

УДК 577.13

ФИТОЭКДИСТЕРОИДЫ КОРНЕЙ *SILENE FRIVALDSZKYANA* HAMPE

© Л.Н. Зибарева^{1*}, О.В. Волкова¹, С.В. Морозов², Е.И. Черняк²

¹ Томский государственный университет, Сибирский ботанический сад,
пр. Ленина, 36, Томск, 634050 (Россия), e-mail: zibareva.lara@yandex.ru

² Новосибирский институт органической химии СО РАН, пр. Лаврентьева, 9,
Новосибирск, 630090 (Россия)

Из корней интродуцированных в Западную Сибирь *Silene frivaldszkyana* (Caryophyllaceae) выделены экдистероиды: 20-гидроксиэкдизон, полиподин В, интегристерон А, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон, 2-дезоксидэкдизон, 20,26-дигидроксиэкдизон, 26-гидроксиполиподин В, 20-гидроксиэкдизон-25-β-D-глюкозид. Структуры идентифицированы с помощью методов ЯМР-, масс-спектрометрии, ВЭЖХ. Наличие 26-гидроксиинтегристерона А в корнях установлено при сравнительном ВЭЖХ-анализе с выделенным соединением из надземной части *Silene frivaldszkyana*. Показано, что исследуемый вид *Silene* синтезирует характерные для данного рода экдистероиды: 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон, 2-дезоксидэкдизон, 20-гидроксиэкдизон, полиподин В, интегристерон А и является богатым источником их 26-гидрокси производных. Наряду с распространенными экдистероидами в видах рода *Silene* впервые в исследуемом виде выделен 20-гидроксиэкдизон-25-β-D-глюкозид.

Сравнительный анализ состава экдистероидов в надземной и подземной частях показал, что корни содержат более богатый их состав, видимо, это связано с тем, что корни многолетних растений аккумулируют эти соединения. А 20-гидроксиэкдизон-25-β-D-глюкозид, вероятно, является запасным веществом мажорного компонента – 20-гидроксиэкдизона.

Ключевые слова: фитоэкдистероиды, идентификация, корни *Silene frivaldszkyana*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ/РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 16-44-700634.

Введение

Растения синтезируют множество стероидных соединений, присущих не только растительному, но и животному миру. Наиболее широко распространены в мировой флоре экдистероиды, которые являются аналогами гормонов линьки и метаморфоза насекомых. Экдистероиды по химической природе принадлежат к полиоксистероидам с гидроксильными группами в стероидном ядре и боковой цепи, циклопропаном между циклами А и В, содержащими 7-ен-6-он хромоформную группу, 14–ОН. В настоящее время известно о широком распространении этих стероидов в растениях семейства Caryophyllaceae (роды *Lychnis*, *Silene*, *Petrocoptis* и др.).

Silene frivaldszkyana Hampe. – один из перспективных видов по содержанию и составу фитоэкдистероидов, впервые рекомендованный в качестве источника этих БАВ [1, 2]. В процессе многолетнего изучения в Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета (СБС ТГУ) вида *Silene frivaldszkyana*, являющегося эндемиком Балканского полуострова, показано, что растения способны успешно адаптироваться в Западной Сибири и произрастать на протяжении 17 лет. Растения проходят полный цикл развития, получен ряд поколений, сохраняющих способность синтезировать фитоэкдистероиды.

Установлено, что в надземной части *Silene frivaldszkyana* синтезируются 20-гидроксиэкдизон,

Зибарева Лариса Николаевна – доктор химических наук, заведующая лабораторией фитохимии,
e-mail: zibareva.lara@yandex.ru
Волкова Ольга Владимировна – старший лаборант,
e-mail: olgavolkova2510@rambler.ru
Морозов Сергей Владимирович – кандидат химических наук, заведующий лабораторией,
e-mail: morozov@nioch.nsc.ru
Черняк Елена Ильинична – старший научный сотрудник,
e-mail: chernyak@nioch.nsc.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

полиподин В, 2-дезоксидеокси-20-гидроксиэксидон, 2-дезоксидеоксиэксидон, интегристерон А, 26-гидроксиполиподин В, 20,26-гидроксиэксидон, 26-гидроксиинтегристерон А [3, 4]. Последнее соединение является новым и впервые выделенным. Структуры выделенных соединений установлены с помощью ЯМР-, масс-спектрометрии, ВЭЖХ. Информация о выделенных эксидстероидах и источнике включена в международную базу данных Ecdybase.org [5]. Отличительной особенностью состава этого вида является синтез ряда 26-оксипроизводных эксидстероидов [3, 6]. Поскольку корни этого ценного вида отличаются высоким содержанием эксидстероидов, важно было изучить их состав.

Цель настоящего исследования – изучение состава эксидстероидов корней *Silene frivaldszkyana*, интродуцированного в Сибирском ботаническом саду ТГУ.

Экспериментальная часть

Выделение эксидстероидов проводили из подземной части растений, интродуцированных в СБС ТГУ с 1994 г. Растительное сырье является вторым поколением от маточных растений, семена для которых получены из ботанического сада Галле (Германия).

Корни *Silene frivaldszkyana* (250 г) экстрагировали пятикратно 70% этиловым спиртом. Экстрагент отгоняли под вакуумом при температуре 50 °С с помощью вакуумного ротационного испарителя ИКА НВ 10 digital (Германия). Концентрированный экстракт разбавляли водой в соотношении 1 : 2, отфильтровывали. Фильтрат очищали от липофильных веществ *n*-гексаном. Сумму эксидстероидов из очищенного фильтрата извлекали *n*-бутанолом. Бутанольную фракцию сконцентрировали до смолообразного состояния.

Затем полученную бутанольную смесь фракционировали системами растворителей хлороформ – этиловый спирт в соотношениях 7 : 1; 4 : 1; 2 : 1. Полученные фракции сконцентрировали на ротационном испарителе при температуре 50 °С. Концентрированные фракции, обогащенные неполярными, средне полярными и полярными эксидстероидами, подвергали многократному разделению на колонках с силикагелем марки КСК (Россия) с размером частиц 0,10-0,16 мм. В процессе хроматографирования в качестве элюентов использовали системы растворителей хлороформ – этанол: 1) 9 : 1; 2) 7 : 1; 3) 5 : 1; 4) 4 : 1; 5) 2 : 1; 6) 1 : 1. Контроль над разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ на пластинках TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Merk. Идентификацию выделенных эксидстероидов *Silene frivaldszkyana* проводили с помощью методов ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/МС и ЯМР-спектроскопии.

ВЭЖХ/УФ-анализ выполнен на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse XDB C8; 4,6×150 мм, размер зерна сорбента 5 мкм. Градиентное элюирование вели системой растворителей метанол – 0,1% трифторуксусная кислота от 0 до 100% метанола; скорость элюирования 0,8 мл/мин. Аналитическая длина волны $\lambda_{\max} = 254$ нм для регистрации фитоэксидстероидов.

ВЭЖХ/МС-анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с диодно-матричным детектором и гибридным квадруполь-время пролетным масс-спектрометром micrOTOF-Q (фирма Bruker). Колонка: Zorbax XDB-C8, 2,1×50 mm. Элюент: H₂O-ACN (линейный градиент содержания ACN от 5 до 40% с 0 до 20 мин). Скорость потока: 0,4 мл/мин. Рабочие параметры масс-детектирования: методы ионизации: химическая ионизация и электростатическое распыление при атмосферном давлении (APCI pos. и API-ES); сканирование положительных и отрицательных ионов в диапазоне $m/z = 200-800$; поток газа-осушителя (азот): 4 л/мин, температура 240 °С, температура на распылителе – 390 °С. Спектры ЯМР зарегистрированы на приборах «Bruker AV 400».

Обсуждение результатов

ВЭЖХ/УФ бутанольной фракции, выделенной из корней *S. frivaldszkyana*, свидетельствует о более богатом составе эксидстероидов, чем в надземной части, идентификация которых была осуществлена в лаборатории профессора Р. Лафона (университет П. и М. Кюри, Париж) [3]. В бутанольной фракции надземной части *Silene frivaldszkyana* обнаружено 10 эксидстероидов, тогда как в бутанольной фракции экстракта корней *Silene frivaldszkyana* – 14 эксидстероидов.

В результате адсорбционной хроматографии на колонках и препаративной ВЭЖХ выделено 8 соединений. Мажорным компонентом эксидстероидной суммы исследуемого вида является соединение со временем удерживания 9,727 мин, имеющее характерный для эксидстероидов УФ-спектр ($\lambda = 248$ нм) и масс-спектр с характерной фрагментацией ($M^+ 481$), что соответствует структуре 20-гидроксиэксидона (I). Это подтверждает

ется и спектром ПМР (CD_3OD , δ , м.д.): 0,884 (3H, с, CH_3 -18), 0,964 (3H, с, CH_3 -19), 1,202 (3H, с, CH_3 -21), 1,190 (3H, с, CH_3 -26, 27), 1,753 (2H, д, H-1), 5,822 (1H, д, H-7), 1,295 (2H, д, H-23), 3,843 (1H, т, H-2), 3,873 (1H, т, H-3), 1,786 (2H, т, H-4), 2,386 (1H, т, H-5, H-17), 3,149 (1H, т, H-9), 1,425 (2H, т, H-24).

Полиподин В (**II**), mp. 215-217 °C. 1H -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, ppm): δ 0,73 (3H, s, CH_3 -18), 0,76 (3H, s, CH_3 -19), 1,06 (3H, s, CH_3 -21), 1,09 (6H, s, CH_3 -26 and CH_3 -27), 2,19 (1H, t-like, $J = 8,4$ Hz, H-17), 2,99 (1H, t-like, $J = 8,1$ Hz, H-9), 3,22 (1H, m, H-22), 3,76 (1H, m, H-2), 3,85 (1H, br s, H-3), 5,79 (1H, s, H-7).

Интегристерон А (**III**), 1H -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, ppm): δ 0,81 (3H, s, CH_3 -18), 1,05 (3H, s, CH_3 -19), 1,12 (3H, s, CH_3 -21), 1,15 (6H, s, CH_3 -26 and CH_3 -27), 2,26 (1H, t-like, $J = 7,7$ Hz, H-17), 2,55 (1H, m, H-5), 2,93 (1H, m, H-9), 3,30 (1H, m, H-22), 3,82 (2H, m, H-1 and H-2), 4,02 (1H, br s, H-3), 5,79 (1H, s, H-7). ESMS (–ve): m/z (% rel. intensity) 495,9 [$M-H$] $^-$ (100).

2-Дезокси-20-гидроксиэкдизон (**IV**), 1H -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, ppm): δ 0,79 (3H, s, CH_3 -18), 0,91 (3H, s, CH_3 -19), 1,13 (3H, s, CH_3 -21), 1,16 (6H, s, CH_3 -26 and CH_3 -27), 2,27 (1H, t-like, $J = 8,4$ Hz, H-17), 2,37 (1H, dd, $J = 3,9, 12,1$ Hz, H-5), 3,05 (1H, m, H-9), 3,33 (1H, m, H-22), 3,97 (1H, br s, H-3), 5,78 (1H, s, H-7). ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 465,2 [$M+H$] $^+$ (100).

На ВЭЖХ этот компонент экдистероидной суммы имеет время удерживания 15,303 мин, максимум поглощения $\lambda = 248$ нм, в масс-спектре характерную фрагментацию (M^+ 464) и идентифицирован с 2-дезокси-20-гидроксиэкдизоном.

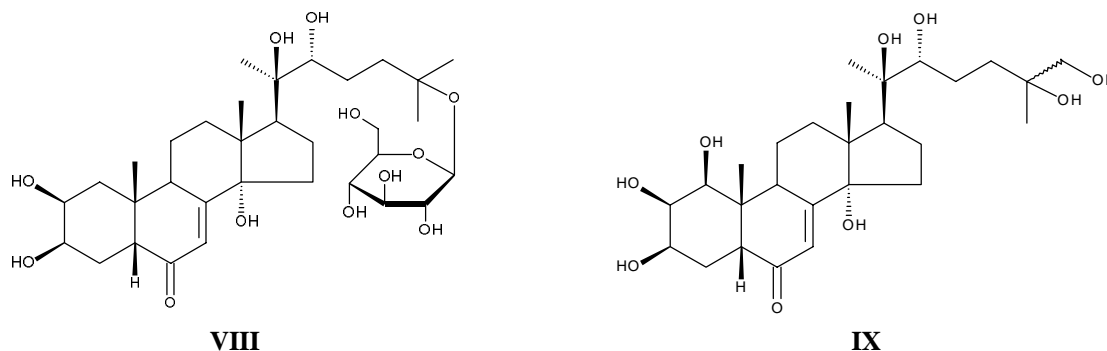
20,26-дигидроксиэкдизон (**V**). Соединение со временем удерживания 8,652 мин, имеющее свойственный экдистероидам УФ-спектр ($\lambda = 248$ нм) и масс-спектр с характерной фрагментацией (M^+ 496), соответствует структуре 20,26-дигидроксиэкдизона. Это подтверждается спектром ПМР (CD_3OD , δ , м.д.): 0,930 (3H, с, CH_3 -18), 1,109 (3H, с, CH_3 -19), 1,222 (3H, с, CH_3 -21), 1,222 (3H, с, CH_3 -27), 5,877 (1H, д., H-7), 2,607 (1H, дд., H-5), 3,114 (1H, т., H-9), 2,415 (1H, т., H-17), 3,345 (CH_2 -ОН, дд.).

Компонент экдистероидной суммы со временем удерживания 9,298 мин, имеющий характерный для экдистероидов УФ-спектр ($\lambda = 248$ нм) и масс-спектр, свойственный для экдистероида с M^+ 512, соответствует структуре 26-гидроксиполиподина В (**VI**).

Соединение со временем удерживания 16,401 мин, имеющий в УФ-спектре $\lambda = 248$ нм и масс-спектр с характерной фрагментацией (M^+ 416), что соответствует структуре 2-дезоксиэкдизона (**VII**).

20-гидроксиэкдизон-25- β -D-гликозид (**VIII**), имеет УФ-спектр ($\lambda = 248$ нм) и масс-спектр с характерной фрагментацией (M^+ 643). Спектр ПМР (ДМСО, δ , м.д.): 0,752 (3H, с, CH_3 -18), 0,851 (3H, с, CH_3 -19), 1,069 (3H, с, CH_3 -21), 1,045 (3H, с, CH_3 -26), 1,054 (3H, с, CH_3 -27), 1,468 (1H, д., H-1), 5,642 (1H, д., H-7), 2,150 (1H, дд., H-5), 1,494 (2H, т., H-4), 2,980 (1H, т., H-9), 1,707 (2H, т., H-15), 1,633 (2H, дд., H-16), 2,244 (1H, т., H-17), 4,636 (1H, д., glu – H1), 3,115 (1H, glu – H2), 3,523 (1H, т., glu – H3), 3,485 (1H, glu – H4), 4,413 (2H, дд., glu – H6). По данным хроматографического (ВЭЖХ/МС) и спектрального (ЯМР) анализа это соединение можно идентифицировать как 20-гидроксиэкдизон-25- β -D-гликозид [5]. Данное соединение из корней *Silene frivaldszkyana* было выделено впервые. Ранее экдистероид **VIII** был обнаружен в *Pfaffia irsinoides* (Amaranthaceae) [7] и *Silene oites* (Caryophyllaceae) [8].

26-гидроксиинтегристерон А (**IX**) в бутанольном экстракте корней *Silene frivaldszkyana* идентифицирован ВЭЖХ на основании времени удерживания искомого соединения, выделенного из надземной части [3].



Структуры некоторых экдистероидов, выделенных из корней *Silene frivaldszkyana*: **VIII** – 20-гидроксиэкдизон-25- β -D-гликозид; **IX** – 26-гидроксиинтегристерон А

Сравнение состава выделенных экидистероидов из надземной и подземной частей *Silene frivaldszkyana* показало, что корни как запасующий орган аккумулируют дополнительно глюкозид 20-гидроксиэкидизона, по всей вероятности, являющийся запасной формой экидистероидов зимой в корнях многолетних растений и предшественником 20-гидроксиэкидизона и всех других экидистероидов в процессе начала биосинтеза весной в листьях и других органах надземной части *Silene frivaldszkyana*.

Выводы

1. В корнях *Silene frivaldszkyana*, интродуцированной в Западной Сибири, обнаружено методом ВЭЖХ/МС больше экидистероидов, чем в надземной части.

2. Выделено и идентифицировано из корней *Silene frivaldszkyana* 9 экидистероидов: 20-гидроксиэкидизон, полиподин В, 2-дезоксид-20-гидроксиэкидизон, 2-дезоксидэкидизон, интегристерон А, 26-гидроксиполиподин В, 20,26-дигидроксиэкидизон, 20-гидроксиэкидизон-25-β-D-гликозид, 26-гидроксиинтегристерон А.

Список литературы

1. Зибарева Л.Н., Еремина В.И., Иванова Н.А. Новые экидистероидоносные виды рода *Silene* L. и динамика содержания в них экидистерона // Растительные ресурсы. 1997. Т. 33, вып. 3. С. 73–76.
2. Zibareva L. Distribution and levels of phytoecdysteroids in plants of genus *Silene* during development // Archives of insect biochemistry and physiology. 2000. Vol. 43. Pp. 1–8.
3. Zibareva L., Yeriomina V. I., Munkhjargal N., Girault J.-P., Dinan L., Lafont R. The Phytoecdysteroid Profiles of 7 Species of *Silene* (Caryophyllaceae) // Archives of insect biochemistry and physiology. 2009. Vol. 72. N4. Pp. 234–248.
4. Патент № 2445110 (РФ). Способ получения 26-интегристерона А из растительного сырья / Л.Н. Зибарева, О.В. Волкова / 07.12.2010.
5. Ecdybase [Electronic resource]. URL: <http://www.ecdybase.org>
6. Зибарева Л.Н., Волкова О.В., Лафон Р. Виды рода *Silene* – продуценты 26-гидроксиэкидистероидов // Теоретическая и прикладная экология. 2012. №1. С. 66–72.
7. Nishimoto N., Shiobara Y., Inoue S., Fujino M. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides* // Phytochemistry. 1988. Vol. 27. Pp. 1665–1668.
8. Girault J.-P., Bathori M., Varga E., Szendrei K., Lafont R. Isolation and identification of new ecdysteroids from the Caryophyllaceae // J. of Natural Products. 1990. Vol. 53. Pp. 279–293.

Поступило в редакцию 19 июля 2016 г.

Zibareva L.N.^{1*}, Volkova O.V.¹, Morozov S.V.², Chernayk E.I.² PHYTOECDYSTEROIDS OF ROOT *SILENE FRIVALDSZKYANA* HAMPE

¹ Tomsk State University, Siberian Botanical Garden, pr. Lenina, 36, Tomsk, 634050 (Russia),

e-mail: zibareva.lara@yandex.ru

² Novosibirskij Institute of organic chemistry of SB RAS, pr. Lavrenteva 9, Novosibirsk, 630090 (Russia)

Ecdysteroids were isolated from roots of *Silene frivaldszkyana* (Caryophyllaceae) introduced into culture in Western Siberia: 20-hydroxyecdysone, polypodine B, integristerone A, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, 2-deoxyecdysone, 20,26-dihydroxyecdysone, 26-hydroxypolypodine B, 26-hydroxyintegristerone A, 20-hydroxyecdysone-25- β -D-glucoside. Structures are installed using NMR, mass spectroscopy, HPLC. The presence of 26-hydroxyintegristerone A in the roots established by comparative HPLC analysis with compound isolated from overground part of plants.

It is shown that this *Silene* species synthesizes characteristic for this genus of ecdysteroids: 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, 2-deoxyecdysone, 20-hydroxyecdysone, polypodine B, integristerone A, and is a rich source of their 26-hydroxy derivatives. Among the common ecdysteroids of the genus *Silene* 20-hydroxyecdysone-25- β -D-glycoside was isolated for the first from roots of *S. frivaldszkyana*.

Comparative analysis of ecdysteroids in aboveground and underground parts showed that the roots contain a richer composition of them that is likely so that the roots of perennial plants accumulate these compounds. And 20-hydroxyecdysone-25- β -D-glycoside is a spare substance of major component 20-hydroxyecdysone.

Keywords: Phytoecdysteroids, identification, roots of *Silene frivaldszkyana*

References

1. Zibareva L.N., Eremina V.I., Ivanova N.A. *Rastitel'nye resursy*, 1997, vol. 33, no. 3, pp. 73–76. (in Russ.).
2. Zibareva L. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 2000, vol. 43, pp. 1–8.
3. Zibareva L., Yeriomina V. I., Munkhjargal N., Girault J.-P., Dinan L., Lafont R. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 2009, vol. 72, no. 4, pp. 234–248.
4. Patent 2445110 (RU). 07.12.2010. (in Russ.).
5. Ecdybase [Electronic resource]. URL: <http://www.ecdybase.org>
6. Zibareva L.N., Volkova O.V., Lafon R. *Teoreticheskaia i prikladnaia ekologiia*, 2012, no. 1, pp. 66–72. (in Russ.).
7. Nishimoto N., Shiobara Y., Inoue S., Fujino M. *Phytochemistry*, 1988, vol. 27, pp. 1665–1668.
8. Girault J.-P., Bathori M., Varga E., Szendrei K., Lafont R. *J. of Natural Products*, 1990, vol. 53, pp. 279–293.

Received July 19, 2016

* Corresponding author.

