

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
имени академика А.С. САДЫКОВА**

*На правах рукописи
УДК 547.918:547.926*

КУЧЕРБАЕВ КАМАЛ ДЖАМАЛОВИЧ

**ЦИКЛОАРТАНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ
*ASTRAGALUS UNIFOLIOLATUS BUNGE***

02.00.10 - Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Ташкент – 2010

Работа выполнена в Институте химии растительных веществ имени академика Юнусова С.Ю. АН Республики Узбекистан

Научный руководитель: кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Утениязов Каримбай Куанышбаевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Зайнутдинов Умаржан Насрутдинович
кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Камаев Фуат Газизович

Ведущая организация: Ташкентский Фармацевтический институт
МЗ РУз

Защита состоится «___»_____2010 г. в ___ч. на заседании Специализированного совета Д 015.21.01. при Институте биоорганической химии имени академика А.С.Садыкова АН РУз (100125, Ташкент, проспект Мирзо Улугбека, 83).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. акад. А.С.Садыкова АН РУз.

Автореферат разослан «___»_____2010 г.

**Ученый секретарь
Специализированного совета
кандидат химических наук**

Гафуров М.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Тритерпеновые соединения циклоартанового ряда - широко распространенные вещества в растительном мире. Эти соединения являются вторичными метаболитами растений. Результаты зарубежных и отечественных исследований показали широкий спектр биологической активности циклоартановых соединений. Поэтому исследования циклоартановых соединений имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Как показывают систематические исследования широко распространённые в Узбекистане растения рода *Astragalus*, являются перспективными источниками этих соединений. Малоизученными или вообще неизученными остаются растения рода *Astragalus*, произрастающие в зоне Приаралья, в Каракалпакстане, что определило направление данной работы.

Степень изученности проблемы. В настоящее время циклоартановые соединения выделены из растений более двадцати семейств. Впервые в 1981 году было установлено, что растения рода *Astragalus* содержат циклоартановые тритерпеноиды. Из растений этого рода к настоящему времени выделено более 160 циклоартановых тритерпеноидов.

Ведутся также исследования биологической активности циклоартановых соединений, выделенных из различных видов астрагала, которые выявили противоопухолевое, противовоспалительное, иммуностимулирующее, кардиотоническое, гипохолестеринемическое и другие полезные свойства этих веществ.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Диссертация выполнена в лаборатории химии гликозидов Института химии растительных веществ имени академика С. Ю. Юнусова АН РУз в период 1999-2009 гг и является составной частью исследований по плану НИР, проведённых и проводимых в рамках тем: 2.29.5.1 «Химическое строение тритерпеновых, иридоидных гликозидов и экдистероидов из растительных объектов. Характерные особенности биосинтеза и метаболизма этих соединений» и ФА-ФЗ-Т-044 «Изопреноиды растений и микроорганизмов отечественной флоры: структура, химическая трансформация, биологическая активность».

Цель исследования: выделение и изучение тритерпеновых соединений циклоартанового ряда растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, а также выявление их биологической активности.

Задачи исследования: выделение циклоартановых соединений, идентификация известных соединений, установление структуры новых соединений и изучение биологической активности суммы доминирующих циклоартанов, выделенных из растительного сырья.

Объект и предмет исследования: Объектом исследования является ранее неизученное растение, произрастающее в Республике Каракалпакстан *Astragalus unifoliolatus* Bunge. Предметом исследования являются циклоартановые гликозиды.

Методы исследования: экстракция, колоночная и тонкослойная хроматографии, кислотный, щелочной и ферментативный гидролизы, физические методы исследования (ИК-, ¹H- и ¹³C-ЯМР спектроскопия, методы двумерной спектроскопии – COSY, TOCSY, ROESY, HMBC, HSQC).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Растение *Astragalus unifoliolatus* Bunge - новый источник циклоартановых соединений.
2. Установление строения новых соединений - циклоунифолиозидов А, В, С и D, а также идентификация известных веществ – циклоаралозида С, циклокантогенина и олеаноловой кислоты.
3. Результаты биологического испытания этанольного экстракта надземной части растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge.
4. Результаты цитотоксического исследования *in vitro* метанольного и водного экстрактов, а также индивидуальных веществ циклоунифолиозидов А и В.

Научная новизна.

Впервые изучен тритерпеновый состав растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, произрастающего в Республике Каракалпакстан и показано, что данное растение является источником циклоартановых гликозидов, а также олеаноловой кислоты.

Из этого растения выделено 7 тритерпеновых соединений, 4 из которых оказались новыми циклоартановыми гликозидами.

Изучен этанольный экстракт надземной части растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, содержащий циклоартановые гликозиды на наличие у него способности влиять на такие специфические функции печени как интенсивность секреции желчи, синтез жёлчных кислот, обмен билирубина и экскреция холестерина.

Исследованы *in vitro* на клетках миеломы мышей P3X цитотоксические свойства метанольного и водного экстрактов, а также индивидуальных циклоартановых гликозидов, циклоунифолиозидов А и В.

Научная и практическая значимость результатов исследования. На основании современных спектральных методов и химических превращений были идентифицированы и установлены строения семи тритерпеновых соединений. Выделены новые тритерпеновые соединения циклоартанового ряда, циклоунифолиозиды А, В, С и D.

Результаты проведенных биологических исследований показали, что этанольный экстракт из надземных частей растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, содержащий циклоартановые гликозиды, обладает выраженным желчегонным действием, оказывает благоприятное действие на химический

состав желчи (особенно в условиях токсического поражения печени). По своему эффекту экстракт не уступает известному импортному желчегонному средству – таначехолу и представляет значительный интерес для разработки на его основе эффективного лекарственного препарата для использования при патологических состояниях гепатобилиарной системы.

Цитотоксическое исследование метанольного и водного экстрактов надземной части *Astragalus unifoliolatus* Bunge, а также циклоунифолиозидов А и В на клетках P3X миеломы мышей показало о возможности использования компонентов изучаемого растения для создания специфических противоопухолевых средств.

Реализация результатов. Выявленные биологические свойства экстрактов, а также индивидуальных циклоартановых гликозидов из надземной части растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge показали, что они представляют интерес для разработки на их основе лекарственных препаратов.

Необходимо также отметить, что исследования по выделению биологически активных веществ из природного сырья обогащают химию природных соединений как науку новыми теоретическими данными.

Химические структуры, физико-химические константы и спектральные параметры новых гликозидов - циклоунифолиозидов А, В, С, D включены в справочник М. И. Исаева «Cycloartane triterpenoids and glycosides» издаваемый в Springer.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на международных и республиканских конференциях, конгрессах и симпозиумах: 20th International Carbohydrate Symposium (Hamburg, Germany, 2000); 4th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Isparta, Turkey, 2001); XVI International Symposium on Glycoconjugates (The Hague, The Netherlands, 2001); 11th European Carbohydrate Symposium (Lisboa, Portugal, 2001); Актуальные проблемы химии природных соединений (Ташкент, 2009); XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2009); 8th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Eskişehir, Turkey, 2009).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликованы 5 статей и тезисы 7 докладов.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 102 печатных страницах и состоит из введения, трёх глав, выводов и списка литературы, включающего 170 наименований.

В диссертации приведены 9 таблиц и 23 рисунка. Приведена таблица, включающая 155 циклоартановых соединений, выделенных из растений рода *Astragalus*. В первой главе обобщены литературные данные о циклоартановых соединениях. Вторая глава посвящена обсуждению результатов собственных исследований по выделению и определению

структуры выделенных соединений. В третьей главе приведены экспериментальные данные.

Автор выражает свою благодарность заведующему лабораторией химии гликозидов ИХРВ АН РУз М.И. Исаеву за неоценимую помощь при написании диссертации.

Автор также благодарен бывшему заведующему лабораторией, ныне покойному профессору З. Саатову за предоставленную возможность и создание условий для выполнения данной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В литературном обзоре (Циклоартановые гликозиды растений рода *Astragalus*) обобщены сведения о особенностях строения циклоартановых тритерпеноидов, о растительных источниках, методах выделения и установления их строения. Приведены физико-химические константы и структуры 155 циклоартанов, выделенных из различных видов растений рода астрагал.

В обсуждении результатов (Циклоартановые гликозиды растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge) приведены сведения о объекте исследования, схема выделения веществ и доказательство строения выделенных индивидуальных соединений. Приведены результаты биологических исследований экстрактов и основных компонентов надземной части растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge.

В экспериментальной части приведены методики выделения и установления строения выделенных соединений. Даются ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектры выделенных веществ.

Надземная часть и корни растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge (астрагала однолисточкового) заготовлены в июне 1998 г. в совхозе Бердах Амударьинского района Республики Каракалпакстан. Предварительный хроматографический анализ экстрактов надземной части и корней этого растения показал наличие тритерпеновых соединений циклоартанового ряда.

Выделение циклоартановых соединений из растения проводилось в следующей последовательности (см. рис. 1). Воздушно-сухие измельчённые корни растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge (2.2 кг) были экстрагированы 5 л метанола 5 раз. Полученный метанольный экстракт сгущали до сиропобразного состояния, а к оставшейся после отгонки растворителя массе добавляли двойной объём воды. Остатки метанола отгоняли на роторном испарителе. Полученный водный раствор суммы веществ экстрагировали сначала этилацетатом, затем *n*-бутиловым спиртом. После упаривания растворителей в вакууме получили 30 г этилацетатного и 12.93 г бутанольного извлечения.



Рис. 1. Выделение тритерпеноидов из растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge

Дальнейшее разделение веществ на индивидуальные соединения проводилось методом колоночной хроматографии на силикагеле.

Высушенная и измельчённая надземная часть растения (3 кг) была экстрагирована метиловым спиртом. Полученный экстракт сгущали отгонкой метанола на роторном испарителе и к сгущённому остатку добавляли двойной объём воды. Из полученного водного раствора вещества извлекали сначала этилацетатом, затем *n*-бутиловым спиртом. Получены 84.95 г этилацетатного и 42 г бутанольного извлечения. Из полученных извлечений индивидуальные вещества выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле.

Из этилацетатной и бутанольной фракций экстракта корней растения *A. unifoliolatus* нами выделены соединения **5**, **6** и **7**. Соединение **7** идентифицировано с известным соединением – циклоаралозидом С (табл. 1). Из экстракта надземных частей растения выделены соединения **1**, **3**, **8** и **9**. Соединение **8** идентифицировано с известным соединением – циклокантогенином. Соединение **9** оказалось тритерпеноидом олеананового ряда – олеаноловой кислотой.

Таблица 1

**Физико-химические константы веществ, выделенных из растения
Astragalus unifoliolatus Bunge**

Название соединения и его состав	Т.пл., °С	$[\alpha]_D$ в град., CH ₃ OH	Выход, %
Циклоунифолиозид А (1)* C ₄₀ H ₆₆ O ₁₄	208-210	+78.4	0.007
Циклоунифолиозид В (3)* C ₄₂ H ₇₀ O ₁₅	210-215	+17.8	0.013
Циклоунифолиозид С (5) C ₃₆ H ₆₀ O ₁₀	192-195	-	0.0021
Циклоунифолиозид D (6) C ₃₈ H ₆₂ O ₁₁	171-173	+36.0	0.0063
Циклоаралозид С (7) C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	228-230	+4.7	0.0023
Циклокантогенин (8)* C ₃₀ H ₅₂ O ₅	190-193	+56.8	0.0008
Олеаноловая кислота (9)* C ₃₀ H ₄₈ O ₃	305-312	+75	0.16

Помеченные звёздочкой вещества выделены из надземной части, остальные из корней растения.

1. Строение циклоунифолиозида А

Циклоунифолиозид А (1), C₄₀H₆₆O₁₂. В ИК-спектре циклоунифолиозида А (**1**) имеются полосы поглощения, характерные для гидроксильных, метиленовых и сложноэфирных групп при 3435, 3050, 1734 и 1251 см⁻¹ соответственно.

В спектре ЯМР ¹H соединения **1** в сильном поле при 0.23 и 0.52 м.д. имеются однопротонные дублеты системы АХ, однозначно относящиеся к метиленовым атомам водорода циклопропанового кольца и сигналы семи

метильных групп. Это позволило нам предположить, что соединение **1** относится к тритерпеноидам циклоартанового ряда.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C гликозида **1** содержат два трёхпротонных синглета при 2.10 и 2.26 м.д. и сигналы углеродных атомов при 21.45, 21.80 и 170.70, 171.10 м.д., свидетельствующие о наличии в циклоунифолиозиде А двух ацетильных групп.

Присутствие в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C циклоунифолиозида А сигналов одного аномерного протона при 4.94 м.д. и одного аномерного углеродного атома при 106.70 м.д., позволило нам сделать вывод, что соединение **1** является монозидом.

Кислотный гидролиз соединения **1** приводит к получению генина, идентифицированного с циклоасгенином С (**2**). В гидролизате БХ сравнением с подлинными образцами обнаружили D-глюкозу (см. рис. 2).

Местоположение упомянутых выше двух ацетильных групп установлено на основании спектров ROESY.

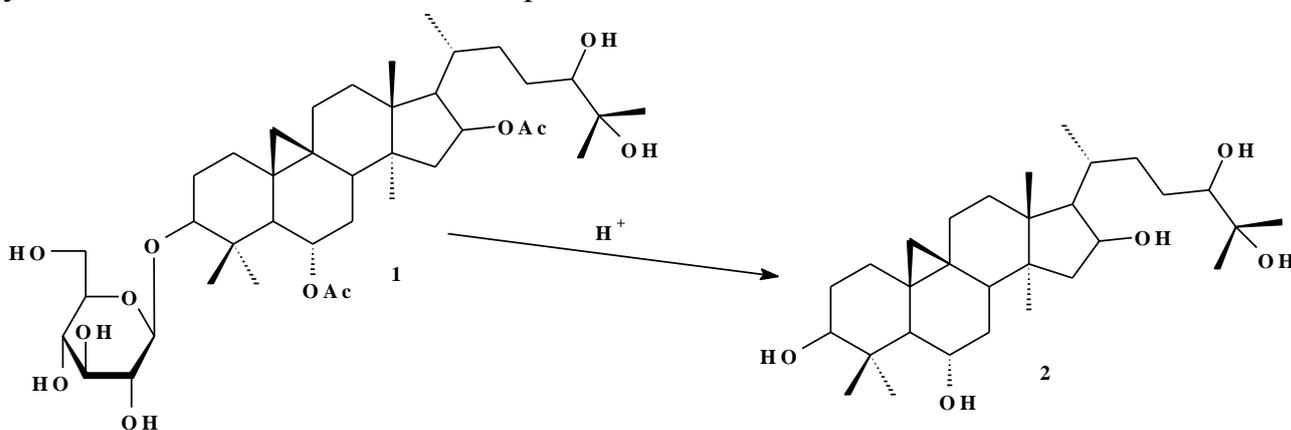


Рис. 2. Кислотный гидролиз циклоунифолиозида А (1)

Найденные в спектре ROESY корреляционные пики взаимодействия CH_3 -группы с химическим сдвигом 2.10 м.д. с протонами CH_3 -29 и корреляционные пики взаимодействия CH_3 -группы с химическим сдвигом 2.26 м.д. с протоном Н-23 свидетельствуют о том, что ацетильные группы замещают гидроксилы при С-6 и С-16 углеродных атомах агликона.

На наличие ацетильных групп при С-6 и С-16 указывают также слабополюсные смещения сигналов соответствующих протонов Н-6 (4.98 м.д.) и Н-16 (5.51 м.д.).

В циклоунифолиозиде А атом С-3 претерпел эффект гликозирования и резонирует при 87.95 м.д. Это даёт возможность утверждать, что остаток D-глюкозы присоединён к генину через гидроксил при С-3.

Таким образом, циклоунифолиозид А представляет собой 3-О- β -D-глюкопиранозид-6,16-ди-О-ацетил-24R-циклоартан-3 β ,6 α ,16 β ,24,25-пентаол.

2. Строение циклоунифолиозида В

Циклоунифолиозид В (3), C₄₂H₇₀O₁₅. Наличие полосы поглощения при 3050 см⁻¹ в ИК-спектре циклоунифолиозида В (3) указывает на присутствие трёхчленного цикла.

В спектре ЯМР ¹H соединения 3 в сильном поле при 0.22 и 0.56 м.д. имеются однопротонные дублеты системы AX, однозначно относящиеся к метиленовым атомам водорода циклопропанового кольца, и чётко проявляются резонансные линии семи метильных групп. Углеродные атомы циклопропанового кольца С-9, С-10 и С-19 в спектре ¹³C ЯМР резонируют при 21.02; 29.42 и 30.21 м.д. соответственно. Эти данные позволили нам отнести соединение 3 к тритерпеноидам циклоартанового ряда.

Наличие в спектре ЯМР ¹H сигналов двух аномерных протонов, которые резонируют при 4.99 и 5.42 м.д., а в спектре ЯМР ¹³C сигналов двух аномерных углеродных атомов, резонирующих при 105.05 и 106.12 м.д. говорит о том, что соединение 3 является биозидом.

На основании данных, полученных при использовании методик двумерной спектроскопии COSY, TOCSY и HSQC выяснилось, что оба моносахаридных остатка представлены β-D-глюкопиранозами, причём сигнал С-2 одной из них находится в более слабом поле по сравнению с полем незамещённого остатка.

Кислотный гидролиз циклоунифолиозида В привёл к получению генина, идентифицированного по спектральным и литературным данным с циклосиверсигенином (4) (см. рис. 3). В гидролизате БХ, сравнением с подлинными образцами, обнаружили D-глюкозу.

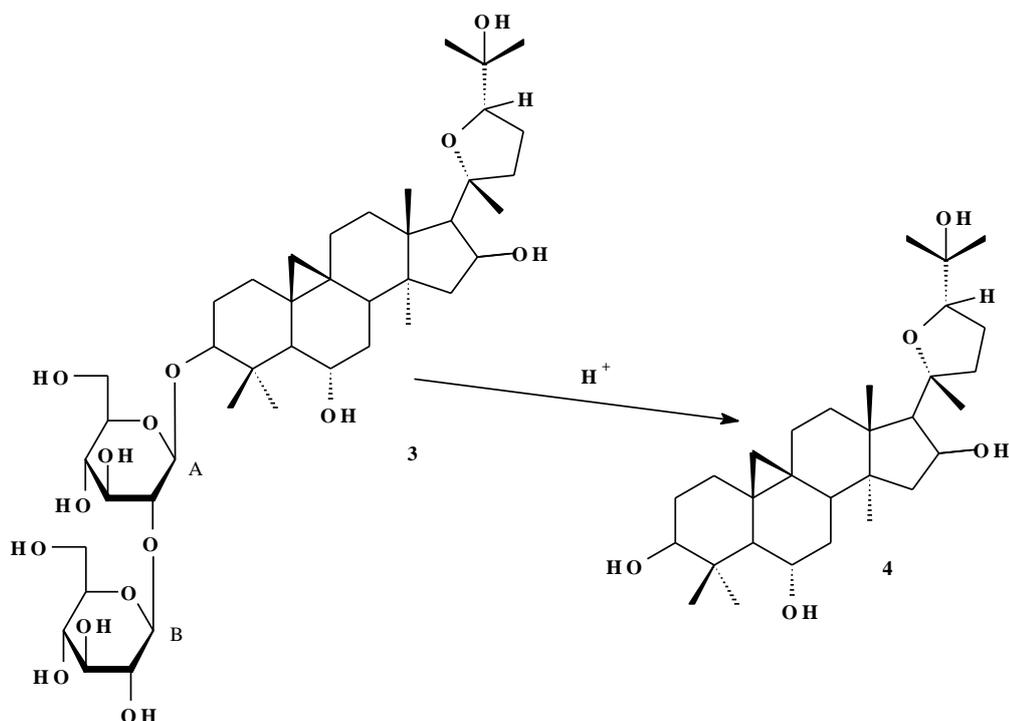


Рис. 3. Кислотный гидролиз циклоунифолиозида В (3)

Сравнительный анализ химических сдвигов сигналов углеродных атомов в спектре ЯМР ^{13}C циклосиверсигенина (**4**) и циклоунифолиозида В (**3**) показал, что эффекту гликозилирования подвергся атом углерода С-3. Сдвиг сигнала аномерного углеродного атома (С-1) остатка А D-глюкопиранозы в сильное поле до 105.5 м.д., а сигнала С-2 в слабое поле до 83.61 м.д. указывает на то, что терминальная D-глюкоза присоединена к нему 1→2 связью. Следовательно, углеводная цепь гликозида **3** представляет собой софорозу, расположенную при С-3 генина. Этот вывод подтверждается анализом двумерных спектров.

В спектрах ROESY и HMBC, аномерный протон остатка В с химическим сдвигом 5.42 м.д. имеет корреляционные пики с протоном Н-2 остатка А (4.30 м.д.) и атомом углерода С-2 остатка А (83.61 м.д.), а его аномерный протон (4.99 м.д.) - корреляции с Н-3 (3.58 м.д.) и С-3 (88.93 м.д.) агликона.

Вышеуказанные данные указывают на то, что циклоунифолиозид В (**3**) имеет β-D-глюкопиранозил(1→2)-β-D-глюкопиранозидный остаток, связанный с генином через гидроксил при С-3.

Таким образом, строение гликозида **3** установлено как 3-O-[β-D-глюкопиранозил(1→2)]-β-D-глюкопиранозид-20R,24S-эпоксициклоартан-3β,6α,16β,25-тетраол.

3. Строение циклоунифолиозида С

Циклоунифолиозид С (5), $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$. В ИК-спектре соединения **5** имеются полосы поглощения при 3470 и 3035 cm^{-1} , характерные для гидроксильных групп и CH_2 -группы циклопропанового кольца соответственно.

В спектре ^1H ЯМР циклоунифолиозида С в сильном поле при 0.23 и 0.56 м.д. имеются однопротонные дублеты, расщеплённые по системе АХ, относящиеся к метиленовым атомам водорода циклопропанового кольца, а также сигналы семи метильных групп. Эти данные позволили нам отнести соединение **5** к тритерпеноидам циклоартанового ряда.

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединения **5** имеются сигналы одного аномерного протона, резонирующего при 4.98 м.д. и одного аномерного углеродного атома, резонирующего при 106.66 м.д. Это указывает на то, что в соединении **5** присутствует один углеводный остаток.

Кислотный гидролиз соединения **5** приводит к получению генина, идентифицированного с циклоасгенином С (**2**) (см. рис. 4). В гидролизате БХ, сравнением с подлинными образцами, обнаружили D-глюкозу.

Углеводный остаток в гликозиде по данным спектров COSY и TOCSY представлен β-D-глюкопиранозой. На основании результатов сравнительного анализа значений химических сдвигов сигналов углеродных атомов в

спектрах ^{13}C ЯМР циклоасгенина С и циклоунифолиозида С установлено, что эффекту гликозилирования подвергся атом С-3.

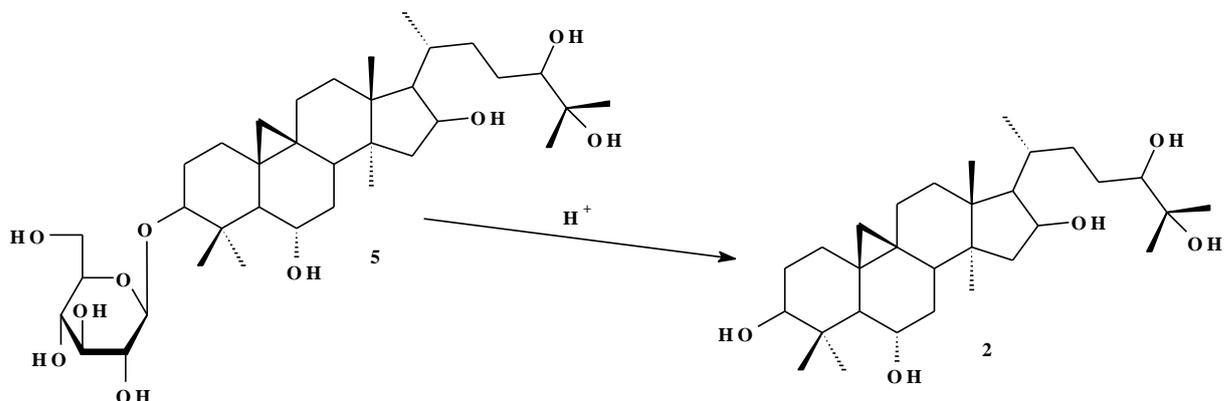


Рис. 4. Кислотный гидролиз циклоунифолиозида С (5)

Местоположение углеводного остатка у С-3 агликона подтверждается также наличием в спектре ROESY корреляционных пиков Н-1 глюкопиранозы с Н-3 и Н-29 агликона и в спектре НМВС - корреляционного пика Н-1 глюкопиранозы и С-3 агликона.

Таким образом, для циклоунифолиозида С (5) установлено строение 3-О-β-D-глюкопиранозид-24R-циклоартан-3β,6α,16β,24,25-пентаола.

4. Строение циклоунифолиозида D

Циклоунифолиозид D (6), $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$. В ИК-спектре соединения **6** имеются полосы поглощения, характерные для гидроксильных, метиленовых и сложноэфирных групп при 3465, 3048, 1718 и 1273 cm^{-1} соответственно.

В спектре ^1H ЯМР циклоунифолиозида D в сильном поле при 0.57 и 0.25 м.д. имеются однопротонные дублеты, расщеплённые по системе AX, относящиеся к метиленовым атомам водорода циклопропанового кольца и чётко проявляются резонансные линии семи метильных групп при 0.95; 1.05; 1.20; 1.37; 1.51; 1.54 и 2.01 м.д. Углеродные атомы циклопропанового кольца С-9, С-10 и С-19 в спектре ^{13}C ЯМР резонируют при 20.80, 28.66 и 29.08 м.д. соответственно. Эти данные указывают на то, что соединение **6** относится к тритерпеноидам циклоартанового ряда.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C циклоунифолиозида D содержат один трёхпротонный синглет при 2.21 м.д. и сигналы углеродных атомов при 21.21 и 170.6 м.д., которые свидетельствуют о наличии в соединении одной ацетильной группы.

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединения **6** имеются сигналы одного аномерного протона при 4.99 м.д. и одного аномерного углеродного атома при 106.68 м.д., указывающие на то, что соединение **6** является монозидом.

Щелочной гидролиз циклоунифолиозида D приводит к получению соединения **5**, идентифицированного с циклоунифолиозидом C (см. рис. 5).

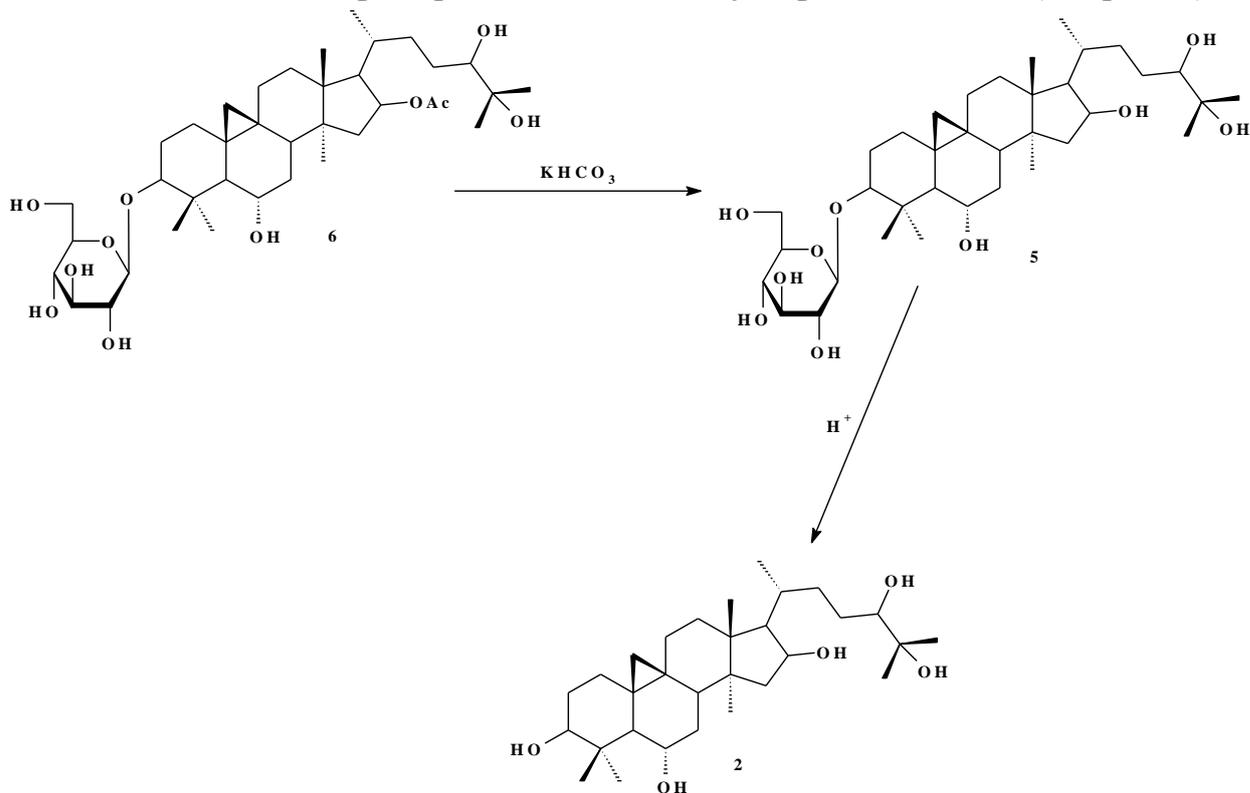


Рис. 5. Химические превращения циклоунифолиозида D (6)

При сравнительном анализе ^1H ЯМР спектров соединений **6** и **5** найдено слабopольное смещение H-16 (5.53 м.д.) относительно химического сдвига H-16 (4.09 м.д.) соединения **5**, что указывает на наличие ацетильной группы при C-16. Местоположение ацетильной группы при C-16 атома агликона подтверждается также найденным в спектре ROESY корреляционным пиком взаимодействия CH_3 -группы с химическим сдвигом 2.21 м.д. с протоном H-23.

Кислотный гидролиз соединения **5** привёл к получению генина **2** идентифицированного с циклоасгенином C (см. рис. 5). В гидролизате БХ, сравнением с подлинными образцами, обнаружили D-глюкозу.

В спектре ЯМР ^1H аномерный протон D-глюкозы резонирует при 4.99 м.д. в виде дублета с $\text{KCCB } ^3\text{J}=7.2$ Гц и указывает на пиранозную форму, $^4\text{C}_1$ -конформацию моносахаридного остатка и β -конфигурацию. Сигнал атома C-3 в спектре ЯМР ^{13}C гликозида **6** подвергся значительному (+10.72 м.д.) низкoпольному смещению по сравнению с таковым циклоасгенина C (78.84 м.д.) и резонирует при 88.84 м.д. Этот факт однозначно определяет место присоединения β -D-глюкопиранозы при C-3 агликона.

Таким образом, для циклоунифолиозида D установлено строение 3-O- β -D-глюкопиранозид-16-O-ацетил-24R-циклоартан-3 β ,6 α ,16 β ,24,25-пентаол.

5. Идентификация известных тритерпеноидов, выделенных из *Astragalus unifoliolatus* Bunge

Из растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, кроме указанных выше гликозидов, выделены известные циклоартановые соединения, циклоаралозид С и циклокантогенин, а также тритерпеноид олеананового ряда – олеаноловая кислота.

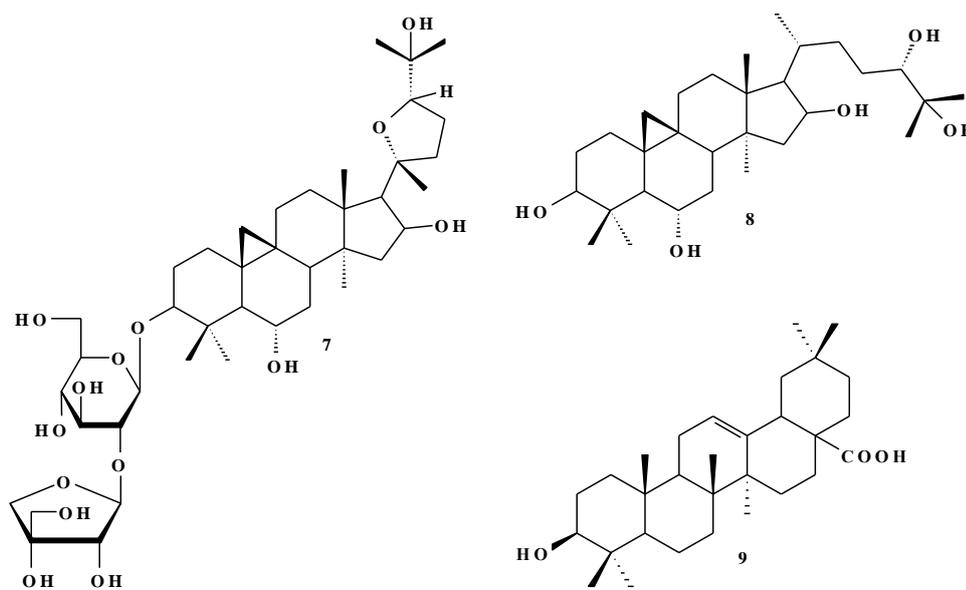


Рис. 6. Известные тритерпеновые соединения, выделенные из растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge

Циклоаралозид С (7) $C_{41}H_{68}O_{14}$. В ИК-спектре соединения 7 имеются полосы поглощения, характерные для метиленовой группы циклопропанового кольца и гидроксильным группам соответственно при 3050 и 3478 cm^{-1} .

Спектр ЯМР ^{13}C циклоаралозид С содержит 41 сигнал, из которых 7 принадлежат CH_3 -группам, 12 - CH_2 -группам, 14 - CH -группам, и 8 - четвертичным атомам углерода. Спектр 1H ЯМР этого гликозида, содержащий два сигнала с химическими сдвигами 0.21 и 0.51 м.д., характерные для тритерпеноидов циклоартанового ряда, был расшифрован при помощи двумерных методик COSY и TOCSY.

При анализе химических сдвигов ^{13}C и 1H спектров ЯМР установлено, что агликоном является замещённый по 3-ОН циклосиверсигенин (3).

Анализ спектров показал, что углеводная часть представлена двумя сахарными остатками, один из которых является глюкозой, а другой - сахаром в фуранозной форме, протоны которого образуют три изолированные спиновые системы типа AX. Такой протонный спектр характерен для апиозы, где вышеуказанные спиновые системы принадлежат

протонам Н-1 и Н-2, а также протонам О-СН₂-групп при С-4 и С-5. Принадлежность рассматриваемых сигналов была подтверждена при анализе спектров HSQC и HMBC. Как и предполагалось, одна из AX - систем образована аномерным протоном при 6.53 м.д. (¹³C - 111.24 м.д.) и протоном Н-2 4.93 м.д. (¹³C - 78.73 м.д.). Две остальные AX системы принадлежат протонам двух СН₂-групп. Сигнал С-3 был найден при анализе спектра HMBC благодаря присутствию в нем корреляций протона при С-5 и протона Н-4 с атомом углерода. Спектр HSQC показал, что сигнал С-2 глюкозы находится в более слабом поле по сравнению с незамещённым остатком. Последовательность присоединения остатков была найдена при анализе спектров ROESY и HMBC. В спектре ROESY на координате химического сдвига аномерного протона глюкозы помимо внутриостаточных корреляций (Н-1'-Н-2', Н-1'-Н-3' и Н-1'-Н-5') наблюдалась трансгликозидная корреляция Н-1' с Н-3 агликона.

Для аномерного протона апиозы не было найдено каких-либо корреляций с кольцевыми протонами глюкозы, однако в спектре ROESY наблюдалось его взаимодействие с протонами метильных групп агликона СН₃-29 и СН₃-30. Его природу удалось выяснить при анализе спектра HMBC, где была дана корреляция Н-2 глюкозы с С-1 апиозы. Таким образом, эти данные показывают, что к С-3 агликона присоединён дисахарид D-апио-β-D-фуранозил(1→2)-β-D-глюкопираноза. Важным для определения абсолютной конфигурации апиозы была найденная в спектре ROESY корреляция пиков между протонами Н-2 и Н-5, что свидетельствует об их *cis*-положении в пятичленном цикле.

Таким образом, было установлено, что соединение **7** имеет строение 3-О-[D-апио-β-D-фуранозил(1→2)]-β-D-глюкопиранозид-20R,24S-эпоксициклоартан-3β,6α,16β,25-тетраола. Это соединение было выделено ранее двумя независимыми группами учёных из корней *A. amarus* и *A. iliensis*, и имеет синонимические названия циклоаралозид С и астраилиенин А (см. рис. 6).

Циклокантогенин (8) С₃₀Н₅₀О₅. В спектре ¹H ЯМР соединения **8** имеются сигналы семи метильных групп при 1.44; 1.47; 1.05; 1.38; 1.11; 1.90 и 1.49 м.д., а также сигналы двух однопротонных дублетов системы AX при 0.34 и 0.62 м.д., однозначно относящиеся к метиленовым атомам водорода циклопропанового кольца, характерного для циклоартановых соединений.

Спектр ЯМР ¹³C соединения **8** содержит 30 сигналов, из которых 7 принадлежат СН₃-группам, 9 - СН₂-группам, 8 - СН-группам и 6 - четвертичным атомам углерода.

Соединение **8** идентифицировано с помощью ¹H, ¹³C ЯМР и двумерных спектров (COSY, TOCSY). Анализ спектров ¹³C ЯМР соединения **8** показал его полное совпадение с таковыми циклокантогенина, выделенного ранее из стеблей *Astragalus tragacantha* и имеющего строение 24S-циклоартан-3β,6α,16β,24,25-пентаола (см. рис. 6).

Олеаноловая кислота (9) C₃₀H₄₈O₃. В ИК-спектре соединения **9** имеются полосы поглощения характерные для гидроксильной и свободной карбоксильной групп соответственно при 3447 и 1699 см⁻¹.

В спектре ¹H ЯМР соединения **9** в области сильного поля находятся сигналы семи метильных групп, резонирующих при 0.91; 0.97; 1.03; 1.04; 1.05; 1.26 и 1.31 м.д., а также сигнал от протона при двойной связи в слабом поле при 5.52 м.д.

Структура соединения **9** окончательно подтверждена с помощью ¹H, ¹³C ЯМР и двумерных спектров (COSY, TOCSY). В спектре ¹³C ЯМР углеродные атомы двойной связи C-12 и C-13 резонируют в слабом поле при 122.48 и 144.90 м.д. Данные ¹³C ЯМР-спектра соединения **9** с таковыми литературы олеаноловой кислоты совпадают.

6. Влияние экстракта надземной части *Astragalus unifoliolatus* Bunge на некоторые функции печени

Ранее было установлено, что экстракты растений рода *Astragalus*, а также индивидуальные циклоартановые гликозиды обладают выраженной желчегонной, гипохолестеринемической, гиполипидемической активностями. В этой связи этанольный экстракт, надземной части *Astragalus unifoliolatus* Bunge, содержащий циклоартановые гликозиды, изучался на наличие у него способности влиять на такие специфические функции печени, как интенсивность секреции желчи, синтез желчных кислот, обмен билирубина и экскреция холестерина. Эксперименты были выполнены совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии ИХРВ АН РУз.

Установлено, что этанольный экстракт надземной части *A. unifoliolatus* Bunge, содержащий циклоартановые гликозиды обладает выраженным желчегонным действием и оказывает благоприятное влияние на химический состав желчи (особенно в условиях токсического поражения печени). По своему эффекту в этих условиях она не уступает известному импортному желчегонному средству - танацехолу. Исследуемый экстракт надземной части *A. unifoliolatus* Bunge представляет значительный интерес для разработки на её основе эффективного лекарственного препарата для использования при патологических состояниях гепато-билиарной системы.

7. Результаты цитотоксического исследования экстрактов и тритерпеноидов растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge

В литературе имеются данные о цитотоксичности циклоартановых гликозидов на различные клеточные линии. В связи с этим изучены *in vitro* цитотоксические свойства циклоартановых гликозидов и экстрактов из надземной части растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge.

Цитотоксическое исследование проведено к.х.н. Мамадалиевой Н.З. при поддержке грантом Университета Туския в лаборатории Растительной Цитологии и Биотехнологии Университета Туския (Витербо, Италия).

Результаты цитотоксического исследования показывают о возможности использования метанольного и водного экстрактов надземной части *Astragalus unifoliolatus* Bunge, а также циклоунифолиозидов А и В для создания высокоспецифических противоопухолевых средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы

1. Показано, что надземная часть и корни растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge являются источником тритерпеновых гликозидов циклоартанового ряда. Из надземных частей растения выделены новые циклоартановые гликозиды, циклоунифолиозиды А и В, а также ранее известное соединение циклокантогенин и тритерпеноид олеананового ряда, олеаноловая кислота. Из корней – циклоунифолиозиды С и D, а также ранее известное соединение - циклоаралозид С.
2. Установлено строение циклоунифолиозида А, являющегося 3-О-β-D-глюкопиранозид-6,16-ди-О-ацетил-24R-циклоартан-3β,6α,16β,24,25-пентаолом.
3. Определено, что циклоунифолиозид В имеет строение 3-О-[β-D-глюкопиранозил(1→2)]-β-D-глюкопиранозид-20R,24S-эпоксициклоартан-3β,6α,16β,25-тетраола.
4. Установлено, что циклоунифолиозид С представляет собой 3-О-β-D-глюкопиранозид-24R-циклоартан-3β,6α,16β,24,25-пентаол.
5. Установлено, что циклоунифолиозид D имеет строение 3-О-β-D-глюкопиранозид-16-О-ацетил-24R-циклоартан-3β,6α,16β,24,25-пентаол.
6. Фармакологическое исследование показало, что экстракт растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge является малотоксичным, обладает желчегонной и гипохолестеринемической активностями, оказывает стимулирующее влияние на желчегонные процессы в печени, улучшает обмен билирубина.
7. Цитотоксическое исследование *in vitro* метанольного и водного экстрактов, а также индивидуальных веществ циклоунифолиозидов А и В, показало, что они обладают выраженной цитотоксичностью на клетки P3X миеломы мышей и могут быть использованы для создания специфических противоопухолевых средств.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Saatov Z., Uteniyazov K.K., Kucherbaev K.J., Putieva J.M. Triterpene glycosides and their biological activity // 20th International Carbohydrate Symposium. August 27 - September 1, 2000. -Hamburg, Corrigendum Addendum, Germany. 2000. – P. 2.
2. Uteniyazov K.K., Kucherbaev K.J., Saatov Z. Triterpenoid glycosides from *Astragalus* species // 4th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. 2001, 6-8 June (Isparta) - Turkey, 2001. – P. 97.
3. Uteniyazov K.K., Kucherbaev K.J., Saatov Z., Kachala V.V., Shashkov A.S. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus unifoliolatus* // XVI International Symposium on Glycoconjugates. Abstracts, The Hague, The Netherlands, August 19-24, -2001. – P. 156.
4. Sasmakov S.A., Kucherbaev K.J., Uteniyazov K.K., Uteniyazov K.U., Saatov Z. Triterpenoid glycosides of the plants of genus *Astragalus* and *Zygophyllum* // 11th European Carbohydrate Symposium, Faculdade de Lisboa, Lisboa, Portugal, September 2-7, 2001. – P. 73.
5. Кучербаев К.Дж., Утениязов К.К., Качала В.В., Саатов З., Шашков А.С., Утениязов К.У., Халмуратов П. Тритерпеновые гликозиды из *Astragalus*. Строение циклоунифолиозида В из *Astragalus unifoliolatus* // Химия природ. соедин. –Ташкент, 2002. -№1. – С. 50-53.
6. Кучербаев К.Дж., Утениязов К.К., Качала В.В., Саатов З., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды растений рода *Astragalus*. Строение циклоунифолиозида А из *Astragalus unifoliolatus* // Химия природ. соедин. – Ташкент, 2002. -№2. – С.146-148.
7. Кучербаев К.Дж., Утениязов К.К., Качала В.В., Саатов З., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды растений рода *Astragalus*. III. Строение циклоунифолиозида С из *Astragalus unifoliolatus* // Химия природ. соедин. –Ташкент, 2002. -№5. – С. 364-366.
8. Кучербаев К.Дж., Утениязов К.К., Качала В.В., Саатов З., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды растений рода *Astragalus*. IV. Строение циклоунифолиозида D из *Astragalus unifoliolatus* // Химия природ. соедин. – Ташкент, 2002. -№6. – С. 456-457.
9. Мамадалиева Н.З., Кучербаев К.Дж., Утениязов К.К., Эгамбердиева Д., Tiezzi A., Triggiani D. Цитотоксические свойства компонентов растения *Astragalus unifoliolatus* // Актуальные проблемы химии природных соединений: Сборник тезисов конф. 18-19 марта 2009. – Ташкент, 2009. – С. 50.
10. Кучербаев К.Дж., Наубеев Т.Х., Мамадалиева Н.З. Цитотоксическое исследование компонентов растений рода *Astragalus*, произрастающих в Республике Каракалпакстан // Материалы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». МГУ имени М.В.Ломоносова 14-17 апреля 2009 г. – Москва, 2009. – С. 13.

11. Kucherbaev K.J., Naubeev T.Kh., Uteniyazov K.K., Isaev M.I. Cycloartanes from the Astragalus plants of the flora of Karakalpakstan // 8th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. 2009, 15-17 June (Eskişehir) – Turkey, 2009. – P. 160.
12. Мамадалиева Н.З., Кучербаев К.Дж., Наубеев Т.Х., Утениязов К.К., Эгамбердиева Д., Tiezzi A., Triggiani D., Исаев М.И. Цитотоксические свойства циклоартановых гликозидов из растений рода *Astragalus*, произрастающих в Республике Каракалпакстан // Фармацевтический журнал. – Ташкент, 2009. – № 2. – С. 78-83.

Кимё фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Кучербаев Камал Джамаловичнинг 02.00.10 – Биоорганик кимё ихтисослиги бўйича «*Astragalus unifoliolatus* Bunge циклоартан гликозидлари» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч (энг муҳим) сўзлар: циклоартанлар, *Astragalus unifoliolatus* Bunge, тритерпен гликозид, спектроскопия, хроматография.

Тадқиқот объектлари: *Astragalus unifoliolatus* Bunge ўсимлигининг ер устки қисми ва илдизи.

Ишнинг мақсади: *Astragalus unifoliolatus* Bunge ўсимлигидан циклоартан қатори гликозидларини ажратиб олиш ва ўрганиш, шунингдек уларнинг биологик фаолликларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқот усуллари: Экстракция, хроматография усуллари, кимёвий, физик ва спектрал усуллари.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: Қорақалпоғистон Республикасида ўсадиган *Astragalus unifoliolatus* Bunge ўсимлигининг тритерпен таркиби ўрганилди. Бу ўсимликдан 7 та тритерпен бирикма ажратиб олинди, шулардан 4 таси янги эканлиги аниқланди. Биологик тадқиқотлар натижасида ўрганилаётган ўсимлик экстрактининг ўт хайдовчи ва гипохостеринемик фаолликлари аниқланди. Шунингдек ўсимликнинг ер устки қисми компонентларининг цитотоксик хусусиятлари аниқланди.

Амалий аҳамияти: Биологик тадқиқот натижалари ўрганилаётган ўсимлик экстракти асосида гепатологик амалиёт учун юқори самарали дори воситаларини яратиш мумкинлигини кўрсатди.

Тадбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: *Astragalus unifoliolatus* Bunge ўсимлиги циклоартан қаторидаги тритерпен гликозидларини олиш учун қулай хом ашё манбаидир.

Қўлланиш (фойдаланиш) соҳаси: *Astragalus unifoliolatus* Bunge ўсимлигининг экстрактини самарали дори восита сифатида гепатологик амалиётда ва шунингдек онкологик воситалар яратишда фойдаланиш мумкин. Янги гликозидлар, циклоунифолиозид А, В, С ва Д -ларнинг кимёвий тузилишлари, физик-кимёвий константалари ва спектрал қийматлари М.И.Исаевнинг Springer да чоп этилаётган «Cycloartane triterpenoids and glycosides» китобига киритилган.

РЕЗЮМЕ

диссертации Кучербаева Камал Джамаловича на тему «Циклоартановые гликозиды *Astragalus unifoliolatus* Bunge» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия

Ключевые слова: циклоартаны, *Astragalus unifoliolatus* Bunge, тритерпеновый гликозид, спектроскопия, хроматография.

Объект исследования: корни и надземная часть растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge.

Цель исследования: выделение и изучение тритерпеновых соединений циклоартанового ряда растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, а также выявление их биологической активности.

Методы исследования: экстракция, хроматографические методы, химические, физические и спектральные методы исследования.

Полученные результаты и их новизна: изучен тритерпеновый состав ранее неизученного растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, произрастающего в Республике Каракалпакстан. Выделено 7 тритерпеновых соединений, 4 из которых оказались новыми. Биологические испытания выявили малотоксичность, желчегонное и гипохлестеринемическую активности этанольного экстракта изучаемого растения. Выявлены также цитотоксические свойства компонентов надземной части растения.

Практическая значимость: Результаты биологических исследований показали возможность создания на основе экстракта из исследуемого растения высокоэффективных лекарственных средств для использования в гепатологической практике.

Степень внедрения и экономическая эффективность: Растение *Astragalus unifoliolatus* Bunge является перспективным источником тритерпеновых гликозидов циклоартанового ряда.

Область применения: Экстракт надземной части растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge можно использовать в качестве лекарственных средств в гепатологической практике и для создания высокоспецифических противоопухолевых средств. Химические структуры, физико-химические константы и спектральные параметры новых гликозидов циклоунифолиозидов А, В, С, D включены в справочник М. И. Исаева «Cycloartane triterpenoids and glycosides», издаваемый в Springer.

RESUME

of the thesis of Kucherbaev Kamal Jamalovich on the scientific degree competition of the candidate of chemical sciences in speciality 02.00.10 - Bioorganical chemistry on subject «Cycloartane glycosides from *Astragalus unifoliolatus* Bunge»

Key words: cycloartane, *Astragalus unifoliolatus* Bunge, triterpene glycoside, spectroscopy, chromatography.

Subjects of the inquiry: Roots and above the ground parts of *Astragalus unifoliolatus* Bunge.

Aim of the inquiry: Isolation and study of the cycloartane glycosides from the plant *Astragalus unifoliolatus* Bunge, screening the biological activity of the isolated substances and extract from plant material.

Method of the inquiry: extraction, chromatography methods, chemical, physical and spectral methods of investigation.

The results achieved and their novelty: Triterpene compounds of the plant *Astragalus unifoliolatus* Bunge, growing in the Republic of Karakalpakstan have been studied. 7 triterpenoid compounds have been isolated from the plant, 4 of them are novel. The biological tests have been showed the less toxicity, cholagogue and hypocholesteremic actions of the ethanol extract from the studied plant. The cytotoxic properties of the components from above the ground parts of *Astragalus unifoliolatus* Bunge were also determined.

Practical value: The biological investigations showed that the high effective medicines for hepatology practice may be created on basis of the extract from the studied plant.

Degree of embed and economical effectivity: The plant *Astragalus unifoliolatus* Bunge, growing in the Republic of Karakalpakstan is a rich source of cycloartane glycosides.

Sphere of usage: The extract from above the ground parts of *Astragalus unifoliolatus* Bunge containing the sum of cycloartane glycosides may have interest in perspective as medicinal preparation for treatment hepatologic diseases and for creation of the high specific antitumor drugs. Chemical structures of the novel glycosides, cyclounifoliosides A, B, C and D, their physical constants and spectral parameters are included in M. I. Isaev's hand-book «Cycloartane triterpenoids and glycosides» published in Springer.