m/z$  615.3  $[M+Na-162]^+$ , который доказывает отщепление гексозы. В  $MS^3$  спектре пик  $m/z$  453,4  $[M+Na-162 \times 2]^+$  указывает потери второй гексозы. При сравнении  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР данных агликонов веществ **8** и **2**, разница отмечена только при C-27 в

положении замещением метилом  $\delta_{\text{H}} 0.79/\delta_{\text{C}} 17.0$  экзометиленной группы. На основании  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров агликон **8** идентифицирован как 25 R-5 $\beta$ -спиростан-3 $\beta$ -ол-12-он или глориогенин [40, 51]. В спектре  $^1\text{H}$  ПМР видны сигналы аномерных протонов двух сахаров  $\delta$  4.68 (1H, д, J=7.5 Гц) и 4.41 (1H, д, J=7.5 Гц). Полное отнесение  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данных углеводной части было достигнуто HSQC, HMBC, DQF-COSY и 1D-TOCSY экспериментами, которые утверждают наличие одной  $\beta$ -галактопиранозы ( $\delta$  4.41) и одной  $\beta$ -глюкопиранозы ( $\delta$  4.68). Сдвиги гликозилирования были отмечены и при C-3 ( $\delta$  75.8) и C-2 Gal ( $\delta$  78.6) при углеродных атомах, чем доказываемся последовательность замещения сахаров. Спектр HMBC показывает значительные корреляционные пики между сигналами аномерных протонов и углеродных резонансов ( $\delta$  4.41 (H-1 Gal)/  $\delta$  75.8 (C-3) и  $\delta$  4.68 (H-1 Glc)/  $\delta$  78.6 (C-2 Gal)).

Следовательно структура вещества **8** установлена как (25R)-5 $\beta$ -спиростан 3 $\beta$ -ол-12-он 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид и является новым соединением.

HRMALDITOF масс-спектр вещества **6** соответствует молекулярной формуле  $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$  ( $m/z$  779.4199  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ). Спектр ESI-MS показывает основной пик иона  $m/z$  779.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , а MS/MS иона  $m/z$  617.4  $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$  указывает отщепление гексозы. В спектре MS<sup>3</sup> пик  $m/z$  455,4  $[\text{M}+\text{Na}-162 \times 2]^+$  показывает отщепление второй гексозы. Сравнение данных ЯМР вещества **6** с веществом **8** показывает, что в агликоне вещества **6** кетогруппа при C-12 замещена 12 $\beta$ -гидрокси группой, чем доказано, что агликон является 12 $\beta$ -гидроксисмилагенином [52]. В спектре  $^1\text{H}$  ПМР отмечены

сигналы аномерных протонов двух сахаров  $\delta$  4.68 (1H, д, J=7.5 Гц) и 4.47 (1H, д, J=7,5 Гц).

Комбинацией спектров HSQC, DQF-COSY и 1D-TOCSY оба сахара являются  $\beta$ -глюкопиранозой. В спектре HMBC отмечены значительные корреляционные пики между сигналами аномерных протонов и резонансов углерода ( $\delta$  4.47 (H-Glc I)/ $\delta$  75.9 (C-3), а также  $\delta$  4.68 (H-1 Glc II)/  $\delta$  80.6 (C-2 Glc I). Соответственно новое соединение **6** охарактеризовано как (25R)-5 $\beta$ -спиростан 3 $\beta$ ,12 $\beta$ -диол- 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

Молекулярная формула вещества **7** установлена HRMALDITOF анализом как C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>O<sub>18</sub> (m/z 925.4778 [M+Na]<sup>+</sup>). Спектр ESI-MS показывает пик основного иона m/z 925.5 [M+Na]<sup>+</sup>, а MS/MS этого иона m/z 763.5 [M+Na-162]<sup>+</sup> соответствует отщеплению гексозы, а в спектре MS<sup>3</sup> пик m/z 601.5 [M+Na-162x2]<sup>+</sup> удалению второй гексозы. В <sup>1</sup>H ПМР спектре вещества **7** отмечены сигналы трех четвертичных метильных групп при  $\delta$  0.72, 1.02, 1.63 (каждый 3H, с), один вторичной метиловой группы  $\delta$  0.98 (3H, д, J=6.6 Гц), два метилового протона  $\delta$  4.74 (1H, м), 4.12 (1H, м), две первичных спиртовых функции  $\delta$  3.35, 3.82 и три аномерных протонов  $\delta$  4.70 (1H, д, J=7.5 Гц), 4.48 (1H, д, J=7.5 Гц), 4.26 (1H, д, J=7.5 Гц). В спектре <sup>13</sup>C ЯМР агликона два sp<sup>2</sup> углероды  $\delta$  105.4 и 153.0, две вторичные ( $\delta$  76.0, 85.5) и одна первичная ( $\delta$  75.8) спиртовые функции указывают на фураностаноловую природу агликона (таблица 3.17). На основе HSQC и HMBC корреляции агликона вещество **7** идентифицировано как (25R)-5 $\beta$ -фурост-20(22)-ен 3 $\beta$ ,26-диол или псевдосмилагенин. C-25 R конфигурация установлена разницей химических сдвигов H<sub>2</sub>-26 парных протонов ( $\Delta_{ab}$ =0.45). Известно, что для 25 S-

стероидов  $\Delta_{ab}$  в основном  $>0.57$ , а  $<0.48$  в 25 R стероидах [41]. Сравнение ЯМР спектральных данных с макростемонозидом F разница отмечается наличием глюкозы при C-3 взамен галактозы. Итак, новое вещество **7** представляет собой 26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил (25R)-фурост-20(22)-ен 3 $\beta$ ,26-диол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

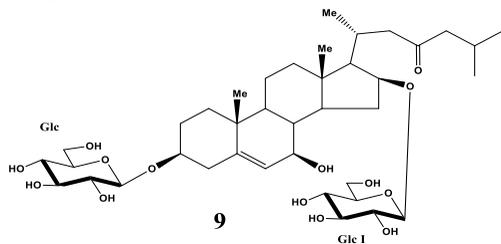
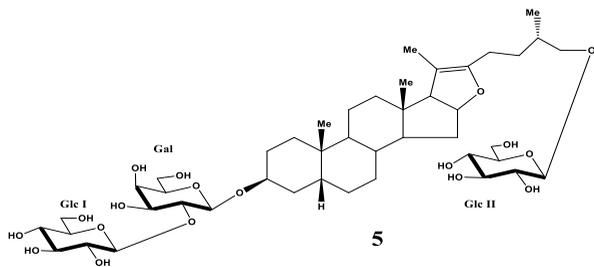
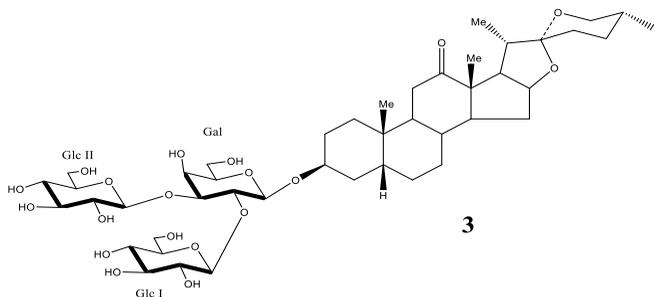
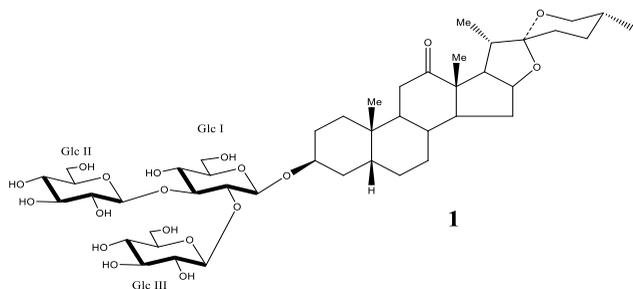
Гликозид псевдосмилагенина из рода *Yucca* изолирован и описан впервые.

Положительный ESI-MS спектр вещества **4** показывает пик основного иона  $m/z$  1221.6  $[M+Na]^+$  и значительный фрагмент  $m/z$  1075.6  $[M+Na-146]^+$  в MS/MS анализе, который указывает отщепление дезоксигексозы. MS<sup>3</sup> фрагментация ионного пика  $m/z$  1057.6  $[M+Na-146-18]^+$ , показатель удаления воды. Под конец, в MS<sup>4</sup> спектре пик 911.5  $[M+Na-146 \times 2-18]$  утверждает отщепление второй дезоксигексозы. Молекулярная формула вещества установлена спектром HRMALDITOF, C<sub>59</sub>H<sub>90</sub>O<sub>25</sub> ( $m/z$  1221.5672  $[M+Na]^+$ ). В <sup>1</sup>H ПМР спектре вещества **4** видны сигналы двух четвертичных  $\delta$  0.95 (3H, с), 1.04 (3H, с) и трех вторичных метиловых групп  $\delta$  0.99 (3H, д, J=6.6 Гц), 0.95 (3H, д, J=6.6 Гц), 0.95 (3H, д, J=6.6 Гц), трех метин протонов  $\delta$  4.16 (1H, м), 3.50 (1H, м), 3.69 (1H, дд, J=8.2, 2.1 Гц) и олефинового протона  $\delta$  5.24 (1H, ушд). Показатели <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектров находятся в соответствии с литературным данным 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -тригидроксихолест-5-ен-23-еном [53]. Дополнительно в <sup>1</sup>H ПМР спектре появились три ароматных протона  $\delta$  7.68 (1H, дд, J=8.2, 2.0 Гц), 7.65 (1H, д, J=2.0 Гц), 7.24 (1H, д, J=8.1 Гц), метокси группа 3.92 (3H, с), сигналы четырех аномерных протонов  $\delta$  5.52 (1H, д, J=1.2 Гц), 4.86 (1H, д, J=1.2 Гц), 4.46 (1H, д, J=7.5 Гц), 4.22 (1H, д, J=7.5 Гц). HSQC, HMBC и DQF-COSY эсперименты дали нам

возможность установить наличие остатков ванилоила, двух  $\beta$ -глюкопиранози ( $\delta$  4.46 и 4.22) и двух  $\alpha$ -рамнопиранози ( $\delta$  5.52 и 4.86). НМВС спектр показывает значительные корреляционные пики между сигналами протона и резонансов углерода  $\delta_H$  4.46 (H-1 Glc I) /  $\delta_C$  79/6 (C-3),  $\delta_H$  4/86 (H-1 Rha I) /  $\delta_C$  80.4 (C-4 Glc II),  $\delta_H$  4.22 (H-1 Glc II) /  $\delta_C$  83.3 (C-16), НМВС корреляция протон сигнала  $\delta$  4.56 (H2-6 Glc I) и резонанса углерода  $\delta$  167.5 (C-7 van) указывает на присоединение при C-3 глюкозы, которая эстрифицирована остатком ванилоила в положении C-6, а под конец корреляция между протоном сигнала  $\delta$  5.52 (H-1 Rha II) и резонансом углерода  $\delta$  151.1 (C-4 van) отмечается в спектре НМВС. Из полученных данных вещество **4** охарактеризовано как 16-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-холест-5-ен-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -триол-23-он 3-O-{6-O-[3-метокси-4-O( $\alpha$ -L-рамнопиранозил)-бензоил]- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-глюкопиранозид}.

Кроме новых веществ (**2**, **4**, **6-8**) из корневищ выделены и идентифицированы 7 соединений (**1**, **3**, **5**, **9-12**) которые оказались известными с химическим строением: **1** - (25R)-5 $\beta$ -спиростан 3 $\beta$ -ол-12-он 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид [51]; **3** - (25R)-5 $\beta$ -спиростан 3 $\beta$ -ол-12-он 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-галактопиранозид [51]; **5** - 26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил (25R)-фурост-20(22)-ен 3 $\beta$ ,26-диол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид - макростемонозид F [54]; **9** - 3,16-ди- O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-холест-5-ен-23он 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ -триол - камасиозид [53]; **10** - (25R)-5 $\beta$ -спиростан 3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид [40]; **11** - (25R)-5 $\beta$ -

спиростан 3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид [40]; 12 - (25S)-5 $\beta$ -спиростан 3 $\beta$ -ол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид [45].



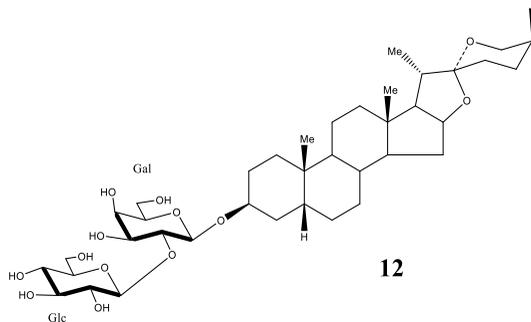
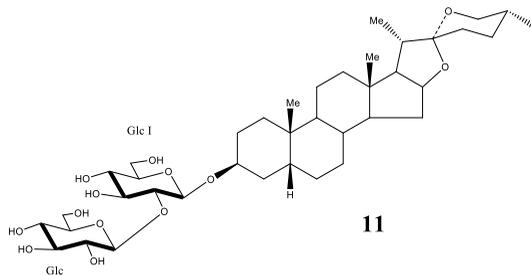
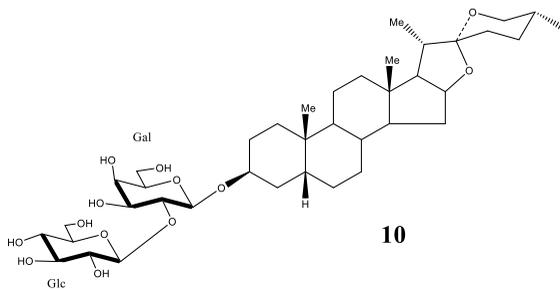


Рис. 3.9. Гликозиды (вещества **1, 3, 5, 9-12**) из корневищ *Yucca gloriosa*

**Таблица 3.17.**  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР данные ( $\delta$  в м.д., J в Гц) агликонов веществ **2, 4, 6-8** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц)

№	2		4		6		7		8	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
1	30.4	1.92, 1.57 м	37.8	1.69, 0.79 м	31.3	1.88, 1.59 м	31.0	1.89, 1.59 м	30.7	1.90, 1.55 м
2	27.3	1.71, 1.60 м	30.9	1.88, 1.58 м	27.4	1.70, 1.63 м	26.8	1.69, 1.63 м	27.5	1.70, 1.60 м
3	75.4	4.12 м	79.6	3.50 м	75.9	4.11 м	76.0	4.12 м	75.8	4.11 м
4	30.9	1.89, 1.55 м	38.8	2.42, 2.26 м	31.4	1.89, 1.54 м	31.0	1.89, 1.53 м	30.8	1.91, 1.58 м
5	36.7	1.93 м	143.9		36.8	1.93 м	37.3	1.91 м	36.6	1.91 м
6	27.0	2.00, 1.47 м	127.4	5.24 уш д (2.1)	27.8	2.00, 1.48 м	27.3	1.98, 1.49 м	27.2	1.98, 1.45 м
7	26.7	1.25, 1.17 м	73.3	3.69 дд (8.2, 2.1)	27.0	1.26, 1.19 м	27.4	1.23, 1.18 м	26.8	1.27, 1.17 м
8	35.7	1.80 м	40.8	1.49 м	37.3	1.61 м	36.3	1.64 м	35.3	1.82 м
9	43.2	1.65 м	49.9	0.94 м	40.3	1.55 м	41.2	1.47 м	43.1	1.67 м
10	36.0	-	37.7	-	36.3	-	36.2	-	36.7	-
11	38.4	2.25, 2.04 м	21.8	1.50 (2H) м	37.4	1.65, 1.44 м	21.9	1.49, 1.38 м	37.9	2.20, 2.03 м
12	215.6	-	40.5	2.06, 1.22 м	80.6	3.29 м	40.9	1.84, 1.32 м	215.8	-
13	36.7	-	44.0	-	46.9	-	44.8	-	56.5	-
14	37.6	1.45 м	55.1	1.06 м	56.0	1.20 м	56.0	1.16 м	57.1	1.42 м
15	32.1	2.00, 1.32 м	39.0	2.48, 1.88 м	32.7	2.02, 1.38 м	34.9	2.19, 1.42 м	32.2	2.02, 1.35 м
16	30.7	4.43 м	83.3	4.16 м	82.0	4.40 м	85.5	4.74 м	80.6	4.34 м
17	34.8	2.32 м	61.5	1.26 дд (11.6, 7.9)	62.9	1.85 м	65.7	2.52 д (10.1)	54.8	2.29 м
18	16.3	1.12 с	13.4	0.95 с	16.3	0.75 с	14.8	0.72 с	16.0	1.07 с
19	23.8	1.11 с	19.1	1.04 с	24.5	1.03 с	24.2	1.02 с	23.5	1.08 с
20	43.2	1.98 м	28.4	2.55 м	43.3	1.92 м	105.4		43.0	1.91 м
21	3.5	1.05 д (6.6)	19.6	0.99 д (6.6)	13.5	1.02 д (6.6)	11.5	1.63 с	12.9	1.02 д (6.6)

Таблица 3.17. Продолжение

22	110.1	-	50.5	2.77 уш д (15.4, 2.0) 2.30 дд (15.4, 10.4)	110.6	-	153.0	-	109.3	-
23	33.9	1.78, 1.75 м	216.2		32.3	1.64 (2Н) м	23.9	2.15 (2Н) м	32.3	1.60 (2Н) м
24	29.0	2.57, 2.20 м	53.5	2.41(2Н) дд (7.1, 2.3)	29.3	1.48 (2Н) м	31.7	1.64, 1.30 м	29.3	1.48 (2Н) м
25	144.4		25.1	2.13 м	31.5	1.61 м	34.1	1.81 м	31.1	1.63 м
26	55.3	4.31 д (12.1) 3.87 д (12.1)	22.9	0.95 д (6.6)	67.6	3.45, 3.30 м	75.8	3.80, 3.35 м	67.5	3.45, 3.30 м
27	30.4	4.81, 4.72 уш с	22.9	0.95 д (6.6)	17.3	0.82 д (5.8)	17.1	0.98 д (6.6)	17.0	0.79 д (5.8)

**Таблица 3.18 а.**  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР данные ( $\delta$  в м.д., J в Гц) моносахарных остатков веществ **2, 4, 6**  
корневищ юкки славной

№	2		4		6			
	$\beta$ -D-Glc I	$\beta$ -D-Glc I	$\beta$ -D-Glc I	$\alpha$ -L-Rha II	$\beta$ -D-Glc I	$\beta$ -D-Glc I		
1	100.6	4.51 д (7.5)	101.9	4.46 д (7.5)	100.4	5.52 д (1.2)	100.7	4.47 д (7.5)
2	78.9	3.72 дд (9.0, 7.5)	75.1	3.27 дд (9.0, 7.5)	71.8	4.12 дд (1.2, 3.2)	80.6	3.58 дд (9.0, 7.5)
3	87.6	3.76 дд (9.0, 9.0)	76.5	3.55 дд (9.0, 9.0)	72.1	3.92 дд (3.2, 9.3)	77.8	3.30 дд (9.0, 9.0)
4	69.9	3.38 дд (9.0, 9.0)	80.4	3.55 дд (9.0, 9.0)	73.5	3.52 г (9.3)	71.5	3.29 дд (9.0, 9.0)
5	78.2	3.33 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	74.1	3.75 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	71.0	3.72 м	78.2	3.57 ддд (9.0, 4.5, 2.0)
6	62.7	3.87 дд (12.0, 2.0); 3.68 дд (12.0, 4.5)	64.6	4.56 дд (12.0, 2.0); 4.56 дд (12.0, 4.5)	17.7	1.25 д (6.0)		3.87 дд (12.0, 2.0); 3.68 дд (12.0, 4.5)
		$\beta$ -D-Glc II		$\alpha$ -L-Rha I		$\beta$ -D-Glc II		$\beta$ -D-Glc II
1	103.4	4.96 д (7.5)	102.7	4.86 д (1.2)	106.5	4.22 д (7.5)	104.2	4.68 д (7.5)
2	75.8	3.13 дд (9.0, 7.5)	72.1	3.92 дд (1.2, 3.2)	75.2	3.21 дд (9.0, 7.5)	76.1	3.22 дд (9.0, 7.5)
3	77.9	3.39 дд (9.0, 9.0)	72.1	3.69 дд (3.2, 9.3)	78.0	3.37 дд (9.0, 9.0)	77.5	3.38 дд (9.0, 9.0)
4	72.3	3.16 дд (9.0, 9.0)	73.7	3.44 г (9.3)	71.3	3.28 дд (9.0, 9.0)	71.7	3.24 дд (9.0, 9.0)
5	77.7	3.32 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	70.5	4.02 м	77.6	3.25 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	78.0	3.28 ддд (9.0, 4.5, 2.0)
6	63.4	3.85 дд (12.0, 2.0); 3.65 дд (12.0, 4.5)	17.7	1.31 д (6.0)	62.7	3.87 дд (12.0, 2.0); 2.0;	62.4	3.85 дд (12.0, 2.0); 3.68 дд (12.0, 4.5)
		$\beta$ -D-Glc III		Vanillic acid				

Таблица 3.18 а. Продолжение

1	104.3	4.68 д (7.5)	125.5 □				
2	75.0	3.31 дд (9.0, 7.5)	114.0	7.65 д (2.0)			
3	77.9	3.38 дд (9.0, 9.0)	151.4 □				
4	71.4	3.31 дд (9.0, 9.0)	151.5 □				
5	77.8	3.38 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	117.6	7.24 д(8.1)			
6	62.8	3.87 дд (12.0, 2.0); 3.67 дд (12.0, 4.5)	124.1	7.68 дд (2.0, 8.1)			
7			167.5 □				
OMe			56.2	3.92 с			

**Таблица 3.18 б.**  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР данные ( $\delta$  в м.д., J в Гц) моносахарных остатков веществ **7-8**  
продолжение

№	7		8	
	$\beta$ -D-GlcI		$\beta$ -D-Gal	
1	100.5	4.48 д (7.5)	101.4	4.41 д (7.5)
2	80.4	3.59 дд (9.0, 7.5)	78.6	3.92 дд (8.5, 7.9)
3	78.0	3.35 дд (9.0, 9.0)	74.9	3.71 дд (8.5, 2.9)
4	71.8	3.25 дд (9.0, 9.0)	70.2	3.83 дд (2.9, 1.2)
5	78.2	3.59 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	76.3	3.54 м
6	62.9	3.88 дд (12.0, 2.0); 3.69 дд (12.0, 4.5)	62.2	3.87 дд (12.0, 2.0); 3.68 дд (12.0, 4.5)
		$\beta$ -D-Glc II		$\beta$ -D-Glc
1	103.4	4.70 д (7.5)	104.2	4.68 д (7.5)
2	75.5	3.24 дд (9.0, 7.5)	76.1	3.22 дд (9.0, 7.5)
3	77.9	3.35 дд (9.0, 9.0)	77.5	3.39 дд (9.0, 9.0)
4	71.4	3.34 дд (9.0, 9.0)	71.7	3.26 дд (9.0, 9.0)
5	77.7	3.28 ддд (9.0, 4.5, 2.0)	78.0	3.30 ддд (9.0, 4.5, 2.0)
6	62.9	3.88 дд (12.0, 2.0); 3.69 дд (12.0, 4.5)	62.4	3.88 дд (12.0, 2.0); 3.70 дд (12.0, 4.5)
		$\beta$ -D-Glc III		
1	104.3	4.26 д (7.5)		
2	75.4	3.22 дд (9.0, 7.5)		
3	77.7	3.38 дд (9.0, 9.0)		
4	71.5	3.22 дд (9.0, 9.0)		
5	77.7	3.29 ддд (9.0, 4.5, 2.0)		
6	62.9	3.88 дд (12.0, 2.0); 3.69 дд (12.0, 4.5)		

Для исследования богатого стероидного состава корневищ еще проведены дополнительные эксперименты и выделены 3 гликозида. Продолжая нумерацию гликозидов, они обозначены веществами **13**, **14**, **15**.

Вещество **13** белый аморфный порошок  $[\alpha]_D^{20} - 33,9^\circ$  (с 0,1; MeOH). В положительном ESI/MS показывает основной пик при  $m/z$  957  $[M+Na]^+$  и значительные фрагменты  $m/z$  795  $[M+Na-162]^+$  и  $m/z$  633  $[M+Na-162]$ , чем доказано отщепление остатков одной и второй молекулы гексозы соответственно. Молекулярная формула установлена как  $C_{46}H_{78}O_{19}$  с помощью HR-MALDI масс-спектрометрии ( $m/z$  957, 5042  $[M+Na]^+$ ).  $^1H$  ЯМР спектр вещества **13** показывает сигналы четырех метильных групп агликона  $\delta$  0.84 (3H, с), 0.99 (3H, д,  $J=6.6$  Гц), 1.01 (3H, с) и 1.02 (3H, д,  $J=6.6$  Гц), одна метокси группа при  $\delta$  3.17 (3H, с), два метин протон сигнала при  $\delta$  4.11 (1H, м) и 4.38 (1H, м), указывающие на вторичную алкогольную функцию, два метиленовых протон сигнала при  $\delta$  3.42 (1H, м) и 3.74 (1H, м), принадлежащие первичной алкогольной функции и три аномерных протона при  $\delta$  4.64 (1H, д,  $J=7.5$  Гц), 4.40 (1H, д,  $J=7.5$  Гц), и 4.27 (1H, д,  $J=7.5$  Гц).  $^{13}C$  ЯМР спектр проявляет сигналы, принадлежащие гемикетальной функции при  $\delta$  113.9, двух вторичных алкогольной при  $\delta$  76.1 и 82.4 и один первичной алкогольной функции при  $\delta$  75.2, наводящие на случаи гликозида фурустаноловым скелетом. На основе HSQC и HMBC корреляции, также сравнением с литературными данными [55], агликон вещества **13** идентифицирован как (25R)-22 $\alpha$ -метокси-5 $\beta$ -фурустан-3 $\beta$ ,26-диол. Конфигурация H-5 $\beta$  установлена на основе  $^{13}C$  ЯМР резонансов колец A и B, полностью отличающихся от 5 $\alpha$  изомера [56]. Конфигурация метокси группы при C-22 была доказана из

ROESY корреляции между H-20 ( $\delta$  2.19) и протонов H-23a ( $\delta$  1.84) и H-23b ( $\delta$  1.64). C-25 R конфигурация установлена на основе разницы химических сдвигов ( $\Delta_{ab} = \delta_a - \delta_b$ ) парных протонов при H<sub>2</sub>-26 ( $\Delta_{ab} = 0.32$  ppm). На основании <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР данных очевидно, что сахарная часть при C-3 вещества **13** содержит остатки двух сахаров.

Химические сдвиги остатков сахаров установлены комбинациями 1D-TOCSY и DQF-COSY спектральных анализов и <sup>13</sup>C химических сдвигов их соответствующих углеродов из HSQC спектра. Эти данные показывают присутствие остатка одной  $\beta$ -галактопиранози ( $\delta$  4.40) и одной  $\beta$ -глюкопиранози ( $\delta$  4.64). Сдвиг гликозилирования был обнаружен для C-2 Gal ( $\delta$  78.9). HMBC спектр показывает основные корреляционные пики между протон сигналом при  $\delta$  4.40 (H-1 Gal) и резонансом углерода при  $\delta$  76.1 (C-3 агликона), протон сигналом при  $\delta$  4.64 (H-1 Glc) и резонансом углерода при 78.9 (C-2 Gal) (Таблица 3.20). На основе полученных результатов структура вещества **13** установлена как (25R)-26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-22 $\alpha$ -метокси-5 $\beta$ -фураностан-3 $\beta$ ,26-диол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

Вещество **14** белый аморфный порошок  $[\alpha]_D^{20} - 30.2^\circ$  (с 0.1; MeOH). Анализ ЯМР вещества **14** по сравнению с веществом **13** показывает замещение метокси группы при C-22 гидрокси группой, отсутствием сигналов при  $\delta$  3.17 в <sup>1</sup>H ПМР и  $\delta$  47.1 <sup>13</sup>C ЯМР спектрах и небольшой разницей в химических сдвигах парных протонов при H<sub>2</sub>-26 ( $\delta$  3.36; 3.82 вещества **14**;  $\delta$  3.74; 3.42 вещества **13**). Итак структура вещества **14** установлена как 26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил

(25R)-5 $\beta$ -фуростан 3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-галактопиранозид.

**Таблица 3.19.**  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные агликонов веществ **13** и **14**  
(CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  в м.д., 600 МГц)

атом C	вещество 13	вещество 14	атом C	вещество 13	вещество 14
	$\delta_c$	$\delta_c$		$\delta_c$	$\delta_c$
1	30.7	30.8	15	32.7	32.7
2	27.0	27.0	16	82.4	82.4
3	76.1	76.0	17	65.2	65.2
4	30.9	30.4	18	16.6	16.6
5	37.2	37.2	19	24.2	24.2
6	27.5	27.6	20	41.5	41.2
7	27.7	27.7	21	16.0	16.6
8	36.8	36.8	22	113.8	111.6
9	41.0	41.1	23	31.2	37.4
10	35.5	35.5	24	28.4	28.6
11	22.1	22.1	25	34.2	34.4
12	41.1	41.1	26	75.2	75.5
13	42.0	42.0	27	17.1	17.6
14	57.5	57.5	OMe	47.1	

Вещество **15** белый аморфный порошок  $[\alpha]_D^{20}$  - 43,2° (с 0,1; MeOH). Сравнение данных ЯМР анализа вещества **15** и **14** ясно показывает, что отличие между ними состоит в присоединении остатка глюкозы при C-3 агликона вместо галактозы вещества **14**. Итак, структура вещества **15** была установлена как: 26-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил (25R)-5 $\beta$ -фуростан 3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-триол 3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил (1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил, который ранее был изолирован из *Yucca schidigera* [55].

Вещества **13** и **14** являются новыми соединениями, их (25 S)-эпимеры изолированы из *Anemarrhena asphodeloides* (Liliaceae) [55].

**Таблица 3.20.**  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР данные ( $\delta$  в м.д., J в Гц) моносахарных остатков веществ **13** и **14** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц)

атом С	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	атом С	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
Gal			Glc		
1	101.6	4.40, д, J=7.5	1	104.5	4.27, д, J=7.5
2	78.9	3.86, дд, J=7.5, 9.0	2	75.1	3.21, дд, J=7.5, 9.0
3	75.1	3.70, дд, J=4.0, 9.0	3	77.9	3.37, дд, J=9.0, 9.0
4	70.2	3.87, дд, J=4.0, 2.5	4	71.7	3.29, дд, J=9.0, 9.0
5	76.3	3.50, м	5	77.8	3.24, м
6	62.2	3.72, м	6	62.8	3.88, дд, J=2.0, 12.0
		3.74, м			3.70, дд, J=4.5, 12.0
Glc I					
1	104.5	4.64, д, J=7.5			
2	76.0	3.23, дд, J=7.5, 9.0			
3	77.9	3.39, дд, J=9.0, 9.0			
4	71.6	3.26, дд, J=9.0, 9.0			
5	77.9	3.29, м			
6	63.0	3.87, дд, J=2.0, 12.0			
		3.71, дд, J=4.5, 12.0			

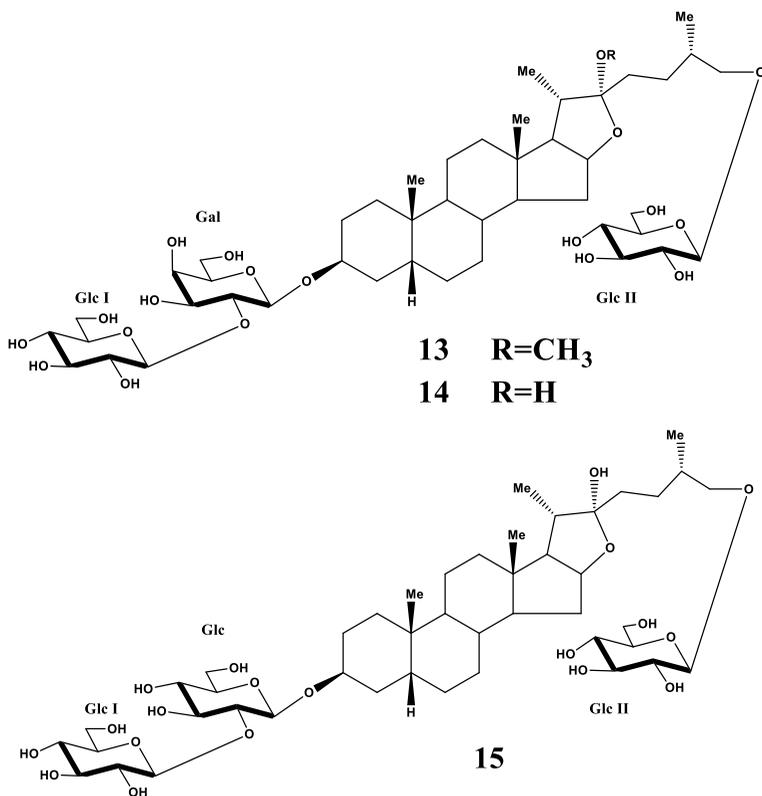


Рис. 3.10. Новые гликозиды (**13-14**) корневищ *Yucca gloriosa*

### 3.5.2. LC-MS анализ и количественное определение гликозидов корневищ юкки славной

Известно, что стероидные гликозиды HPLC ультрафиолетовым детектором не определяются из-за отсутствия УФ хромофор. Они требуют градиентного элюирования. LC-

MS анализ стероидных гликозидов при этом селективен и чувствителен. Таким путем и осуществлен анализ гликозидов корневищ юкки славной.

Для качественного и количественного анализа получали экстракт сапонинов следующим образом: 200 г освобожденных от кожуры в/с измельченных корневищ экстрагировали 80% метанолом. Из объединенного экстракта спирт отгоняли, водный остаток высушивали под вакуумом, остаток (47 г) растворяли в 150 мл воды, очищали от липофильных веществ гексаном, затем извлекали н-бутанолом. Получали обогащенную стероидными соединениями фракцию в количестве 11 г (5.5% от в/с корневищ).

1 мг бутанольный экстракт растворяли в 1 мл метанола и 20 мкл анализировали в хроматографической системе. Для количественного анализа наиболее точные результаты давал жидкостный хроматограф в сочетании с масс-спектрометром, в особенности мониторинг мультиплетной реакции (MRM), который дает возможность наблюдения пиков в процессе анализа, что обуславливает селективность и точность метода. Таким образом, метод количественного анализа стероидных гликозидов в корневищах юкки славной был разработан на масс-спектрометре, снабженном электрораспылительным источником и трипл-квадрольным анализатором.

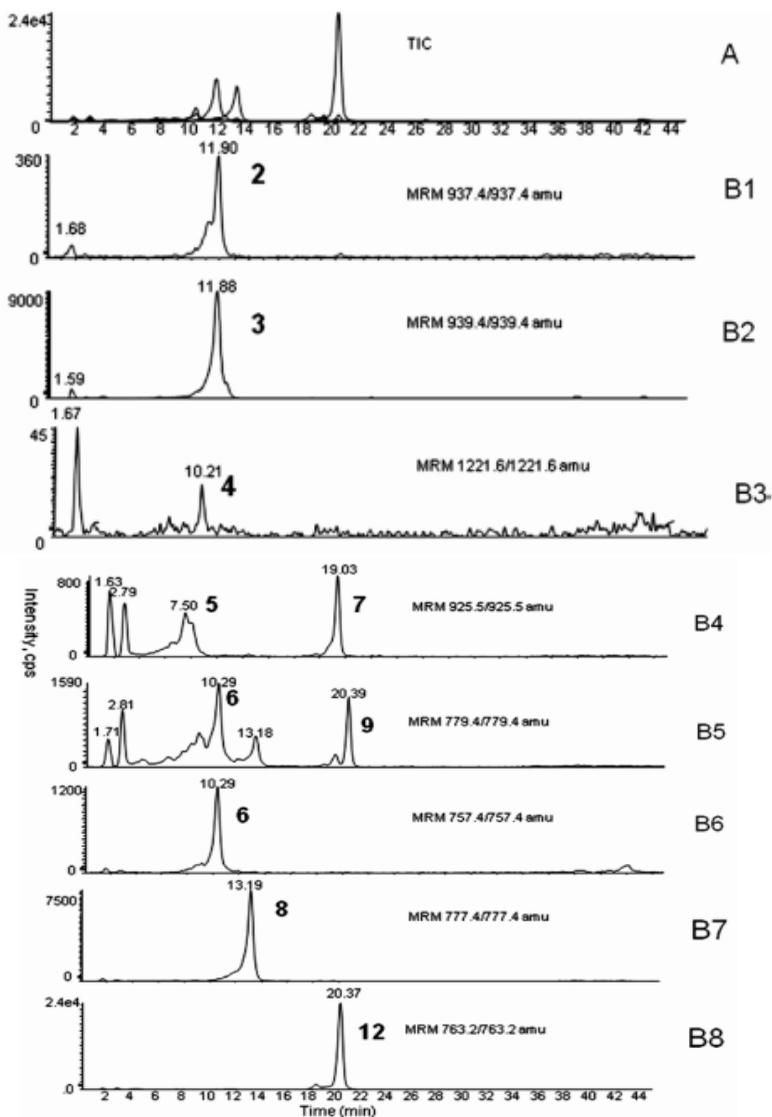


Рис. 3.11. Позитивный ионный способ LC-ESI-MS/MS псевдо-MRM анализа бутанольного экстракта корневищ *Yucca gloriosa*: (A) суммарный профиль всех Q1-Q2 специфичных переходов. (B1- B8) профиль специфичных переходов основных ионов, полученных в псевдо- MRM способе

Для оптимизации условий масс-спектрометрии фрагментационный анализ проведен 0.1 мкг/мл раствора для каждого вещества. Для всех соединений потеря сахарной части была преобладающей фрагментацией псевдомолекулярного иона  $[M+H]^+$ . В спектре MSI преобладающий ион содировали  $[M+Na]^+$ , фрагментация которого была трудной. Поэтому количественный анализ осуществлен работой в мониторинге псевдомультиплетной реакции (pseudo-MRM), который является тандемным масс-спектрометрическим методом записи, с использованием квадрополюсов в обоих случаях, как при работе в MRM. Прекурсорный ион и ион продукта записываются с одними и теми же значениями, которые соответствуют молекулярному иону с добавлением натрия,  $m/z$  937.4 для вещества **2**,  $m/z$  939.4 для **3**,  $m/z$  1221.6 для **4**,  $m/z$  925.5 для веществ **5** и **7**,  $m/z$  779.4 для **9**,  $m/z$  777.4 для **8**,  $m/z$  763.2 для **12**. Для вещества **6** содированный ион  $m/z$  779.4 нестабилен и поэтому для анализа протонированный ион  $m/z$  757.4 был подобран (рис. 3.11).

Из-за высокой чистоты (> 99%) для количественного анализа вещества **2**, **9** и **12** были подобраны; из-за низкой чистоты вещества **1**, **10** и **11** были изъяты из анализа.

Рисунок 3.11. показывает профиль LC-MS/MS девяти анализируемых образцов. Для всех веществ калибровочная кривая была построена шести различных концентраций (1; 2,5; 5; 10; 25 и 50 мкг/мл) с использованием внешнего стандарта. Во всех случаях калибровочная кривая была линейная в пределах концентрации 1-25 мкг/мл. Обогащенная сапонинами бутаноловая фракция 5 аликвоты проанализировали на количественное содержание гликозидов. В таблице 3.21 приведены результаты количественного анализа.

HPLC-MS/ MS метод валидирован по гайдланам аналитических методов Европейского Медицинского Агентства (ЕМЕА), основанный на псевдо MRM метод специфический, так как время удерживания маркированных веществ (2-9 и 12) на хроматограмме различное и пики не перекрывают друг друга. Точность и воспроизводимость были подсчитаны на основе анализа разных концентраций (1,5 и 10 мкг/мл) трех образцов вещества 2 в течение одного дня. Оценка анализа осуществлена в течение 3 дней. Стандартное отклонение было меньше 5%. Калибровочная кривая на основе внешнего стандарта линейная в пределах концентрации 1-50 мкг/мл. Лимит количественности - (LOQ) наименьшая концентрация анализируемого образца, который соответствует точности и воспроизводимости, была определена многократным инжестированием разбавленных стандартных растворов, LOQ анализируемых веществ во всех случаях был меньше 20 мкг/мл. В таблице 3.21 представлены значения валидации метода количественного анализа веществ 2-9 и 12.

**Таблица 3.21.** Количественные данные для веществ 2-9 и 12 и их концентрация в экстракте корневищ *Yucca gloriosa* L.

Вещество	r <sup>2</sup>	Уравнение калибровочной кривой	LOQ нг мл <sup>-1</sup>	LOD нг мл <sup>-1</sup>	Сухой экстракт мг/г
2	0.998	y = 443 x + 778	7.83	1.85	24.96 (2.26)
3	0.999	y = 1890 x + 53.3	5.38	0.75	6.93 (0.28)
4	0.997	y = 16.1 x + 101	13.71	1.17	8.82 (0.31)
5	0.994	y = 217.0 x - 435	9.81	1.56	45.12 (2.11)
6	0.999	y = 1930 x - 588	11.35	1.38	28.36 (2.52)
7	0.999	y = 1270 x + 483	8.52	0.98	14.43 (0.16)
8	0.998	y = 1420 x - 125	9.99	0.91	31.44 (2.81)
9	0.999	y = 1310 x - 959	11.11	2.01	9.55 (1.02)
12	0.999	y = 1270 x + 483	7.41	0.86	67.20 (2.03)

Таким образом, показано богатое содержание (до 6%) стероидных гликозидов в корневищах юкки славной. Из них выделены и охарактеризованы 15 соединений: 8 спиростаноловых, 2 холестаноловых и 5 фуростаноловых гликозидов. Среди них 7 новых соединений: 3 спиростаноловых гликозида, производных шидигерагенина, гидроксисмилагенина и глориогенина, 3 фуростаноловых гликозида, производных смилагенина и 1 холестаноловый гликозид [3, 58].

### **3.5.3. Рост стимулирующая активность стероидных гликозидов корневищ юкки славной**

Исследованию в качестве стимулятора растений была подвергнута обогащенная стероидными гликозидами н-бутанольная фракция названная нами «глориозином».

Проведенными в Институте иммунологии сельскохозяйственных растений Грузии под руководством проф. Н. Наскидашвили исследованиями было установлено, что глориозин является эффективным стимулятором роста растений. Он вызывает как стимуляцию прорастания семян, так и прорастание спор патогенных грибов. Выявлен и его стимулирующий эффект на защитные механизмы растения от заболеваний. Установлено высокое стимулирующее действие глориозина на рост и развитие лекарственных растений. Предпосевной обработкой семян *Echinaceae purpurea* Moench. и *Melissa officinalis* водными растворами глориозина в концентрации 50 мг/л урожайность возросла на 34-40%.

### Литература к главе 3

1. Бенидзе М.М., Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П. Спиро-станоловые гликозиды *Yucca gloriosa*. Химия природ. соедин. 1991, 2, 291-296
2. Кемертелидзе Э. П., Бенидзе М.М., Схиртладзе А.В. Стероидные соединения *Yucca gloriosa* L., интродуцированной в Грузии, и их применение. Химико-фармац. журнал, 2009, 43, 1, 27-29
3. Skhirtladze A., Plaza A., Montoro P., Benidze M., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S. Furostanol glycosides from *Yucca gloriosa* L. rhizomes. Biochemical systematics and Ecology, 2006, 34, 809-814
4. Montoro P., Skhirtladze A., Perrone A., Benidze M., Kemertelidze E., Piacente S. Determination of steroidal glycosides in *Yucca gloriosa* flowers by LC/MS/MS/. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 52, 791-795
5. Kemertelidze E., Benidze M. Steroidal glycosides of *Yucca gloriosa* and their influence on plant growth. Bulletin of Georgian Academy of Sciences, 2001, 164, 1, 91-93
6. Бенидзе М.М., Джикия О.Д., Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П., Шашков А.С. Стероидные гликозиды листьев *Yucca aloifolia* L. Химия природ. соедин. 1987, 4, 537-542
7. Kemertelidze E., Benidze M., Skhirtladze A. Steroidal glycosides from the leaves of *Yucca gloriosa* L. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences 2011, 5, 1, 159-163
8. Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А. Стероидные соединения некоторых растений, произрастающих в Грузии. Тбилиси, «Мецниереба», 1993, 183 с.
9. Бенидзе М.М., Джикия О.Д., Вугальтер М.М., Пхеидзе Т.А., Кемертелидзе Э.П. Новый стероидный сапонин из листьев *Yucca aloifolia*. Химия природ. соедин. 1984, 6, 744-747

10. Nakano K., Matsudu E., Tsurumi K., Yamusaki T., Murakami K., Takuishi Y., Tomimatsu T. The steroidal glycosides of the flowers of *Yucca gloriosa* L. *Phytochemistry*, 1988, 27, 10, 3235-3239
11. ქემერტელიძე ე., ფხეიძე თ., ბენიძე მ., დანელია გ., კანდელაკი მ. თესლების თესვისწინა დამუშავების ხერხი. საქართველოს რესპუბლიკის საპატენტო სიგელი გამოგონებაზე № 702, 17.12.92.
12. ქემერტელიძე ე., ფხეიძე თ., ბენიძე მ., დანელია გ., კანდელაკი მ. თესლების თესვისწინა დამუშავების ხერხი. საქართველოს რესპუბლიკის საპატენტო სიგელი სასარგებლო მოდელზე. № 237, 31.05.94.
13. ქემერტელიძე ე., ბენიძე მ., ნასყიდაშვილი პ., ზედგენიძე ი. იუკა დიდებულის და კუროსთავის სტეროიდული გლიკოზიდები, როგორც მარცვლოვანი კულტურების ზრდის სტიმულატორები. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, სამეცნიერო შრომათა კრებული, 2001, XV, 8-13
14. ქემერტელიძე ე., ბენიძე მ., წაქაძე თ., ოშხერელი მ., ლილუაშვილი ლ., მახარაშვილი ზ. სტეროიდული გლიკოზიდების გავლენა ზოგიერთი პათოგენი სოკოს სპორების გაღივებაზე, ლობიოს და სოიოს თესლების გაღივების ენერჯიაზე, აღმოცენების უნარსა და მოსავალზე. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, სამეცნიერო შრომათა კრებული, 2001, XV, 14-19
15. ქემერტელიძე ე., ბენიძე მ., ნასყიდაშვილი პ., ზედგენიძე ი., მახარაშვილი ზ. მცენარეთა ზრდის სტიმულატორის ალექსინის გავლენა კარტოფილის კულტურაზე. საქართველოს ქიმიური ჟურნალი, 2002, 2, 1, 76-78
16. ფხალაძე ნ., გახოკიძე რ., ქემერტელიძე ე., ბენიძე მ. ბიოსტიმულატორების გავლენა ვაზის ფესვთა სისტემის განვითარებაზე, საქართველოს სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა აკადემიის მოამბე, 2004, 12, 61-63

17. Кемертелидзе Э.П. Стероидные гликозиды *Tribulus terrestris* L., *Yucca gloriosa* L. и их использование в качестве стимуляторов роста-развития растений. Известия аграрной науки, 2011, 9, 1, 34-38
18. Волкова В.А., Урманцева В.В., Бурсунов А.Е. и др. Активирование защитных реакций у растений картофеля in vitro с помощью экзогенных стероидных гликозидов в условиях абиотического стресса. VIII Международная конференция «Биоантиоксиданты». Москва 2010, 4-6 октября, 89-90
19. Кемертелидзе Э.П., Бенидзе М.М., Пхеидзе Т.А. Стероидные гликозиды – стимуляторы роста и развития растений. В кн. Фитохимическое и растениеводческое исследование некоторых растений, произрастающих в Аджарии. 2010, 171 с.
20. Гогитидзе Ц.А., Беришвили Л.В., Джапаридзе Н.М., Ярош Е.А., Такидзе А.Р. Влияние стимуляторов растительного происхождения на рост и развитие некоторых лекарственных растений. Фитохимическое и растениеводческое исследование некоторых растений, произрастающих в Аджарии. 2010, 147 с.
21. ქემერტელიძე რ., ბენიძე მ., მახარაშვილი ზ., მარცვლოვანი კულტურების თესვების ზრდის სტიმულატორის მიღების ხერხი. პატენტი P 2310, 1998.
22. ქემერტელიძე ე., ბენიძე მ., სხირტლაძე ა. მცენარეთა ზრდის სტიმულატორის „ალექსინის“ მიღების ხერხი. პატენტი P 6658, 2017.
23. Lacaille–Dubois M.M., Wagner H. A Review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytochemistry 1996, 2, 363-386
24. Masazami Migakushi, Yubigahi Tamura, Hitoshi Masuda et al. Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohava Yucca) new antifungal-food deteriorating agent. Journal Natural products, 2000, 63, 332-338
25. Hostettman K.A., Marston A. Saponins. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

26. Favel A., Steinmetz M.D., Regli D. et al. In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta Medica*, 1994, 60, 50-53
27. Favel A., Kemertelidze E., Benidze M., Fallague K., Regli D. Antifungal activity of steroidal glycosides from *Yucca gloriosa*. *Phytotherapy Researches* 2005, 19, 158-161
28. Morrissey I.P., Osbourn A.E. Fungal resistance to plant antibiotic as a mechanism of pathogenesis *Micrbiol. Mol. Biol. Res.* 1999, 69, 708-724
29. Peyron F., Favel A., Calaf R. et al. Sterol and fatty acid composition of *Candida lusitanica* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemotherap.* 2002, 16, 531-533
30. ქემერტელიძე ე., ბენიძე მ., სხირტლაძე ა. სოკოს საწინააღმდეგო მოქმედების სპიროსტანოლური გლიკოზიდების მიღების ხერხი. პატენტი, GE U2011 1643 Y.
31. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений, 2010, Алматы, Казак Университет, 567 с.
32. Min Cheol Yang, Sung Min Kim, Kyu Ha Lee, Ki Hyun Kim, Kang Ro Lee. A new sesquiterpene glycoside from the aerial parts of *Saussurea triangulate*. *Molecules* 2007, 12, 2270-2276
33. Brigida D'Abrosca, Paolo De Maria, Marina Dellagrecia, Antonio Fiorentino, Annunziata Golino, Angelina Izzo, Pietro Monaco. Amarantholidols and amarantholidosides: New nerolidol derivatives from the weed *Amaranthus retroflexus*. *Tetrahedron* 2006, 62, 640-646
34. Хожамбергенова М., Блинова К.Ф. Фенолкарбоновые кислоты *Astragalus flexus*. *Химия природ. соедин.* 1980, 4, 571
35. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск, Из-во Акад. «Гео», 2007, 232 с.
36. Карнер А. Жизнь растений, т. 2. Санкт-Петербург, 1903, 838 с.

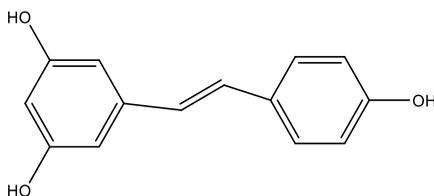
37. Гришкoveц В.И., Карпова П.А., Иксанова С.И., Чирва В.Я. Стероидный гликозид из семян *Yucca macrocarpa*. Химия природ. соедин. 1998, 6, 828-829
38. Bernardo R.R., Pinto A.V., Parente J.P., Steroidal saponins from *Smilax officinalis*. Phytochemistry, 1996, 43, 2, 465-469
39. Kawasaki T., Yamauchi T. Saponins of Timo (Anemarrhenae Rhizoma). II. Structure of Timosaponin A-III. Chem. Pharm. Bull. 1963, 11, 1221-1224
40. Nakano K., Yamasaki T., Imamura Y., Murakami K., Tabaishi Y., Tomomatsu T. The constituents of *Yucca gloriosa*. Part 2. The steroidal glycosides from the caudex of *Yucca gloriosa*. Phytochemistry 1989, 28, 4, 1215-1217
41. Agrawal P.K. NMR spectral investigations Part 51. Dependence of <sup>1</sup>H NMR chemical shifts of geminal protons of glycosyloxy methylene on the orientation of the 27-methyl-group of furostane type steroidal saponins. Magn, Res, Chem. 2004, 42, 990-993
42. Схиртладзе А.В., Бенидзе М.М., Кемертелидзе Э.П., Григолава Б.Л. Sturn Sonja, Ganzera Markus. Стероидный состав плодов интродуцированной в Грузию *Yucca gloriosa*. Химия природ. соедин. 2015, 2, 249-253
43. Бенидзе М.М., Схиртладзе А.В., Кемертелидзе Э.П. Стероидные соединения стеблей *Yucca gloriosa* L. Химия природ. соедин. 2012, 3, 464-465
44. Kurkin V.A., Zapesochnaia G.G., Dubichev A.G., Vorontsov E.D., Aleksandrova L.V., Panova R.V. Phenylpropanoids of a callus culture of *Rhodiola rosea*. Chemistry of Natural Compounds, 1991, 25, 4, 419-425
45. Lemieux R.U., Ratcliffe R.M., Arreguin B., Vivar A.P. <sup>13</sup>C NMR characterization of the sarsasapogenin dissacharides the filiferins A and B. Carbohydrate Research 1977, 55, 113-120
46. Kenney K.E., Wall M.E. Steroidal sapogenins. Willagenin, a new steroidal 12-Keto sapogenin. The Journal of Organic Chemistry, 1957, 22, 4, 468-469

47. Бенидзе М.М., Небиеридзе В.Г., Схиртладзе А.В., Кемертелидзе Э.П., Ганцера М. Некоторые компоненты стеблей *Yucca gloriosa* L. Известия Национальной Академии наук Грузии, серия химическая, 2017, 43, 1, 97-99
48. Yan L.Y., Guo D.A., Quantitation of Astragaloside, IV in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. 2005 B, 824, 244-248
49. Tor E.R., Filigensi M.S., Pusechner B. Determination of oleandrin in tissues and biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass-spectrometry. J. Agric. and Food Chemistry 2005, 53, 4322-4325
50. Miao K.S., Metcalfe C.D., Hao C.Y., March R.E. Electrospray ionization mass-spectrometry of ginsenosides. J. mass-spectrom. 2002, 37, 495-506
51. Nakano K., Midzuta Y., Hara Y., Murakami K., Takaishi Y., Tomimatsu T. The constituents of *Yucca gloriosa*. Part 3, 12 Keto-steroidal glycosides from the caudex of *Yucca gloriosa*. Phytochemistry, 1991, 30, 633-636
52. Nakano K., Hara Y., Murakami K., Takuishi Y., Tomimatsu T. The constituents of *Yucca gloriosa*. Part 4, 12-hydroxy-steroidal glycosides from the caudex of *Yucca gloriosa*. Phytochemistry, 1991, 30, 1993-1995
53. Mimaki Y., Sashida Y., Kawashima K. New steroidal constituents of the bulbs of *Camassia cusickii* S. Wats. Chem. Pharm. Bull. 1992, 40, 148-152
54. Peng J., Wany Y., Yao X. Study of two new furostanol glycosides from *Allium macrostemon* Bunge. Chin. Chem. Lett. 1993, 4, 141-143
55. Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C., Cheeke P. Steroidal saponins of *Yucca schidigera* Roetzl. J. Agr. Food Chem. 2001, 49, 4392-4396
56. Perrone A., Plaza A., Bioise E., Nigro P., Hamed A., Belisario M.A., Pizza C., Piacente S. Cytotoxic furostanol saponins and a

- megastigmane glycoside from *Tribulus parvispinus*. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1549-1553
57. Zhang J., Zhang M., Sugahara K., Sagara Y., Meny Z., Yu S. Kodama H. Effect of steroidal saponins of *Anemarrhenae rhizomes* on superoxide generation in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 259, 636-639
58. Skhirtladze A., Perrone A., Montoro P., Benidze M., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S. Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes. LC-MS profiling, isolation and quantitative determination. *Phytochemistry*, 2011, 72, 126-135.

## Глава 4. Стилбены *Yucca gloriosa* L.

Одна из групп полифенольных соединений – стилбены распространены в растительном мире в виде агликонов и гликозидов. В молекуле стилбена две бензольные группы связаны друг с другом этиленовым мостиком, что обуславливает наличие цис-транс изомеров. Из красного вина выделен 3,4',5-тригидроксистилбен – резвератрол характеризующийся высокой биологической активностью [1].



резвератрол

Резвератрол считается натуральным фитоалексином. Показана его антимуtagenная активность на клетки *Salmonella typhimurcum* V79. Он блокирует такие гетероциклические амины, как 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо-(4,5-b), пиридин и 3-амино-1,4-диметил-5H-пиридо-(4,3-b)-индол, которые в организме вызывают вредную мутацию, являющуюся предшественником образования опухоли, и т.д. [2]. Резвератрол известный сильнейший антиоксидант. Описаны анти-пролиферационная, анти-опухолевая, анти-лейкемическая и другие активности стилбенов [3-12].

Мультифункциональное действие резвератрола, и стилбенов вообще, усиливает интерес к поиску их природных источников. В 1997 г. из коры стеблей *Yucca schidigera* Roelz. были изолированы резвератрол [13] и

фенольные вещества, названные юккаолами А, В, С, D, Е с редкой спироструктурой, представляющие собой продукты конденсации флавоноида и стилбена [14,15].

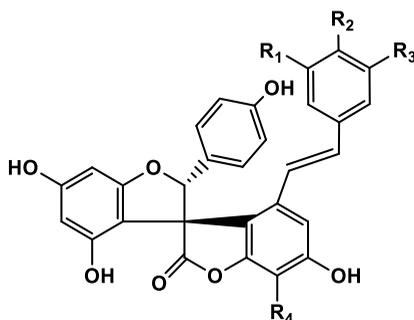
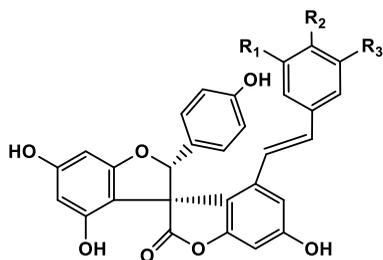
В предыдущих главах данной книги было показано, что корни, кожура корневищ и стеблей юкки славной, интродуцированной в наших условиях, не содержат стероидов. В них обнаруживаются фенольные соединения предположительно стильбенового класса. Это обстоятельство дало нам основание провести исследование юкки славной в направлении химии стильбенов.

#### **4.1. Выделение и характеристика стильбенов юкки славной**

Предварительным анализом показано, что корни, кожура корневищ и стеблей юкки славной имеют одинаковый состав фенольных соединений. Благодаря этому изучение одного из них давало представление о составе всех трех объектов.

100 г в/с измельченных корней юкки славной экстрагировали 80% MeOH. После отгонки растворителя получали 14 г остатка. Его растворяли в 300 мл воды и экстрагировали этилацетатом (100 мл x 3), получали 10 г этилацетатного экстракта. Часть из него фракционировали на *Sephadex* LH-20 (100x5 мм), используя MeOH, и затем RP-HPLC элюированием CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (35:65). При этом изолированы 9 фенольных соединений типа стилбена, среди них 5 оказались новыми [16], остальные вещества - известными соединениями – юккаолами А, С, D, Е, выделенными ранее из *Yucca schidigera* Roelz. Химические структуры установлены с помощью современных спектральных методов анализа, включая 1D (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C)

и 2D ЯМР эксперименты (DQF-COSY, HSQC, HMBC и ROESY), а также HR-ESI-MS методом.



юккаол А  $R_1=H$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$   
 юккаол D  $R_1=OH$ ;  $R_2=OMe$ ;  
 $R_3=OH$

юккаол С  $R_1=OH$ ;  $R_2=OMe$ ;  
 $R_3=OH$ ;  $R_4=H$   
 юккаол Е  $R_1=OH$ ;  $R_2=H$   
 $R_3=OH$ ;  $R_4=OMe$

Новые соединения были нами названы **глоризозолами А, В, С, D, Е**. Методом ESI-MS спектроскопии новых соединений **6** и **7** – глоризозолов А и В показали протонированный молекулярный ион при  $m/z$  811  $[M+H]^+$ , а также натрий содержащий молекулярный ион при  $m/z$  833  $[M+Na]^+$ , соответствующий формуле  $C_{45}H_{31}O_{15}$  и  $C_{45}H_{31}O_{15}Na$ . ESI-MS/MS спектр пика  $m/z$  811 дает интенсивный ион при  $m/z$  269, соответствующий протонированному стильбену, и минорные пики при  $m/z$  717 и 419.

$^1H$  ПМР спектр вещества **6** - глоризозола А (таблица 4.1) показывает: четыре дублета при  $\delta$  6.71, 6.73, 6.90 и 6.91 (2H, каждый д,  $J=8.5$  Гц), характерные для орто-соединенных ароматных протонов вместе с сигналами принадлежащие к транс-дизамещенным двойным связям  $\delta$  7.06 и 7.00 (1H, каждый д,  $J=16.1$  Гц); три пары мета-соединенных протонов при  $\delta$  5.96, 5.98, 6.16, 6.17, 6.41, 6.47 (1H, каждый д,  $J=1.8$  Гц);

три протона при  $\delta$  5.83, 5.86, 6.57 и метокси-группу при  $\delta$  3.84. COSY спектр показывает связь между сигналами при  $\delta$  6.71 и 6.91; 6.73 и 6.90; 6.96 и 6.16; 5.98 и 6.17; 6.41 и 6.47. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре (таблица 4.1) кроме  $\delta$  60.9, 62.1 и 62.3 все углеродные сигналы проявляются в слабом магнитном поле ( $\delta > 90$  м.д.). Протонированные углероды (20) и их соответствующие протоны были определены с помощью HSQC эксперимента. Четвертичные углероды (25) были разделены как 23  $\text{sp}^2$ , среди них 15 кислородосодержащие и 2  $\text{sp}^3$  углероды. Этими данными можно было предполагать высокую оксигенацию и высоко ненасыщенную структуру для глориозаола А. НМВС корреляция ясно показывает, что глориозаол А построен из двух идентичных  $\text{C}_{15}$  фрагментов, соединенных центральной стильбеновой частью. В частности, длинно-цепная корреляция между протонным сигналом при  $\delta$  6.57 и резонансом углеродов при  $\delta$  119.5, 129.5, 130.2, 133.5, 151.7; между  $\delta_{\text{H}}$  6.47 и  $\delta_{\text{C}}$  98.5, 118.2, 126.8, 137.0, 160.3; между  $\delta_{\text{H}}$  6.41 и  $\delta_{\text{C}}$  108.3, 118.2, 155.6, 160.3 дала возможность идентифицировать стильбеновое ядро как 2,2'-ди-С-замещенный транс-3,3',5,5'-тетра-гидрокси-4'-метоксистильбен. Характер присоединения  $\text{C}_{15}$  единиц центральной стильбеновой части можно установить из длинно-цепной корреляции между протон сигналами при  $\delta$  5.83 и резонансом углерода при  $\delta$  62.3, 104.7, 119.5, 128.2, 128.4, 164.6, 175.8, а также между протон сигналами при  $\delta$  5.86 и резонансом углерода при  $\delta$  62.1, 104.7, 118.2, 128.2, 128.4, 164.6, 175.9. Это дало нам основание приписать глориозаолу А спироструктуру из двух  $\gamma$ -лактонных колец, содержащих те же базовые  $\text{C}_{15}$  единиц вместо одного. Принимая во внимание их возможное флавоноидное начало,  $\text{C}_{15}$  единицы можно нумеровать как флавоноидный скелет, так

и в случае юккаолов. Первая C<sub>15</sub> единица состоит из колец А, В, С, центральный стильбен - из колец D и E, а следующая C<sub>15</sub> произведена из колец F, G, H. ROESY эксперимент глориозаола А показывает ROE эффект между H-2 кольца H и H-α, H-β и между H-2 кольца C и H-α, H-β.

Как указывалось [13], изучение молекулярных моделей и компьютерных представлений доказывает, что этот эффект встречается для изомеров, которые имеют H-2 C<sub>15</sub> единицы на той же стороне стильбеновой части и р-гидроксифенильные кольца C<sub>15</sub> единицы на противоположной стороне.

<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР данные вещества **7 - глориозаола В** (таблица 4.2) очень близки к данными глориозаола А (таблица 4.1). Разницы можно заметить для химических сдвигов H-6' кольца E (δ 6.69 в глориозаоле А, а δ 6.57 в глориозаоле В) и H-6 кольца D (δ 6.60 в глориозаоле А, а δ 6.47 в глориозаоле В). Изучение ROESY спектра также показывает в данном случае ROE эффект, согласованный с конфигурацией, показывающий H-2 C<sub>15</sub> единицы на той же стороне стильбеновой части. В обоих веществах протоны, показывающие широкую разницу <sup>1</sup>H химических сдвигов, H-6' кольца E и H-6 кольца D, не проявляют крестовидный скрещивающий пик в ROESY, что обязательно для обнаружения разницы структурных особенностей [16].

Эти обсуждения наводили нас на две гипотезы: 1) два соединения могут быть атропизомерами 1-го, который является соединением, наводящим на биогенетические размышления. Такой феномен может быть вызван ограничением свободного вращения вокруг двойной связи, обусловленной стерической теснотой объемистой фенольной части. 2) два ве-

щества могут быть в виде двух конфигурационных изомеров, показывающих в этом случае нестереоразделимые биогенетические образования стереогенетического центра С-2.

**Таблица 4.1.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные глориозаола А  
( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д., J в Гц)

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)
Кольцо Н			Кольцо С		
2	93.7	5.83 с	2	93.4	5.86 с
3	62.3	-	3	62.1	-
4	175.8	-	4	175.9	-
Кольцо F			Кольцо А		
5	156.6	-	5	156.6	-
6	97.1	5.98 д (1.8)	6	97.1	5.96 д (1.8)
7	162.4	-	7	162.4	-
8	90.7	6.17 д (1.8)	8	90.7	6.16 д (1.8)
9	164.6	-	9	164.6	-
10	104.7	-	10	104.7	-
Кольцо G			Кольцо В		
1'	128.4	-	1'	128.4	-
2'	128.2	6.91 д (8.5)	2'	128.2	6.90 д (8.5)
3'	115.7	6.71 д (8.5)	3'	115.7	6.73 д (8.5)
4'	159.2	-	4'	159.2	-
5'	115.7	6.71 д (8.5)	5'	115.7	6.73 д (8.5)
6'	128.2	6.91 д (8.5)	6'	128.2	6.90 д (8.5)
Кольцо E			Кольцо D		
1'	130.2	-	1	137.0	-
2'	119.5	-	2	118.2	-
3'	145.9	-	3	155.6	-
4'	133.5	-	4	98.5	6.41 д (1.8)
5'	151.7	-	5	160.3	-
6'	109.1	6.57 с	6	108.3	6.47 д (1.8)
$\alpha$	126.8	7.06 д (16.1)			
$\beta$	125.9	7.00 д (16.1)			
OMe	60.9	3.84 с			

**Таблица 4.2.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные гликозаола В ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д., J в Гц)

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)
Кольцо Н			Кольцо С		
2	93.4	5.87 с	2	93.4	5.86 с
3	61.9	-	3	62.1	-
4	175.5	-	4	175.9	-
Кольцо F			Кольцо А		
5	156.0	-	5	156.6	-
6	97.5	5.91 д (1.8)	6	97.1	5.92 д (1.8)
7	162.0	-	7	162.4	-
8	90.6	6.17 д (1.8)	8	90.7	6.16 д (1.8)
9	164.6	-	9	164.6	-
10	104.4	-	10	104.7	-
Кольцо G			Кольцо В		
1'	127.7	-	1'	128.4	-
2'	127.0	6.91 д (8.5)	2'	128.2	6.90 д (8.5)

Таблица 4.2. Продолжение

3'	115.8	6.71 д (8.5)	3'	115.7	6.73 д (8.5)
4'	159.2	-	4'	159.2	-
5'	115.8	6.71 д (8.5)	5'	115.7	6.73 д (8.5)
6'	127.0	6.91 д (8.5)	6'	128.2	6.90 д (8.5)
Кольцо E			Кольцо D		
1'	130.0	-	1	137.0	-
2'	119.5	-	2	118.2	-
3'	145.7	-	3	155.6	-
4'	133.2	-	4	98.5	6.41 д (1.8)
5'	151.6	-	5	160.3	-
6'	109.0	6.69 с	6	108.3	6.60 д (1.8)
α	127.0	7.08 д (16.1)			
β	125.7	7.02 д (16.1)			
OMe	60.9	3.84 с			

**Таблица 4.3.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные глириозаола С ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д., J в Гц)

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)
Кольцо Н			Кольцо С		
2	94.7	5.99 с	2	94.6	5.98 с
3	60.9	-	3	60.9	-
4	178.6	-	4	179.3	-
Кольцо F			Кольцо А		
5	154.5	-	5	154.5	-
6	97.3	5.85 д (1.8)	6	97.3	5.86 д (1.8)
7	160.9	-	7	160.9	-
8	90.9	6.27 д (1.8)	8	90.9	6.26 д (1.8)
9	161.6	-	9	161.6	-
10	106.8	-	10	106.8	-
Кольцо G			Кольцо В		
1'	126.8	-	1'	126.8	-
2'	127.3	7.03 д (8.4)	2'	127.3	7.02 д (8.4)

Таблица 4.3. Продолжение

3'	115.6	6.64 д (8.4)	3'	115.6	6.65 д (8.4)
4'	157.6	-	4'	157.6	-
5'	115.6	6.64 д (8.4)	5'	115.6	6.65 д (8.4)
6'	127.3	7.03 д (8.4)	6'	127.3	7.02 д (8.4)
Кольцо E			Кольцо D		
1'	130.3	-	1	136.6	-
2'	117.9	-	2	116.4	-
3'	144.1	-	3	153.4	-
4'	132.1	-	4	97.7	6.38 д (1.8)
5'	150.2	-	5	150.2	-
6'	108.2	6.61 с	6	107.4	6.52 д (1.8)
$\alpha$	126.4	6.41 д (16.1)			
$\beta$	125.7	6.36 д (16.1)			
OMe	61.1	3.92 с			

**Таблица 4.4.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные гликозида D ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д., J в Гц)

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)
Кольцо Н			Кольцо С		
2	93.5	6.03 с	2	91.9	5.58 с
3	61.1	-	3	60.4	-
4	178.6	-	4	174.6	-
Кольцо F			Кольцо А		
5	154.9	-	5	154.7	-
6	95.5	5.83 д (1.8)	6	95.7	5.97 д (1.8)
7	161.5	-	7	161.5	-
8	89.3	6.22 д (1.8)	8	89.4	6.09 д (1.8)
9	162.0	-	9	163.7	-
10	105.8	-	10	103.5	-
Кольцо G			Кольцо В		
1'	126.7	-	1'	127.6	-
2'	125.9	7.12 д (8.5)	2'	126.8	6.82 д (8.5)

Таблица 4.4. Продолжение

3'	114.3	6.62 д (8.5)	3'	114.3	6.70 д (8.5)
4'	157.5	-	4'	158.4	-
5'	114.3	6.62 д (8.5)	5'	114.3	6.70 д (8.5)
6'	125.9	7.1 2 д (8.5)	6'	126.8	6.82 д (8.5)
Кольцо Е			Кольцо D		
1'	131.5	-	1	136.0	-
2'	118.1	-	2	116.9	-
3'	144.1	-	3	154.8	-
4'	132.4	-	4	96.8	6.40 д (2.0)
5'	150.4	-	5	159.3	-
6'	106.7	6.27 с	6	106.9	6.90 д (2.0)
α	127.5	6.74 д (16.0)			
β	122.7	6.67 д (16.0)			
OMe	60.5	3.90 с			

**Таблица 4.5.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные глириозаола Е ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц,  $\delta$  в м.д., J в Гц)

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Гц)
Кольцо Н			Кольцо С		
2	91.9	5.58 с	2	93.3	6.01 с
3	60.4	-	3	61.1	-
4	174.6	-	4	179.5	-
Кольцо F			Кольцо А		
5	154.7	-	5	154.9	-
6	95.6	5.96 д (1.8)	6	95.5	5.82 д (1.8)
7	161.5	-	7	161.5	-
8	89.3	6.08 д (1.8)	8	89.3	6.22 д (1.8)
9	163.7	-	9	162.0	-
10	103.5	-	10	105.8	-
Кольцо G			Кольцо В		
1'	127.6	-	1'	126.7	-
2'	126.8	6.81 д (8.5)	2'	125.9	7.10 д (8.5)

Таблица 4.5. Продолжение

3'	114.3	6.72 д (8.5)	3'	114.3	6.61 д (8.5)
4'	158.4	-	4'	157.5	-
5'	114.3	6.72 д (8.5)	5'	114.3	6.61 д (8.5)
6'	126.8	6.81 д (8.5)	6'	125.9	7.10 д (8.5)
Кольцо E			Кольцо D		
1'	131.5	-	1	135.5	-
2'	118.0	-	2	116.0	-
3'	144.9	-	3	153.8	-
4'	132.1	-	4	96.8	6.35 д (2.0)
5'	150.8	-	5	158.3	-
6'	107.7	6.98 с	6	105.8	6.18 д (2.0)
α	126.6	6.69 д (16.0)			
β	123.5	6.73 д (16.0)			
OMe	60.2	3.86 с			

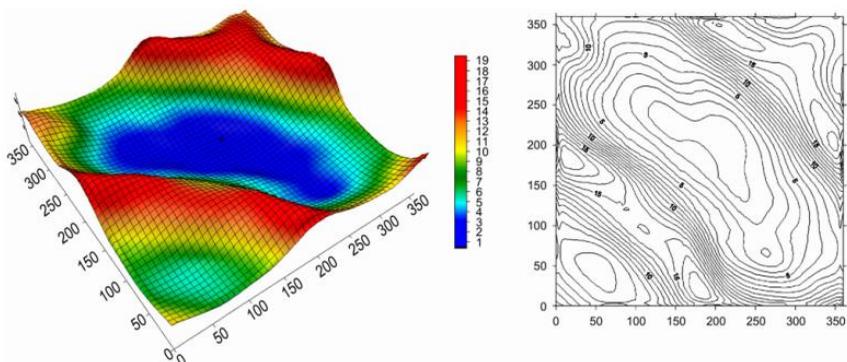


Рис. 4.1. Трехмерная поверхность (налево) и контурная диаграмма (направо), представляющие данные потенциальной энергии углов между  $\varphi$  ( $C_{2D}C_{1D}C_{\alpha}C_{\beta}$ ) и  $\psi$  ( $C_{2E}C_{1E}C_{\beta}C_{\alpha}$ ) гликозида А

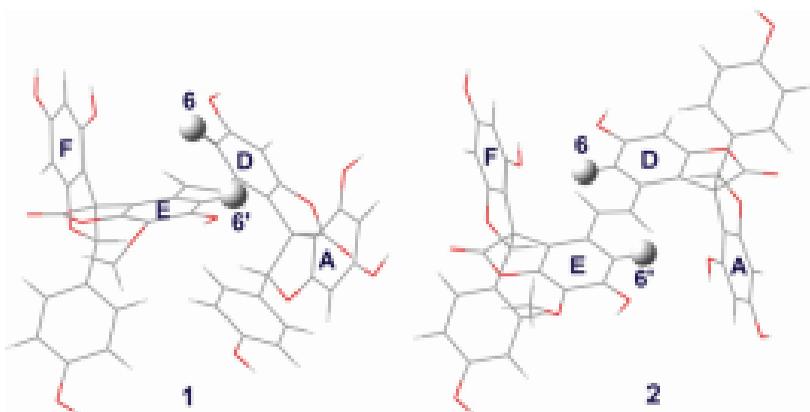
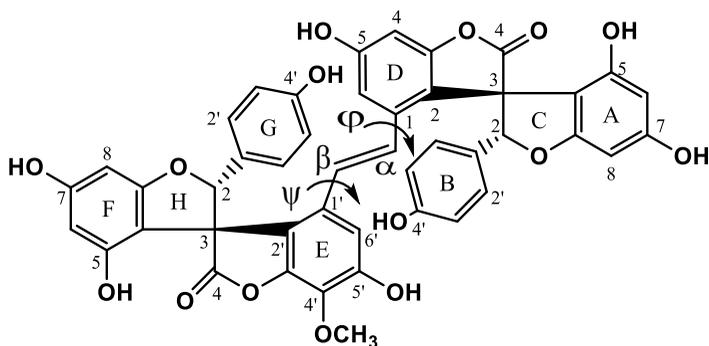


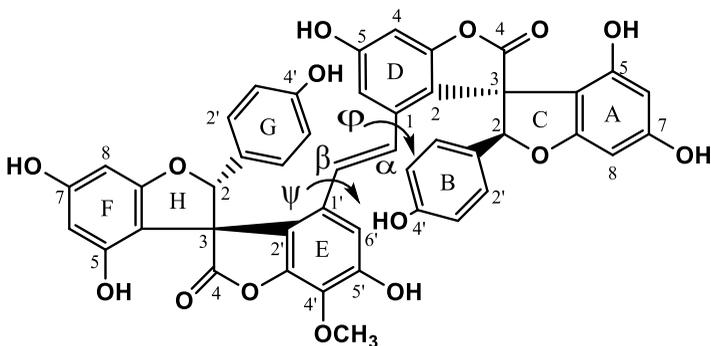
Рис.4.2. Различия в пространственном положении H-6<sub>кольца D</sub> и H-6'<sub>кольца E</sub> гликозида А (1) и В (2)

Окончательные структуры глоризоалов А и В были детально охарактеризованы комбинированным ЯМР-квантово-механическим подходом. Методология была основана на квантово-механической калькуляции геометрии и  $^1\text{H}$  химических сдвигов и на их сравнении с экспериментами; в комбинации с анализом ROE данных с успехом было показано, что глоризоалы А и В являются диастереоизомерными соединениями, что дало возможность оценить соответствующую конфигурацию двух диастереоизомеров, указывающую на нестереоразделимые биогенетические образования стереогенетического центра С-2 [16].

На основании полученных данных глоризоалам А и В соответствует структура:



глоризоал А

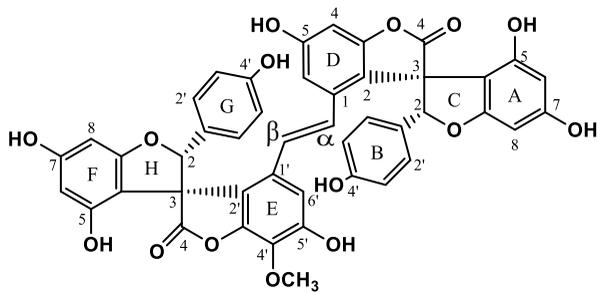


глориозаол В

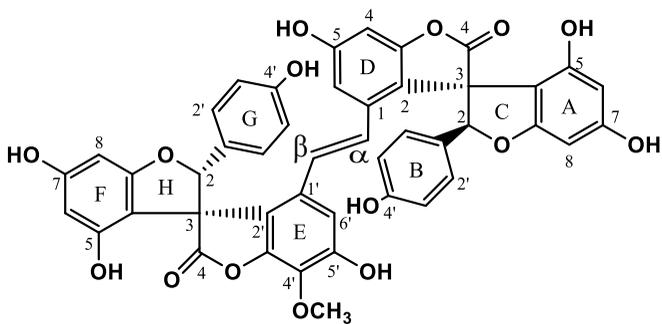
Молекулярная масса глориозаолов С-Е[17], полученных ESI-MS позитивной спектроскопией, соответствует глориозаолам А и В. Они показывают псевдомолекулярный ион при  $m/z$  811  $[M+H]^+$ , соответствующий молекулярной формуле  $C_{45}H_{31}O_{15}$  и с натрием  $m/z$  833  $[M+Na]^+$  ( $C_{45}H_{31}O_{15}Na$ ). Последовательная MS/MS пика  $m/z$  811 глориозаолов С-Е дает фрагменты при  $m/z$  269 (протонированный стильбен), 717 и 419, что указывает на похожую с глориозаолами А и В спироструктуру. Анализы  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР глориозаолов С-Е, включая 2D эксперименты (DQF-COSY, HSQC, HMBC), указывают на наличие двух идентичных  $C_{15}$  фрагментов, присоединенных к центральной стильбеновой части. В  $^1H$  ЯМР спектре глориозаолов С-Е (таблицы 4.3, 4.4, 4.5) отмечены сигналы, принадлежащие четырем дублетам ортосоединенных ароматических протонов, транс-дизамещенным двойным связям, трем парам мета-соединенных протонов, трем несоединенным протонам и одной метокси-группе. При этом длинно-цепная корреляция в HMBC спектре позволила нам установить структуру центрального стильбена, как транс-3,3',5,5'-тетра-гидрокси-4'-метоксистильбен, найденного уже

в глориозаолах А и В. НМВС корреляция ясно показывает, что два  $C_{15}$  фрагмента присоединены к центральному стильбену, как в других глориозаолах.

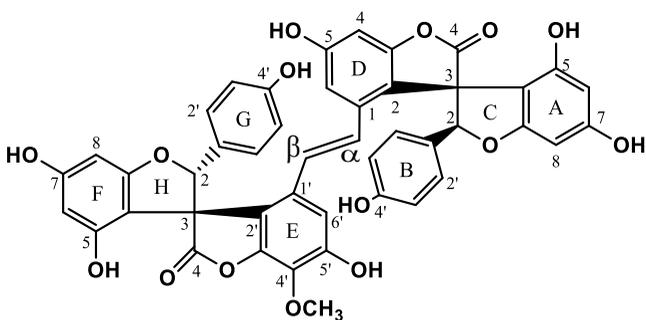
В связи с тем, что в обоих диастереоизомерах – глориозаолах А и В ROE эффект отмечается между Н-2 кольца Н и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$  и между Н-2 кольца С и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$ , то мы допустили возможность, что и глориозаолы С-Е стереоизомеры по ориентации Н-2 и р-гидроксифенильного кольца  $C_{15}$  фрагмента в отношении стильбеновой части. Для подтверждения этого предположения мы провели ROESY спектральный анализ этих трех соединений. Глориозаол С показывает ROE перекрестные пики между Н-2 кольца Н и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$  и между Н-2 кольца С и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$ , указывая на то, что два р-гидроксифенила колец G и B находятся на той же стороне стильбеновой части; глориозаол D показывает ROE перекрестные пики между Н-2 кольца С и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$ , следовательно кольцо G находится на той же стороне и кольцо B на противоположной стороне стильбеновой части; глориозаол E показывает ROE перекрестные пики между Н-2 кольца Н и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$ , но не между Н-2 кольца С и Н- $\alpha$ , Н- $\beta$ , это указывает на то, что кольцо G находится на противоположной стороне и кольцо B на той же стороне стильбеновой части. Установленные таким образом структуры глориозаолов С, D, E представлены на рисунке 4.3.



глюриозаол С



глюриозаол D



глюриозаол E

Рис. 4.3. глюриозаолы С, D, E

**Глориозаол А:** коричневый аморфный порошок;  $[\alpha]_D^{24} +60.1$  (с 0.2; MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 320 (3.87), 230 (4.36). ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  2918, 1791, 1623, 1509, 1455, 1397, 1202, 1132, 1074, 1020  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные приведены в таблице 4.1. ESI-MS  $m/z$  811  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 833  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . ESI-MS/MS  $m/z$  717  $[\text{M}+\text{H}-94]^+$ , 419  $[\text{M}+\text{H}-392]^+$ , 269  $[\text{M}+\text{H}-542]^+$ . HR MS [MALDI]  $[\text{M}+\text{H}]^+$  811.1688 соответствует формуле  $\text{C}_{45}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$ .

**Глориозаол В:** коричневый аморфный порошок;  $[\alpha]_D^{24} +12.8$  (с 0.2; MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 322 (3.85), 230 (4.30). ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  2918, 1791, 1623, 1509, 1455, 1397, 1202, 1132, 1074, 1020  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные приведены в таблице 4.2. ESI-MS  $m/z$  811  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 833  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . ESI-MS/MS  $m/z$  717  $[\text{M}+\text{H}-94]^+$ , 419  $[\text{M}+\text{H}-392]^+$ , 269  $[\text{M}+\text{H}-542]^+$ . HRMS [MALDI]  $[\text{M}+\text{H}]^+$  811.1685 соответствует формуле  $\text{C}_{45}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$ .

**Глориозаол С:** коричневый аморфный порошок;  $[\alpha]_D^{20} +20.4$  (с 0.1; MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 320 (3.87), 230 (4.36). ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  2918, 1791, 1623, 1509, 1455, 1397, 1202, 1132, 1074, 1020  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные приведены в таблице 4.3. ESI-MS  $m/z$  811  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 833  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . ESI-MS/MS  $m/z$  717  $[\text{M}+\text{H}-94]^+$ , 419  $[\text{M}+\text{H}-392]^+$ , 269  $[\text{M}+\text{H}-542]^+$ . HR-MS [ESI-Q-TOF]  $[\text{M}+\text{H}]^+$  811.1688 соответствует формуле  $\text{C}_{45}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$ .

**Глориозаолы D и E:** коричневый аморфный порошок; УФ (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 322 (3.85), 230 (4.30). ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  2918, 1791, 1623, 1509, 1455, 1397, 1202, 1132, 1074, 1020  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данные приведены в таблицах 4.4 и 4.5. ESI-MS  $m/z$  811  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 833  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . ESI-MS/MS  $m/z$  717  $[\text{M}+\text{H}-94]^+$ ,

419 [M+H-392]<sup>+</sup>, 269 [M+H-542]<sup>+</sup>. HR-MS [ESI-Q-TOF] [M+H]<sup>+</sup> 811.1662 соответствует формуле C<sub>45</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15</sub>.

**Таблица 4.6.** Антиоксидантная активность глориозаолов А-Е и метанольного экстракта корней *Yucca gloriosa* в ТЕАС эксперименте

Объекты	ТЕАС значения (mM) ±SD <sup>a</sup>
MeOH экстракт	5.78±0.10
глориозаол А	5.55±0.07
глориозаол В	3.00±0.08
глориозаол С	5.60±0.01
глориозаолы D-E	4.91±0.10
кверцетин	2.60±0.02

Антиоксидантная активность глориозаолов А-Е и метанольного экстракта корней *Yucca gloriosa* определена по испытаниям эквивалента таковой тролокса (ТЕАС) [17]. Активность выражена по ТЕАС значениям. ТЕАС значения были определены при сравнении стандартного раствора тролокса с антиоксидантной способности раствора испытуемых образцов 1mM концентрации. Используемая концентрация исследуемого экстракта составила 1 мг/мл.

Глориозаолы А-Е и метанольный экстракт корней *Yucca gloriosa* проявляют сильную антиоксидантную активность, намного превышающую активность юккаолов и кверцетина, использованного в качестве вещества для сравнения [18].

## 4.2. Количественное определение фенольных соединений в коре корневищ и корнях *юкки славной* LC-MS/MS анализом

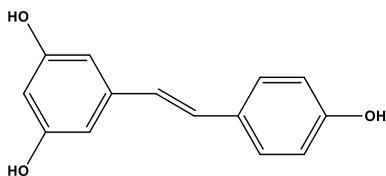
Фенольные соединения занимают большое место для пищевых и медицинских целей. Их качественное и количественное определение безусловно является актуальной задачей. В частности, способность HPLC в тандеме с масс-спектрометрией (MS/MS) заслуживает интерес как быстрый эффективный инструмент для скрининга экстрактов растений точностью, превосходной чувствительностью и высокой селективностью. Экстракты из коры корневищ и корней *Yucca gloriosa* L. были исследованы с помощью LC/MS/MS и LC/ESI/MS/MS анализов.

Кора корневищ и корни *Yucca gloriosa* L. были собраны в декабре 2003 г. на Тбилисском опытном участке лекарственных растений Института фармакохимии им. И.Г. Кутателадзе, Тбилиси.

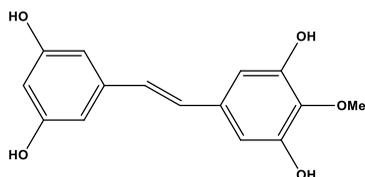
Метанольный экстракт коры корневищ и корней *Y. gloriosa* получены суспендированием измельченного растительного материала (1 г) с внутренним стандартом – дигидрорезвератрола 10 мг в 25 мл метаноле в ультразвуковой бане в течение 1 часа, и помещением в темноте на ночь. Экстракт был разведен 1:100 метанолом перед инъектированием в LC или LC/MS системе.

С целью получения обогащенного фенольного экстракта измельченная кора корневищ (100 г) и корни (100 г) *Y. gloriosa* экстрагировали метанолом (2x300 мл) при комнатной температуре. После фильтрации сгущали в вакууме при 40°C до сухого остатка, получали коричневый остаток, который

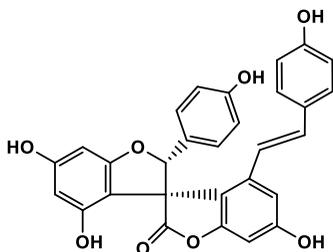
растворяли в 15% MeOH и переносили на колонке наполненной силикагелем C<sup>18</sup> (30x70 мм, 60 мкм, Baker). Колонку промывали 40% MeOH для выделения фенолов, а затем MeOH для элюирования оставшихся соединений. 0.1 мг фенольной фракции растворяли в 1 мл MeOH и разводили 1:10 метанолом перед анализом 20 мкл в хроматографических системах.



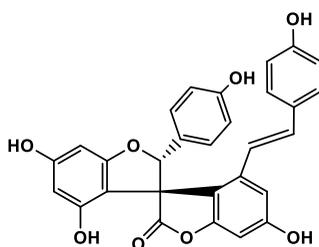
1. Резвератрол



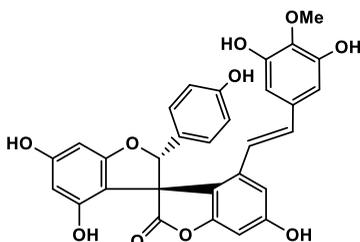
2. Транс-3,3',5,5'-тетра-гидрокси-4'-метоксистильбен



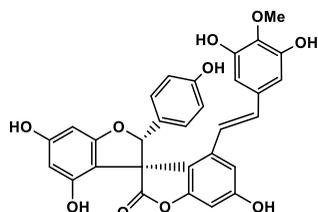
3. Юккаол А



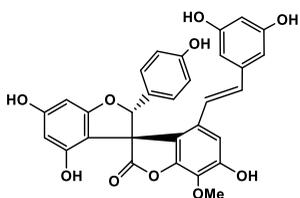
4. Юккаол В



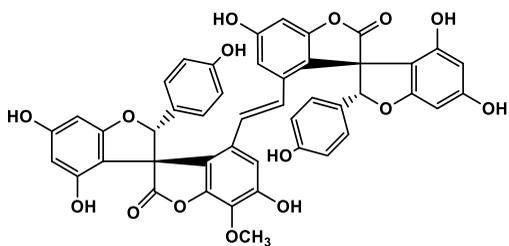
5. Юккаол С



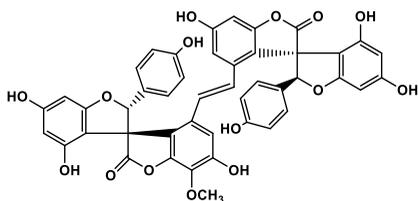
6. Юккаол D



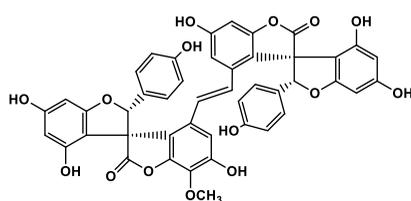
7. Юккаол Е



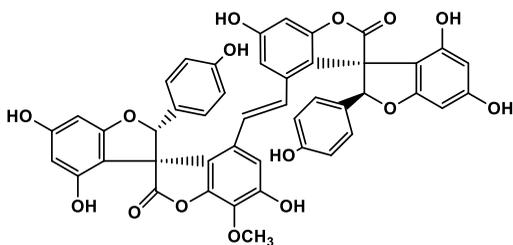
8. Глоризоал А



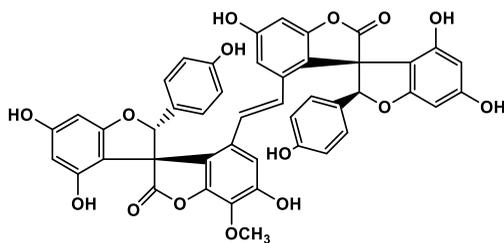
9. Глоризоал В



10. Глоризоал С



11. Глоризоал D



12. Глоризоал Е

Рис. 4.4. Стильбеновые соединения, выделенные из *Yucca gloriosa* и *Yucca schidigera*

ESI/MS анализ был выполнен с помощью Finnigan (Thermo Finnigan San Jose, CA, USA) LCQ Deca ion trap инструмента, снаряженного Xcalibur software.

Экстракты из коры корневищ и корней *Y. gloriosa* были анализированы с помощью LC/ESI/MS/MS „on-line“ с использованием Thermo Finnigan Spectra System HPLC соединенным с LCQ Deca ion trap. Анализы были проведены с использованием Waters Symmetry C-18 колонки (150x2.1 мм, 5 мкм), в качестве мобильной фазы градиентной смеси 0.05% раствор трифлуороуксусной кислоты (TFA) как элюент А и ацетонитрил в месте 0.05% TFA как элюент В.

Фитохимические исследования метанольных экстрактов коры корневищ и корней *Y. gloriosa* привели к изолированию юккаолов С-Е (5-7) и глоризоолов А-Е (8-12). Эти соединения вместе с резвератролом (1), транс-3,3',5,5'-тетрагидрокси-4'-метоксистильбеном и юккаолами А-В (3-4), известные для *Y. schidigera* [13-17], приведены на рис. 4.4.

На рис. 4.5. приведена хроматограмма LC/MS/MS анализа образца экстракта корней *Y. gloriosa* для количественного определения. Хроматограммы, полученные с помощью мониторинга реакции предшественника 229.0 m/z с фрагментом 135.0 m/z, предшественника 275 m/z с фрагментом 135.0 m/z, выбранные для исследования присутствия веществ **1** и **2**, соответственно, не дают пиков. Хроматограмма, полученная с помощью мониторинга реакции предшественника 497.0 m/z с фрагментом при 403.0 m/z, выбранные для исследования присутствия веществ **3** и **4**, дает 1 пик. Хроматограмма, полученная с помощью мониторинга реакции предшественника 543.0 m/z с фрагментом 499.0 m/z, выбранная для исследования наличия веществ **5**, **6** и **7**, показывает три пика.

Хроматограмма, полученная с помощью мониторинга реакции предшественника 811.0 m/z с фрагменту 717.0 m/z, выбранная для исследования наличия веществ **8**, **9**, **10** и **12**, дает четыре пика. Последняя хроматограмма на рис. 4.8. представляет соответствующую внешнему стандарту, представленному пиком на хроматограмме, полученной с помощью мониторинга реакции предшественника пика 231.0 m/z с фрагментом иона 137.0 m/z.

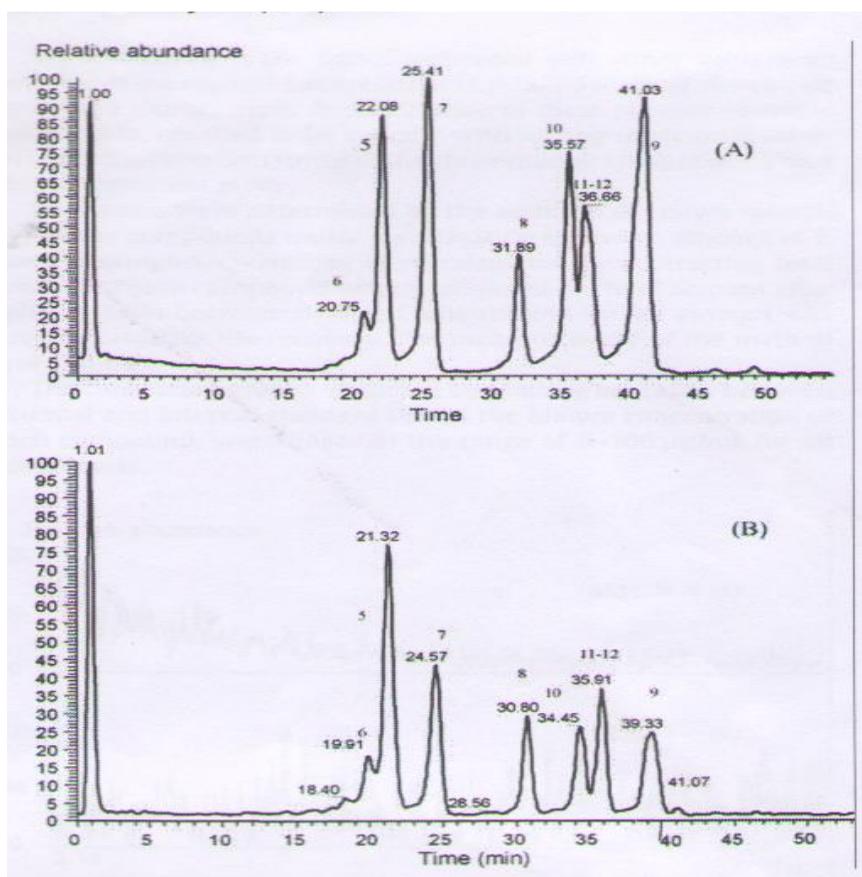


Рис. 4.5.

В таблице 4.7. приведены количественные данные для веществ **1-12** в образцах корней и коры корневищ *Yucca gloriosa* в сравнении с фенольными соединениями *Yucca schidigera*. Резвератрол (**1**) и транс-3,3',5,5'-тетра-гидрокси-4'-метоксистильбен (**2**), представленные в *Yucca schidigera* в большом количестве, и юккаол В не содержатся в экстрактах *Yucca gloriosa*, юккаол А присутствует в экстракте коры корневищ *Yucca gloriosa*, но не в экстрактах корней. Результаты количественного анализа подтверждают, что **8-12** являются основными веществами *Yucca gloriosa*, а юккаолы в меньшем количестве.

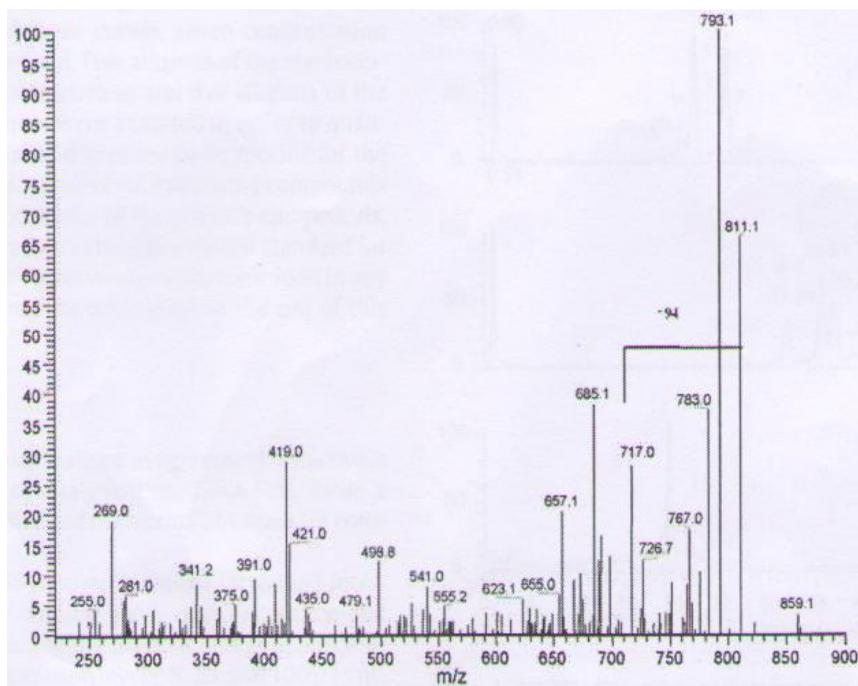


Рис. 4.6. ESIMS/MS спектр глоризола С

**Таблица 4.7.** Сравнение количественного анализа коры корневищ и корней *Yucca gloriosa* и коры *Yucca schidigera*

	Вещество	Кора корневищ <i>Y. gloriosa</i> (мг/г раст.)	Корни <i>Y. gloriosa</i> (мг/г раст.)	Кора стеблей <i>Y. schidigera</i> (мг/г раст.)
1	Резвератрол	н.о.	н.о.	9.11±2.11
2	Транс-метоксистерильбен	н.о.	н.о.	9.10±1.10
3	Юккаол А	2.64±0.80	0.02±0.01	14.72±2.10
4	Юккаол В	н.о.	н.о.	8.18±4.01
5	Юккаол С	13.85±1.21	10.68±1.01	12.02±2.28
6	Юккаол D	6.95±1.59	6.62±2.01	6.63±1.89
7	Юккаол Е	16.19±3.00	1.25±1.02	12.00±3.40
8	Глоризоаол А	11.87±1.32	3.02±1.50	н.о.
9	Глоризоаол В	29.73±2.15	5.30±1.80	н.о.
10	Глоризоаол С	4.53±1.42	3.33±0.91	н.о.
11+12	Глоризоаол D и E	10.85±1.58	4.96±1.71	н.о.

н.о. не обнаруживается

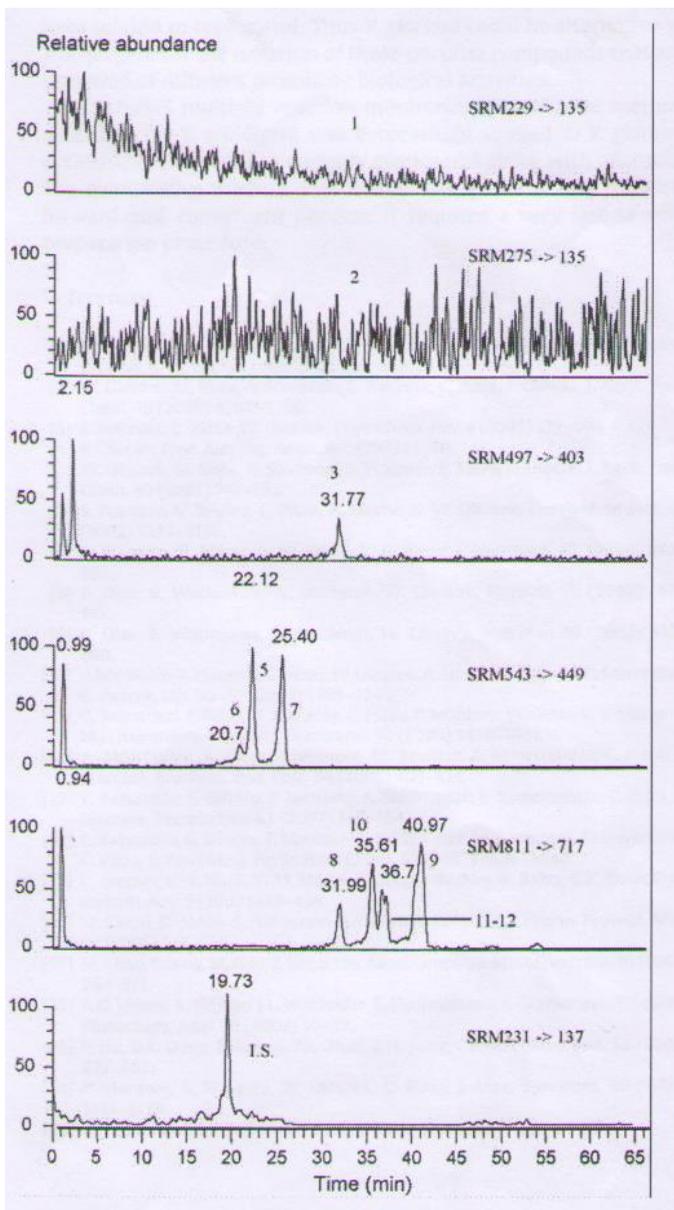


Рис. 4.7. LC/MS/MS MRM экстракта корней *Yucca gloriosa*

На основании полученных данных можно заключить, что кора корневищ и корни *Yucca gloriosa* являются богатыми источниками фенольных производных, родственных резвератролу. Итак, *Yucca gloriosa* можно считать альтернативной *Yucca schidigera* для получения этих особых соединений, обладающих многообразными биологическими активностями.

LC/MS/MS метод многократного реакционного мониторинга, описанный для *Yucca schidigera*, с успехом был использован в случае *Yucca gloriosa*. Этот метод, оптимизированный для количественного определения глориозолов вместе с юккаолами, является точным, удобным и быстрым [19].

#### **4.3. Антипролиферативная и про-апоптотная активность глориозолов А-С**

Было показано, что три структурно схожих с резвератролом фенольные соединения, выделенные из *Y. gloriosa* и названные глориозолами А, В и С, оказывают ингибирующее действие на рост различных линий раковых клеток человека (гепатобластома человека HepG2, рак молочной железы MCF7 и лейкоцитарные раковые клеточные линии, U937, Molt4 и Jurkat). Несмотря на близкое структурное сходство трех изомеров, отличающихся только конфигурацией асимметрических атомов углерода С2-С3, наблюдалась заметная разница в их антипролиферативной активности. Было обнаружено, что наиболее активным является изомер глориозол С, за которым следуют глориозол А и глориозол В. Интересно, что, по данным кривых зависимости доза-эффект

(значения  $EC_{50}$ ), все глориозаолы ингибировали рост раковых клеток более эффективно, чем резвератрол.

Было установлено, что в нашей экспериментальной системе резвератрол в дозах, близких к  $EC_{50}$ , вызывает блокирование S-фазы клеточного цикла без какой-либо индукции апоптотической или некротической гибели клеток. Таким образом, наши результаты показывают, что глориозаол С, несмотря на структурное сходство с резвератролом, более эффективен, чем последний, как ингибитор роста лейкемии, и что уменьшение количества клеток с помощью глориозаола С и резвератрола зависит от активации различных внутриклеточных сигнальных путей.

Глориозаолы, содержащие слабосвязанные атомы водорода, проявляли антиоксидантную активность в обогащенной радикалами среде, полученной обработкой клеток t-бутилгидропероксидом (t-BOOH). Однако, в восстановительной среде глориозаолы оказались эффективными как прооксиданты. Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие существенных различий в антиоксидантном потенциале трех изомеров, прооксидантная активность глориозаола С была в значительной степени выше, чем у глориозаолов А и В. Эти результаты показывают, что стереохимические различия трех изомеров не имеют существенной роли в определении различной биодоступности или способности высвобождать атомы Н (антиокислительный потенциал), но становятся актуальными для обеспечения специфического взаимодействия с целевыми белками, участвующими в контроле клеточного редокс-статуса и гибели клеток.

Существование взаимосвязи между проапоптотическим потенциалом глориозаола С и его способностью индуцировать повышение активных форм кислорода подтверждается уменьшением лекарственно-индуцированного апоптоза при профилактике антиоксидантами. Сдвиг гибели клеток от апоптоза к некрозу в ответ на высокие дозы ( $\geq 25$  мкМ) глориозаола С, по-видимому, связан с высоким прооксидантным действием препарата в указанных дозах (повышение активных форм кислорода оставалось устойчивым в течение 24ч инкубации). Избыточно сгенерированные активные формы кислорода, которые вызывают инактивацию каспаз [20], могут объяснить начало некротического процесса при этих дозах глориозаола С.

**Таблица 4.8.** Ингибирование роста раковых клеток глориозаолов А-С и резвератрола

Клетки	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )			
	глориозаол А	глориозаол В	глориозаол С	резвератрол
U937	16.3 $\pm$ 1.07	29.5 $\pm$ 2.86	8.04 $\pm$ 0.56	34.0 $\pm$ 3.52
MOLT4	22.6 $\pm$ 2.62	31.8 $\pm$ 3.47	12.1 $\pm$ 1.27	50.0 $\pm$ 6.20
Jurkat T	29.5 $\pm$ 3.01	37.5 $\pm$ 4.50	17.4 $\pm$ 2.09	85.3 $\pm$ 9.44
MCF7	34.2 $\pm$ 3.49	40.1 $\pm$ 3.93	22.0 $\pm$ 2.62	121.4 $\pm$ 12.87
HerpG2	43.6 $\pm$ 5.05	59.3 $\pm$ 6.17	30.4 $\pm$ 3.65	102.0 $\pm$ 10.30

**Таблица 4.9.** Некроз и апоптоз клеток U937, вызванные глориозаолом С и резвератролом

Обработка клеток	Доза ( $\mu M$ )	Некротические клетки (%)	Гиподиплоидные клетки (%)
ничто (растворитель) глориозаол С	0	3.1 $\pm$ 0.32	2.2 $\pm$ 0.24
	5	3.0 $\pm$ 0.33	2.3 $\pm$ 0.19
	10	7.5 $\pm$ 0.74	18.2 $\pm$ 1.85
	25	19.3 $\pm$ 2.01	44.1 $\pm$ 5.14
	50	49.1 $\pm$ 4.51	26.0 $\pm$ 3.12
резвератрол	50	3.2 $\pm$ 0.36	6.0 $\pm$ 0.28

Взятые вместе, наши результаты показывают, что судьба клеток, подвергнутых воздействию разных доз глориозаола С, может зависеть, по крайней мере, частично, от баланса между его про- и антиоксидантной активностью. В частности, смещение внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния в сторону более восстанавливающей среды может в основном ингибировать переход клеток из фазы G1 в фазу S [21-22], тогда как переход к более окислительной среде, как это происходит при более высоких дозах глориозаола С, может привести к редокс-опосредованному апоптозу или некрозу [23].

В заключение можно отметить, что способность глориозаола С индуцировать как остановку клеточного цикла, так и апоптоз, позволяет рассматривать это соединение в качестве потенциального кандидата, как отдельно взятого, так и в сочетании с существующими химиотерапевтическими агентами (или самим ресвератролом), для развития антилейкемической и иммуносупрессивной терапии [24].

#### **Литература к главе 4**

1. Siemann E.H., Creasy L.L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic* 1992, 43, 49-52
2. Uenobe F., Nakamura S.I., Miyazawa M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutation research*, 1997, 373, 197-200
3. Boyce A., Doehmer J., Gooderham N. Phytoalexin resveratrol attenuates the mutagenicity of the heterocyclic amines 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo-20[4,5-f] quinoxaline. *Life sciences*, 2004, 802(1), 217-223

4. Cheong H., Ryu S.Y., Kim K.M. Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbenes. *Planta Medica*, 1999, 65, 266-268
5. Docherty J.J., Fu M.M., Stiffler B.S., et al. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral research*, 1999, 43, 145-147
6. Osmond G.W., Masko E.M., Tyler D.S., Freedland S.J., Pizzo S. In vitro and in vivo evaluation of resveratrol and 3,5-dihydroxy-4'-acetoxy-trans-stilbene in the treatment of human prostate carcinoma and melanoma. *Journal of surgical research*, 2013, 179, E141-E148
7. Takasawa R., Akahane H., Tanaka H., Scimada N., Yamamoto T., Uchida-Maruki H., Sai M., Yoshimori A., Tanuma S. Piceatannol, a natural trans-stilbene compound, inhibits human glyoxalase I. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 2017, 27, 1169-1174
8. Castelli G., Bruno F., Vitale F., Roberti M., Colomba C., Giacomini E., Guidotti L., Cascio A., Tolomeo M. In vitro antileishmanial activity of trans-stilbene and terphenyl compounds. *Experimental parasitology*, 2016, 166, 1-9
9. Flamini R., Zanzotto A., De Rosso M., Lucchetta G., Dalla Vedova A., Bavaresco L. Stilbene oligomer phytoalexins in grape as a response to *Aspergillus carbonarius* infection. *Physiological and molecular plant pathology*, 2016, 93, 112-118
10. Kasiotis K.M., Pratsinis H., Kletsas D., Haroutounian S.A. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food and chemical toxicology*, 2013, 61, 112-120
11. Gabaston J., Richard T., Biais B., Waffo-Teguo P., Pedrot E., Jourdes M., Corio-Coster M.F., Merillon J.M. Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Industrial crops and products*, 2017, 103, 267-273
12. Sham T.T., Li M.H., Chan C.O., Zhang H., Chan S.W., Mok D.K.W. Cholesterol-lowering effects of piceatannol, a stilbene from wine,

- using untargeted metabolomics. *Journal of functional foods*, 2017, 20, 127-137
13. Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C., Cheeke P. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49 747-752
  14. Piacente S., Bifulco G., Pizza C., Stochmal A., Oleszek W. A novel phenolic spiro derivative, Yuccaone A, from *Yucca schidigera* bark. *Tetrahedron letters*, 2002, 43, 9133-9136
  15. Piacente S., Montoro P., Oleszek W., Pizza C. *Yucca schidigera* bark: Phenolic constituents and antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, 2004, 67, 882-885
  16. Bassarello C., Bifulco G., Montoro P., Skhirtladze A., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S. Gloriosaols A and B, two novel phenolics from *Yucca gloriosa*: structural characterization and configurational assignment by a combined NMR-quantum mechanical strategy. *Tetrahedron*, 2007, 63(1), 148-154
  17. Bassarello C., G Bifulco., Montoro P., Skhirtladze A., Benidze M., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S. *Yucca gloriosa*: A source of phenolic derivatives with strong antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 6636-6642
  18. Ragione F.D., Cucciola V., Borriello A., Pietra V.D., Racioppi L., Soldati G., Manna C., Galletti P., Zappia V. Resveratrol Arrests the Cell Division Cycle at S/G2 Phase Transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 250(1), 53-58
  19. Montoro P., Skhirtladze A., Bassarello C., Perrone A., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S. Determination of phenolic compounds in *Yucca gloriosa* bark and roots by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47, 854–859
  20. Hirsch T., Marchetti P., Susin S.A., Dallaporta B., Zamzami N., Marzo I., Geuskens M., Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability

- transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 1997, 15(13), 1573-1581
21. Weng M.S., Ho Y.S., Lin J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, 2005, 69(12), 1815-1827
  22. Luzi C., Brisdelli F., Cinque B., Cifone G., Bozzi A. Differential sensitivity to resveratrol-induced apoptosis of humane chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 68(10), 2019-2030
  23. Martindale J.L., Holbrook N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 2002, 192(1), 1-15
  24. Nigro P., Turco M.C., Montoro P., Skhirtladze A., Pizza C., Piacente S., Belisario M.A. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of novel phenolic derivatives of resveratrol. *Life Sciences*, 2007, 81, 873-883.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, широкие возможности синтеза стероидных гормональных препаратов  $5\alpha$  ряда из тигогенина, в перспективе и синтеза кортикостероидов, значительные сырьевые ресурсы для производства тигогенина в виде разведенных плантаций *Yucca gloriosa*; а также богатый состав растения биологически активными соединениями, создают солидную базу для развития фармакохимической науки и промышленности в данном направлении.

## Оглавление

Введение .....	3
<b>Глава 1. Исследование по синтезу стероидных препаратов из тигогенина .....</b>	<b>6</b>
Литература к главе 1 .....	46
<b>Глава 2. Общие сведения о стероидных гликозидах и сапогенинах .....</b>	<b>57</b>
2.1. Поиски стероидных сапогенинов во флоре Грузии.....	66
2.2. Стероидные сапогенины <i>Yucca</i> L. ....	68
2.2.1. Тигогенин из листьев <i>Yucca gloriosa</i> L. ....	70
2.2.2. Способ получения тигогенина из юкки славной .....	72
2.2.3. Метод количественного определения тигогенина в листьях юкки славной и в готовом продукте .....	76
2.2.4. Стероидные сапогенины цветков и бутонов юкки славной . . . . .	79
2.2.5. Растительный источник тигогенина . ....	81
2.2.6. Динамика накопления тигогенина в юкке славной, влияние различных условий сушки на его содержание .....	84
Литература к главе 2 .....	88

### Глава 3. Химический состав отдельных органов

<i>Yucca gloriosa</i> L. . . . .	97
3.1. Стероидные гликозиды листьев <i>Yucca gloriosa</i> L. ....	98
3.2. Стероидные гликозиды цветков и бутонов	
<i>Yucca gloriosa</i> L. ....	109
3.2.1. Препарат «Алексин» из стероидных гликозидов цветков и бутонов юкки славной - стимулятор роста и развития растений .....	114
3.2.2. Фунгицидная активность стероидных гликозидов юкки славной .....	121
3.2.3. Стероидные гликозиды листьев юкки славной, подсохших на растениях, и их фунгицидная активность .....	123
3.2.4. Сесквитерпеновые гликозиды цветков юкки славной .....	128
3.2.5. Фенолкарбоновые кислоты и флавоноиды цветков юкки славной .....	134
3.3. Стероидные гликозиды плодов <i>Yucca gloriosa</i> L. ....	137
3.4. Стероидные гликозиды стеблей <i>Yucca gloriosa</i> L. ....	153
3.5. Стероидные гликозиды корневищ	
<i>Yucca gloriosa</i> L. ....	157
3.5.1. Выделение и характеристика стероидных гликозидов корневищ юкки славной .....	157

3.5.2. LC-MS анализ и количественное определение	
гликозидов корневищ юкки славной .....	178
3.5.3. Рост стимулирующая активность стероидных	
гликозидов корневищ юкки славной .....	183
Литература к главе 3 .....	184
<b>Глава 4. Стилбены <i>Yucca gloriosa</i> L.</b> .....	<b>191</b>
4.1. Выделение и характеристика стилбенов	
юкки славной .....	192
4.2. Количественное определение фенольных	
соединений в коре корневищ и корнях юкки	
славной LC-MS/MS анализом .....	212
4.3. Антипролиферативная и про-апоптотная	
активность глориозолов А-С .....	220
Литература к главе 4 .....	223
Заключение .....	227



საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის  
სტამბა

თბილისი – 2018  
რუსთაველის გამზ. 52

Georgian National Academy Press

Tbilisi – 2018  
52, Rustaveli Ave.