

УДК 615.322

СПОСОБЫ ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗОАЛАНТОЛАКТОНА И АЛАНТОЛАКТОНА ИЗ КОРНЕЙ ДЕВЯСИЛА ВЫСОКОГО

© А.В. Семаков*, С.Г. Клочков

Институт физиологически активных веществ РАН, Северный пр., 1,
Черноголовка, 142432 (Россия), e-mail: L_vok@list.ru

Алантолактон и изоалантолактон накапливаются в больших количествах в корнях девясила высокого (*Inula helenioides* L.), однако их выделение в индивидуальном виде затруднительно ввиду одинаковой хроматографической подвижности. В данной работе представлены различные рабочие методики получения алантолактона и изоалантолактона в индивидуальном виде из корня девясила в многограммовых количествах. Хотя алантолактон и изоалантолактон могут быть выделены одновременно при разделении на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра, практичнее получать алантолактон или изоалантолактон из экстракта корней девясила высокого по отдельности. Чистый изоалантолактон может быть выделен путем несколькократной кристаллизации из 75% водного метанола. Другой, более быстрый, способ получения изоалантолактона состоит в реакции смеси лактонов девясила с диметиламином или морфолином. Изоалантолактон в виде аддукта с амином охотно отделяется кристаллизацией и регенерируется далее через получение четвертичной соли аммония. Алантолактон удобно получать в больших количествах через окисление изоалантолактона в смеси диоксидом селена в более полярные лактоны, которые отделяются хроматографически. В качестве соокислителей могут быть использованы перекись водорода, *трет*-бутилгидропероксид или периодат калия.

Ключевые слова: изоалантолактон, алантолактон, сесквитерпеновые лактоны, выделение.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-33-00567 мол_а, анализ ЯМР спектров выполнен в рамках Госзадания 0090_2019_0006.

Введение

Сесквитерпеновые лактоны – обширный класс вторичных метаболитов растений, наиболее распространенных среди растений семейства Сложноцветных (*Asteraceae*). Также они могут быть обнаружены и в растениях других семейств, таких как Зонтичные (*Umbelliferae*), Магнолиевые (*Magnoliaceae*). Примечательной особенностью многих соединений данного класса является высокая противоопухолевая активность, что во многом связано с их химической природой, а именно способностью вступать в реакции присоединения по типу Михаэля с тиольными и аминогруппами биомолекул клетки. Такая реакция возможна только для тех сесквитерпеновых лактонов, в альфа-положении от лактонного цикла которых находится сопряженная экзометиленовая группа. Эта и другие виды физиологической активности сесквитерпеновых лактонов, как например противовоспалительные и антигельминтные свойства, делают их перспективными веществами для разработки на их основе лекарственных средств.

Несмотря на то, что к настоящему моменту описано несколько тысяч выделенных из растений сесквитерпеновых лактонов [1, 2], многие из которых были проверены на ту или иную физиологическую активность, лишь небольшой их объем накапливается в количествах, достаточных для какого-либо практического использования. Большая же часть описанных лактонов содержится в растениях в очень незначительных кон-

центрациях и в дальнейшем представляет больше теоретический интерес, поскольку для получения даже миллиграммовых количеств подчас требуется переработать десятки килограммов сухого растительного сырья.

Семаков Алексей Владимирович – младший научный сотрудник лаборатории природных соединений, e-mail: L_vok@list.ru

Клочков Сергей Георгиевич – заведующий лабораторией природных соединений, e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

Другой подход заключается в полном органическом синтезе редких сесквитерпеновых лактонов вместо их выделения из природных источников. Задача осуществления синтеза сесквитерпеновых лактонов со сложными углеродными скелетами и обилием оптически активных центров неоднократно служила вызовом для химиков-органиков. Описанные в литературе синтезы лактонов, как правило, отличаются многостадийностью и крайней трудоемкостью при малых итоговых выходах целевых продуктов. Лишь в отдельных случаях [3, 4] разработанные методы синтеза сесквитерпеновых лактонов могут иметь практическое значение для получения их как основы лекарственных препаратов.

Вместо этих двух крайностей оптимальным решением для получения разнообразных соединений этого класса видится химическая модификация тех лактонов, которые накапливаются в растениях в значительных концентрациях и могут быть выделены в препаративных количествах. Для этого могут быть использованы алантолактон (1) и изоалантолактон (2) (рис.), выделяемые из корневищ девясила высокого (*Inula helenium* L.), где они обычно содержатся в количестве около 2% от сухой массы корней каждый. В отличие от других видов рода *Inula*, которые также накапливают сесквитерпеновые лактоны в корневой части, девясил высокий обладает массивным корневищем. Значительным преимуществом девясила высокого в качестве источника сесквитерпеновых лактонов служит факт его коммерческой доступности и невысокой цены.

Сложность получения алантолактона и изоалантолактона в препаративных количествах достаточно высокой чистоты заключается в невозможности их поделить через хроматографию на прямой фазе на силикагеле или оксиде алюминия. Разделение на обратной на обратной фазе возможно, но только в масштабе аналитической ВЭЖХ [5]. Единственный на данный момент метод препаративного разделения лактонов девясила состоит в использовании силикагеля с импрегнированным нитратом серебра [6, 7]. Но данный метод трудно масштабировать для получения больших количеств алантолактона и изоалантолактона. Также известен метод препаративного разделения алантолактона и изоалантолактона с применением противоточной хроматографии в системе гексан-ЭА-ацетонитрил-вода, но пока что приборы для противоточной хроматографии не вошли еще достаточно плотно в лабораторную практику [8].

Исследование способов выделения алантолактона и изоалантолактона проходило одновременно с изучением химии девясила высокого и началось довольно давно. Так, еще в первой половине 19 века были сообщения о наличии кристаллического вещества в корне девясила, которое можно отогнать с водой [9]. Вскоре Gerhardt [10] описал получение кристаллического вещества из свежих корней девясила путем извлечения горячим спиртом и кристаллизацией из сконцентрированного экстракта. Полученный продукт был назван геленин. Он имел температуру плавления 72 °С, растворялся в спирте, эфире и при нагревании в щелочных растворах в воде. Позже Kallen [11] показал, что геленин Герхардта не индивидуальное вещество, а, по крайней мере, два, поскольку при многократной перекристаллизации геленина из чистого этанола получалось кристаллическое вещество с более высокой температурой плавления 110 °С. В то же время при сублимации геленина или его перегонки с водяным паром получалось вещество с меньшей температурой плавления. Последнее было названо ангидридом алантовой кислоты [12] (от нем. Alantwurz – корень девясила), поскольку при гидролизе в растворе гидроксида калия давало соль соответствующей кислоты. Более корректное с химической точки название – алантолактон – предложено в 1895 г. в работе [13], поскольку было установлено, что алантовая кислота содержит карбоксильную и спиртовую группу и для избегания путаницы с полисахаридом инулином, который также носил название геленин. Сам алантолактон при этом было предложено отделять в виде продукта при вакуумной перегонке смеси лактонов [13, 14]. Для второго вещества с более высокой температурой плавления было показано, что оно обладает похожими химическими свойствами и при гидрировании дает такой же продукт, как и при гидрировании алантолактона [15]. Для него было предложено название изоалантолактон. На основании продуктов дегидрирования обеих лактонов девясила с селеном сделано предположение, что их строение близко к известному на тот момент сантонину, и они являются сесквитерпеноидами с эвдесмановым скелетом [14]. Правильная структура алантолактона была установлена только в 1964 г. [15]. Поскольку процедура получения лактонов девясила множественной перекристаллизацией была довольно сложна и длительна, был разработан способ, позволявший получить оба лактона быстрее, хоть и с меньшими выходами [17]. Он состоял в реакции смеси лактонов с аммиаком в спирте, двукратном кипячении полученной смеси продуктов с этилацетатом и несколько раз с ацетоном, в результате чего в нерастворимом осадке оставалось только производное изоалантолактона. Из упаренных этилацетатных маточных растворов путем кристаллизации из смеси спирта с хлороформом получалось производное алантолактона. Регенерация исходных лактонов из их производных, которые ошибочно были при-

няты за амиды соответствующих кислот [13, 17], осуществлялась при нагревании одновременно с перегонкой в глубоком вакууме [17, 18]. Аммиак, как было установлено [19, 20], реагирует с лактонами девясила через присоединение к двойной связи лактонного цикла по типу реакции Михаэля. Кроме аммиака также возможно присоединение лактонов к диметиламину [18], диэтиламину [21] и к морфолину [22], при этом из смеси лактонов при реакции после кристаллизации из спирта в осадок также выпадет преимущественно аминный аддукт изоалантолактона. Исходные лактоны могут быть с высоким выходом регенерированы из их аминокпроизводных [21, 23, 24]. Для этого их переводят сначала в четвертичные аммониевые соли реакцией с метилиодидом, а затем проводят мягкое разложение образовавшихся солей, перемешивая с раствором гидрокарбоната натрия.

Другой подход к получению индивидуальных лактонов из корней девясила высокого состоит в химической модификации только одного лактона из смеси при сохранении второго в неизменном виде. Как раз таким способом является реакция аллильного окисления изоалантолактона с помощью диоксида селена [25]. Диоксид селена здесь может использоваться в каталитических количествах при использовании стандартного в этих случаях кооксиданта *трет*-бутилгидропероксида. Весь имеющийся алантолактон в этих условиях не вступает в реакцию и может быть легко очищен от образующегося аллильного спирта изотелекина (**3**) с помощью хроматографии на силикагеле.

Экспериментальная часть

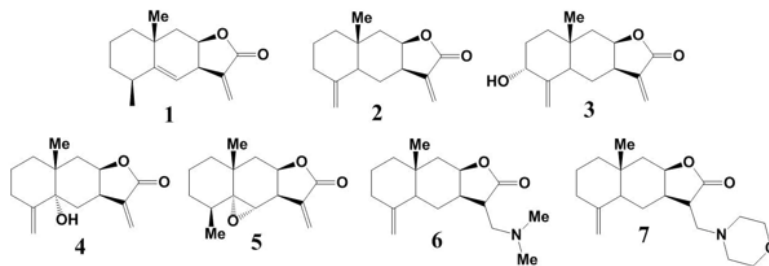
Спектры ЯМР ^1H снимали на приборах Bruker AVANCE III (рабочая частота 500.13 МГц) и Bruker DPX-200 (200.13 МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт – остаточный сигнал растворителя. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с силикагелем Merck 60 F254. Для обнаружения использовали 5% раствор фосфорномолибденовой кислоты в этаноле. Состав фракций и полученные чистые аланто- и изоалантолактон анализировали путем снятия спектров ^1H -ЯМР и сравнения с литературными данными [7]. Использовались реактивы диоксид селена («Асгос»), диметиламин 33% водный («Реахим»), морфолин («Реахим»), периодат натрия («Вектон»), метилиодид («Вектон»). Корни девясила производства «Фитофарм» (Анапа, Россия), измельчение – фракция 7 мм. Все растворители («База №1», Старая Купавна, Россия) использовались без дополнительной очистки.

Получение смеси алантолактона и изоалантолактона из девясила высокого. Корни девясила высокого 2 кг («Фитофарм», Анапа, степень измельчения 7 мм) экстрагируют 2 раза по 8 л хлороформа в течение 3 дней при комнатной температуре. После отгона растворителя получают бурое вязкое масло с сильным запахом. Вакуумируют при 0.2 мм Нг, получают 101.4 г экстракта в виде влажных кристаллов. Растворяют в небольшом количестве бензола и фильтруют насухо через слой силикагеля 10 см при пониженном давлении в широкой воронке Шотта. Смывают бензолом до бесцветных смывов. После отгонки бензола получают желтое прозрачное масло. Вакуумируют в 2 л колбе (вначале возможно образование пены) при 0.2 мм Нг. При этом следует периодически отсоединять вакуумный насос и перемешивать палочкой содержимое колбы. Проводят вакуумирование до получения сухого белого остатка, масса 79.7 г (выход 3.99%), который представляет собой почти чистую смесь алантолактона и изоалантолактона.

Методы выделения лактонов девясила в индивидуальном виде:

Метод А. Выделение изоалантолактона путем кристаллизации из разбавленного метанола. Профильтрованный через силикагель хлороформный экстракт корней девясила массой 78.3 г помещают в 2 л колбу и прибавляют 538 мл 75% (v/v) метанола, нагревают при энергичном перемешивании на водяной бане 80 °С до кипения метанола, аккуратно декантируют с нерастворившегося желтого масла на дне, метанольный раствор снова доводят до кипения на водяной бане и дают медленно охладиться вместе с нагретой водяной баней до комнатной температуры в течение ночи. Выпавшие длинные кристаллы отфильтровывают и сушат на воздухе. Процедуру повторяют до получения чистого по ЯМР изоалантолактона. Для первых кристаллизаций следует использовать соотношение растворитель/вещество, равное 6.8/1, для последующих – использовать соотношение 13.75/1 (табл. 1).

Конечный выход чистого изоалантолактона (**2**) 15.4 г. Длинные белые кристаллы, т.пл. = 111–112 °С, со слабым приятным запахом, полностью без вкуса. В качестве растворителя для перекристаллизации может использоваться отогнанный при пониженном давлении маточник, однако требуется в этом случае каждый раз проверять концентрацию метанола по ареометру (плотность раствора должна быть 0.875 г/мл), при необходимости добавляя воду или метанол.



Сесквитерпеновые лактоны девясила и их продукты окисления. 1 – Алантолактон, 2 – изоалантолактон, 3 – изотелекин, 4 – телекин, 5 – эпоксиалантолактон, 6 – аддукт изоалантолактона и диметиламина, 7 – аддукт изоалантолактона и морфолина

Таблица 1. Кристаллизация изоалантолактона из водного метанола

Перекристаллизация	Масса исходная, г	Объем растворителя	Конечное содержание изоалантолактона
1	78.3	540 мл 75% MeOH	57% изоалантолактон
2	47.8	330 мл 75% MeOH	67% изоалантолактон
3	40.5	280 мл 75% MeOH	75% изоалантолактон
4	31.5	440 мл 75% MeOH	94% изоалантолактон
5	17.1	235 мл 75% MeOH	100% изоалантолактон

Метод Б. Выделение алантолактона методом очистки на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра. Силикагель 200 г смешивают с раствором 10 г AgNO_3 в 350 мл воды. Полученную смесь в темноте перемешивают вращением колбы на роторном испарителе без вакуума, затем отгоняют воду при пониженном давлении при температуре водяной бани 70°C до тех пор, пока не прекратится испарение воды в виде фонтанов, затем температуру поднимают до 90°C и мешают вращением на роторном испарителе еще 2 ч. Полученный сорбент используют по возможности в тот же день. Заполненную колонку оборачивают фольгой для защиты от прямого света. Часть смеси лактонов 19.9 г, из которой был частично откристаллизован изоалантолактон (Метод А), растворяют в минимальном количестве бензола и наносят на колонку. Элюируют в системе петролейный эфир : бензол 1 : 1, затем чистым бензолом, бензол : этилацетат 9 : 1, бензол : этилацетат 1 : 1. Состав фракций контролируют по ^1H -ЯМР. Первым элюируется чистый алантолактон (1) 10.5 г, далее его смесь с изоалантолактоном и изоалантолактон (2). Раствор полученного алантолактона (1) затем для избавления от примеси соли серебра следует профильтровать через небольшой слой оксида алюминия.

Метод В. Выделение изоалантолактона через аддукт с диметиламино. Смесь лактонов 76 г от экстракции 2 кг корней девясила растворяют в 250 мл 96% этанола, прибавляют 45 мл 33% водного диметиламина, дают кристаллизаться в течение ночи при комнатной температуре. На следующий день отфильтровывают 24.5 г кристаллов, жидкий остаток упаривают, растворяют его в 100 мл метанола и снова кристаллизуют, получая еще 7.07 г кристаллов конъюгата изоалантолактона с диметиламино. Жидкий остаток снова упаривают, растворяют в 80 мл метанола и дают кристаллизаться при 4°C , получая третью порцию продукта – 4.75 г. Объединенные порции 36.3 г в 1 л колбе смешивают с 150 мл этилацетата и добавляют CH_2Cl_2 до полного растворения. К раствору прибавляют 16.5 мл метилйодида, смесь быстро мутнеет, давая осадок по всему объему. Перемешивают 2 ч, после чего прибавляют 500 мл насыщенного раствора NaHCO_3 и перемешивают ночь. Органический слой сушат над безводным Na_2SO_4 . Отгоняют растворитель и получают 26.1 г изоалантолактона (2) в виде белого твердого вещества.

Метод Г. Выделение изоалантолактона через аддукт с морфолином. В колбу помещают 78.5 г смеси лактонов, растворяют в 320 мл метанола при легком нагревании, добавляют 50 мл морфолина и оставляют на ночь. На следующий день отфильтровывают выпавшие светло-желтые кристаллы, промывают на фильтре 40 мл метанола, сушат, получают 31.0 г конъюгата изоалантолактона с морфолином. Маточный раствор упаривают, остаток растворяют в 135 мл метанола и оставляют на сутки при 4°C . Выпавшие кристаллы отфильтровывают и 2 раза промывают по 10 мл холодного метанола, получают еще 7.14 г вещества. Дальнейшая кристаллизация остатка дает смесь продуктов реакции. Обе части кристаллов объединяют, получая 38.14 г

чистого по ЯМР конъюгата изоалантолактона с морфолином. Полученное вещество смешивают со 100 мл этилацетата и 100 мл CH_2Cl_2 , после полного растворения прибавляют 15 мл метилиодида, перемешивают 6 ч, после чего к реакционной смеси добавляют 800 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 и перемешивают в течение суток. К выпавшему осадку добавляют хлороформ и перемешивают до полного растворения, что может занять несколько суток. В воронке отделяют прозрачный органический слой и сушат над безводным Na_2SO_4 . Отгоняют растворитель и получают 27.5 г изоалантолактона (**2**) в виде слегка желтого твердого вещества. Вещество может быть перекристаллизовано из 378 мл 70% метанола для получения в виде крупных бесцветных кристаллов. Аналогично через реакцию с метилиодидом регенерируются лактоны **1** и **2** в виде смеси из маточника.

Метод Д. Выделение алантолактона через окисление с диоксидом селена и перекисью водорода. В колбе в 300 мл *трет*-бутанола при 45 °С на водяной бане и магнитной мешалке растворяют 79.7 г смеси лактонов, вносят 1 г диоксида селена, маленькими порциями прибавляют 55 мл 33% H_2O_2 на протяжении 6 часов, после чего охлаждают и оставляют на ночь при 4 °С. Отгоняют досуха растворитель при пониженном давлении (без сильного нагрева), вакуумируют. Растворяют в небольшом количестве бензола и наносят на колонку на 840 мл силикагеля. Элюируют сначала бензолом, затем смесью бензол : ЭА 9 : 1, бензол : ЭА 8 : 2, CHCl_3 : ацетон 8 : 2, CHCl_3 : изопропанол 1 : 1. Состав фракций контролируют по ТСХ в системе бензол : ЭА 9 : 1, Rf (алантолактон, **1**) 0.71, Rf (эпоксиалантолактон, **5**) 0.43, Rf (телекин, **4**) 0.32, Rf (изотелекин, **3**) 0.16 или в системе бензол : ЭА 5 : 1, Rf (телекин, **4**) 0.46, Rf (изотелекин, **3**) 0.21. Смешанные фракции рехроматографируют. Получают алантолактон (**1**) 22.50 г в виде белого твердого вещества, эпоксиалантолактон (**5**) 12.65 г белое твердое вещество, телекин (**4**) – 5.87 г кристаллизующееся вязкое масло, изотелекин (**3**) – 39.02 г в виде желтого твердого вещества, остальное – продукты сверхокисления и нелактонные вещества.

Метод Е. Выделение алантолактона через окисление с диоксидом селена и трет-бутилгидропероксидом. В колбе растворяют в 350 мл неперегнанного CH_2Cl_2 при перемешивании 78.9 г смеси лактонов, вносят 2 г диоксида селена и 40 мл 70% t-BuOOH. Перемешивают 5 ч при комнатной температуре и оставляют на ночь при 4 °С. Отгоняют растворитель при пониженном давлении, вакуумируют до отсутствия запаха t-BuOOH. Очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют сначала бензолом, затем бензол : ЭА 19 : 1, бензол : ЭА 9 : 1, бензол : ЭА 8 : 2, бензол : ацетон 8 : 2, бензол : изопропанол 1 : 1. Получают алантолактон (**1**) 33.9 г желтое масло, быстро застывающее в белое твердое вещество, телекин (**4**) 7.4 г, изотелекин (**3**) 31.6 г, остальное продукты сверхокисления и нелактонные вещества.

Метод Ж. Выделение алантолактона через окисление с диоксидом селена и периодатом калия. В колбе растворяют в 400 мл диоксана и 200 мл воды при интенсивном перемешивании 82.5 г смеси лактонов, вносят 2 г диоксида селена и 83.5 г сухого KIO_4 . Смесь нагревают на водяной бане до 45 °С и интенсивно перемешивают в течение 7 дней. После чего отфильтровывают непрореагировавший KIO_4 , отгоняют основную часть диоксана при пониженном давлении, к остатку прибавляют CH_2Cl_2 и промывают в воронке сначала водой, затем слабым раствором NaHCO_3 , рассолом и отгоняют растворитель при пониженном давлении. Очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя сначала бензолом, затем смесью бензол : этилацетат 9 : 1, бензол : ацетон 9 : 1, бензол : ацетон 8 : 2, бензол : изопропанол 1 : 1. Получают алантолактон (**1**) – 34.2 г, телекин (**4**) – 8.1 г, изотелекин (**3**) – 34.4 г.

Обсуждение результатов

Корневища девясила высокого содержат два вещества из класса сесквитерпеновых лактонов в довольно больших количествах – алантолактон (**1**) и изоалантолактон (**2**). Каждый содержится в концентрации порядка 2% от сухой массы корневищ. Это, учитывая коммерческую доступность и невысокую цену, делает корни девясила многообещающим кандидатом для выделения этих двух лактонов. Они могут использоваться для создания на их основе лекарственных препаратов как индивидуальные вещества, так и для синтеза новых биологически активных веществ.

Однако на практике у исследователей при попытке препаративного выделения индивидуальных лактонов девясила возникают значительные затруднения. Это связано первую очередь с тем, что оба основных лактона **1** и **2** девясила имеют почти идентичные свойства, что сильно затрудняет их разделение. Данная статья призвана продемонстрировать несколько методов препаративного выделения лактонов из корней девясила высокого, пригодных для практического применения.

Задачу выделения индивидуальных лактонов девясила можно разбить на три этапа: 1) экстракция из корней девясила; 2) выделение из экстракта смеси алантолактона **1** и изоалантолактона **2** в виде лактонной фракции; 3) непосредственно выделение из лактонной фракции индивидуальных лактонов.

Для получения алантолактона и изоалантолактона нами были использованы корни девясила производства «Фитофарм». Корневища девясила высокого из этого источника не является рекордсменом по содержанию сесквитерпеновых лактонов в процентах от сухой массы, однако он практически не содержит других лактонов, помимо аланто- и изоалантолактона, что облегчает их выделение. Корни девясила производства «Фитофарм» использовались без дополнительного измельчения, поскольку сильное измельчение значительно не повышает выход лактонов в экстракте, но создает затруднения при фильтрации с осадка. Для экстракции был использован хлороформ, как оптимальный для этой цели. Во-первых, в малополярных петролейном эфире или гексане алантолактон и изоалантолактон при комнатной температуре слаборастворимы, а в более полярных этилацетате или этаноле экстрагируется дополнительно также значительное количество балластных веществ. Во-вторых, хлороформ – один из наиболее дешевых для лабораторного применения растворителей.

Перед непосредственным разделением алантолактона (**1**) и изоалантолактона (**2**) стояла задача получить лактонную фракцию из экстракта корней девясила, которая не содержит других лактонов или содержит их в минимальном количестве. Этого можно достичь, например хроматографией цельного экстракта на силикагеле, однако полноценная предварительная хроматография занимает много времени и приводит к большому расходу сорбента и растворителей. Кроме того, в препаративном варианте такую очистку затрудняют два обстоятельства: эфирное мало в экстракте действует как полярный растворитель и ведет к ускоренному движению веществ по колонке, также часть веществ в экстракте при контакте с петролейным эфиром выпадает внутри колонки в твердом виде, что вынуждает вести элюирование сразу более полярными растворителями. Поэтому нами предложено следующее решение: сперва следует избавиться от летучего эфирного масла тщательным вакуумированием. Затем – от более полярных веществ путем предварительного фильтрования экстракта через слой силикагеля. Использование в качестве элюента чистого бензола позволяет отделить липофильные аланто- и изоалантолактон от сорбированных на силикагеле полярных примесей. Итоговая лактонная фракция экстракта корней девясила пригодна для получения индивидуальных лактонов без дополнительной очистки.

На основе известного из литературных источников [6, 7] способа хроматографического разделения лактонов девясила высокого нами был получен чистый алантолактон. Данный метод основан на использовании для хроматографии колонки, наполненной силикагелем с импрегнированным нитратом серебра – сорбентом, позволяющим осуществлять разделение изомеров по положению двойной связи. Однако он имеет ряд недостатков. А именно: для полного разделения требуется большое соотношение сорбент/вещество; сорбент не поддается регенерации и эффективно может использоваться только один раз, что ведет к большому расходу соли серебра. Как следствие, такой метод плохо поддается масштабированию для получения алантолактона и изоалантолактона в препаративных количествах. Описанный в литературе [13, 14] способ отделения алантолактона путем вакуумной перегонки при проверке нами признан нерабочим, так как не дает в итоге достаточно чистого вещества. К тому же при таком способе значительная часть лактонов теряется из-за осмоления при высокой температуре. Также нерабочим оказался и другой литературный способ [12] отделения алантолактона – перегонка с водяным паром. Хотя изначально алантолактон и изоалантолактон были описаны как горькие начала корня девясила, ни тот, ни другой в чистом виде не обладают горьким вкусом. По-видимому, сильный горький вкус корню девясила придает летучее желтое эфирное масло.

На практике оказалось, что удобнее не использовать для разделения лактонов девясила хроматографию на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра, а получать из экстракта по отдельности либо алантолактон, либо изоалантолактон. В зависимости от того, какой из них требуется, следует использовать различные методики. Сравнение полученных выходов аланто- и изоалантолактона при использовании различных методик приведено в таблице 2. Так, изоалантолактон в чистом может быть получен из лактонной фракции кристаллизацией из полярных растворителей. Из исследованных нами полярных растворителей лучшим показал себя 75% водный метанол. Для получения изоалантолактона без примеси алантолактона следует провести 4–5-кратную кристаллизацию, причем на последних кристаллизациях следует использо-

вать соотношение растворитель/смесь лактонов равное 13.75/1. При меньших соотношениях растворитель/смесь лактонов требуется гораздо большее количество кристаллизаций. Такой способ не позволяет выделить весь имеющийся изоалантолактон, но он подходит в нескольких случаях: 1) потенциальном получении изоалантолактона в больших масштабах; 2) частичном избавлении от изоалантолактона из смеси перед выделением алантолактона; 3) конечной перекристаллизации для получения изоалантолактона в виде крупных кристаллов. Для выделения чистого изоалантолактона возможна также многократная кристаллизация из абсолютного этанола [11] или ацетонитрила, но она не имеет практического преимущества. Описанные ранее способы получения кристаллизацией из смеси бензол : петролейный эфир [26] или из петролейного эфира [27] не работают и не подходят для выделения лактонов девясила в чистом виде.

Кристаллизация изоалантолактона из водного метанола является простым способом его получения, однако такой метод требует большого количества времени (сутки на каждую кристаллизацию) и затрат растворителей. Два более быстрых способа получения чистого изоалантолактона – его выделение через образование промежуточных аминопроизводных (6, 7). Нами было проведено выделение изоалантолактона из лактонной фракции через образование промежуточного аддукта по типу реакции аза-Михаеля с двумя доступными аминами – диметиламином (6) и морфолином (7). Оптимальным растворителем для кристаллизации образующихся аддуктов оказался метанол, поскольку ранее нами было замечено, что конъюгаты сесквитерпеновых лактонов с аминами, как правило, обладают низкой растворимостью в метаноле и выпадают в осадок, в то время как исходные лактоны и амины хорошо растворимы. Разделение в этих двух методах основано на факте меньшей растворимости в спирте аддуктов изоалантолактона с диметиламином (6) или морфолином (7) чем аналогичных аддуктов алантолактона. Далее изоалантолактон (2) количественно регенерируется из откристилизованного аддукта путем конверсии в четвертичную соль аммония через реакцию с метилиодидом и ее разложения в основной среде. Выход регенерированного лактона зависит от времени разложения образовавшейся четвертичной соли в основной среде. Он ощутимо снижается при перемешивании в течение суток, как рекомендуют в литературе [23], для полной конверсии требуется перемешивание с раствором Na_2CO_3 в течение нескольких дней. Не было обнаружено особой разницы в количестве кристаллизующихся аминопроизводных при использовании диметиламина и морфолина, но в последнем случае не развивалась со временем интенсивная темная окраска раствора.

Селективное окисление изоалантолактона диоксидом селена в более полярный лактон со спиртовой группой – удобный метод, позволяющий выделить из лактонной фракции практически весь имеющийся алантолактон. Процедуру проводят с использованием каталитических количеств диоксида селена с избытком *трет*-бутилгидропероксида. В этих условиях изоалантолактон быстро окисляется в другой сесквитерпеновый лактон изотелекин (3), в качестве примеси образуется его изомер по положению спиртовой группы – лактон телекин (4). Алантолактон как более неполярный компонент смеси легко отделяется хроматографически. В качестве соокислителя можно использовать и более доступную 30% перекись водорода. В этом случае ее следует добавлять маленькими порциями, поскольку ее избыток ведет к образованию надселенистой кислоты из селенистой, которая аналогично надкислотам из карбоновых кислот обладает эпоксилирующими свойствами. Последнее ведет к конверсии части алантолактона в эпоксиалантолактон (5), при большом избытке перекиси водорода происходит полное эпоксилирование алантолактона и затем изотелекина. В литературе описан способ окисления изоалантолактона с применением диоксида селена и гидроперита в качестве соокислителя [28]. Однако такой способ малопригоден в данном случае, поскольку в предлагаемой авторами системе растворителей происходит еще более значительное эпоксилирование всех продуктов реакции.

Таблица 2. Сравнение выходов лактонов девясила в зависимости от метода

Метод	Выход лактонов, % от сухой массы корней	
	Алантолактон	Изоалантолактон
А. Кристаллизация из водного метанола	–	0.77
Б. Хроматография на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра	1.66	–
В. Кристаллизация аддуктов с диметиламином	–	1.31
Г. Кристаллизация аддуктов с морфолином	–	1.38
Д. Окисление смеси лактонов диоксидом селена и перекисью водорода	1.13	–
Е. Окисление смеси лактонов диоксидом селена и <i>трет</i> -бутилгидропероксидом	1.70	–
Ж. Окисление смеси лактонов диоксидом селена и периодатом калия	1.71	–

Еще один предложенный нами вариант селективного удаления изоалантолактона из его смеси с алантолактоном состоит в его окислении при использовании диоксида селена совместно с не традиционным для него соокислителем периодатом натрия. Последний обычно используется как реагент для расщепления связи у виц-диолов, в то время как сам по себе он не обладает способностью к окислению одиночных спиртовых групп. Диоксид селена совместно с ним также реагирует с изоалантолактоном, давая смесь изотелекина (3) и телекина (4) как основных продуктов. Для проведения реакции таким способом следует использовать систему растворителей диоксан/вода, способную растворять как лактоны девясила, так и периодат калия. В данном случае реакция проходит медленнее, чем в случае использования в качестве соокислителя перекиси водорода или *трет*-бутилгидропероксида, что связано с низкой растворимостью периодата калия в реакционной среде. Так, спустя неделю реакции при комнатной температуре, происходит конверсия лишь половины (по $^1\text{H-NMR}$) имеющегося изоалантолактона (2). Поэтому для полной конверсии изоалантолактона (2) в изотелекин (3) реакцию следует проводить при легком нагревании (45 °C). С другой стороны, такой метод окисления дает меньше побочных продуктов по сравнению с предыдущими окислителями.

Выводы

Прямое одновременное выделение алантолактона и изоалантолактона из корней девясила высокого можно осуществить через хроматографию лактонной фракции экстракта на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра, однако такой метод трудоемок и ограничен в масштабировании ввиду высокой стоимости нитрата серебра. Практичнее получать из корней лактоны девясила по отдельности. В зависимости от потребности либо в алантолактоне, либо в изоалантолактоне рекомендуется использовать разные методы получения целевого лактона. Выделение алантолактона в препаративных количествах рекомендуется проводить через предварительное окисление изоалантолактона в смеси диоксидом селена в присутствии *трет*-бутилгидропероксида или периодата калия. Изоалантолактон удобнее выделять через кристаллизацию смеси морфолиновых производных смеси лактонов девясила из метанола. Кристаллизация смеси лактонов из 75% метанола позволяет получить только часть из имеющегося в экстракте изоалантолактона, однако в перспективе подходит для использования в больших объемах.

Список литературы

1. Fischer N.H., Olivier E.J., Fischer H.D. The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 1979. Vol. 38. Pp. 47–408. DOI: 10.1007/978-3-7091-8548-3_2.
2. Wu Q.-X., Shi Y.-A., Jia Z.-J. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family // Nat. Prod. Rep. 2006. Vol. 23. Pp. 699–734. DOI: 10.1039/B606168K.
3. Chu H., Smith J.M., Felding J., Baran P.S. Scalable Synthesis of (-)-Thapsigargin // ACS Cent. Sci. 2017. Vol. 3. N1. Pp 47–51. DOI: 10.1021/acscentsci.6b00313.
4. Amara Z., Bellamy J.F.B., Horvath R., Miller S.J., Beeby A., Burgard A., Rossen K., Poliakoff M., George M.G. Applying green chemistry to the photochemical route to artemisinin // Nature Chemistry. 2015. Vol. 7. Pp. 489–495. DOI: 10.1038/nchem.2261.
5. Sharma M. Separation of Isoalantolactone and Alantolactone in *Inula racemosa* root by RP-HPLC // Der Pharmacia Sinica. 2011. Vol. 2. N6. Pp. 6–10.
6. Ohta Y., Niels H.A., Liu C.-B. Sesquiterpene constituents of two liverworts of genus *diplophyllum*: Novel eudesmanolides and cytotoxicity studies for enantiomeric methylene lactones // Tetrahedron. 1977. Vol. 33. Pp. 617–628. DOI: 10.1016/0040-4020(77)80301-3.
7. Klochkov S.G., Afanas`eva S.V., Pushin A.N. Acidic isomerisation of alantolactone derivatives // Chemistry of Natural Compounds. 2006. Vol. 42. N4. Pp. 400–406. DOI: 10.1007/s10600-006-0166-7.
8. Patent 102558120A (CN). Method for preparing alantolactone and isoalantolactone simultaneously / F. Li, D. Liu. 2012.
9. Dumas H. Bemerkung über die Zusammensetzung einiger organischer Substanzen // Annalen der Pharmacie. 1835. Vol. 15. N2. Pp. 158–160. DOI: 10.1002/jlac.18350150204.
10. Gerhardt C. Ueber das Helenin // Journal für Praktische Chemie. 1840. Vol. 20. N1. Pp. 47–56. DOI: 10.1002/prac.18400200103.
11. Kallen J. Ueber Helenin und Alantkampher // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1873. Vol. 6. N2. Pp. 1506–1509. DOI: 10.1002/cber.187300602184.
12. Kallen J. Ueber Helenin und Alantkampher // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1876. Vol. 9. N1. Pp. 154–157. DOI: 10.1002/cber.18760090148.
13. Bredt J., Posth W. Ueber das Alantolacton (Helenin) // Justus Liebigs Annalen der Chemie. 1895. Vol. 285. N3. Pp. 349–384. DOI: 10.1002/jlac.18952850306.

14. Ruzicka L., van Melsen J.A. Hohere Terpenverbindungen XLV. Zur Kenntnis des Alantolactons und des Iso-alantolactons // *Helv. Chim. Acta.* 1931. Vol. 14. N1. Pp. 397–410. DOI: 10.1002/hlca.19310140136.
15. Sprinz J. Ueber Isoalantolacton, ein bei der Darstellung des Alantolactons erhaltenes Nebenproduct // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 1901. Vol. 34. N1. Pp. 775–781. DOI: 10.1002/cber.190103401131.
16. Marshall J.A., Cohen N. The Structure of Alantolactone // *J. Org. Chem.* 1964. Vol. 29. N12. Pp. 3727–3729. DOI: 10.1021/jo01035a527.
17. Hansen K.F.W. Über Bitterstoffe aus der Alantwurzel (Vorläufige Mitteilung) // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series).* 1931. Vol. 64. N1. Pp. 67–71. DOI: 10.1002/cber.19310640111.
18. Wunderlich W. Isoalantolacton-Reindarstellung // *J. Prakt. Chemie.* 1959. Vol. 9. N3–4. P. 107. DOI: 10.1002/prac.19590090304.
19. Ruzicka L., Pieth P. Polyterpene und Polyterpenoide LV. Zur Kenntnis der Alantolactone // *Helv. Chim. Acta.* 1931. Vol. 14. Pp. 1090–1103. DOI: 10.1002/hlca.19310140519.
20. Steele J.W., Stenlake J.B., Williams W.D. Adducts of Alantolactone and isoAlantolactone with Bases // *J. Chem. Soc.* 1959. Pp. 2627–2628. DOI: 10.1039/JR9590002627.
21. Frechet J.M.J., Hagen A.J., Benzra C., Cheminat A. Polymeric separation media: binding of α -unsaturated carbonyl compounds to insoluble resins through Michael additions or chelation of derivatives // *Pure and Applied Chemistry.* 1982. Vol. 54. N11. Pp. 2181–2188. DOI: 10.1351/pac198254112181.
22. Srivastava S.C., Mehra M.M., Trivedi G.K., Bhattacharyya S.C. Separation of Alantolides & Some Reactions of Alantolactone // *Indian J. Chem.* 1971. Vol. 9. Pp. 512–514.
23. Srivastava S.C., Paknikar S.K., Bhattacharyya S.C. A Simple Procedure for the Regeneration of α -Methylene- γ -lactones from the Amine-adducts // *Indian J. Chem.* 1970. Vol. 8. N2. Pp. 201–202.
24. Lima P.D.D.B., Garcia M., Rabi J.A. Selective Extraction of α -Methylene- γ -Lactones. Reinvestigation of Vanillosmopsis erythropappa // *J. Nat. Prod.* 1985. Vol. 48. N6. Pp. 986–988. DOI: 10.1021/np50042a020.
25. Ma Y.-Y., Zhao D.-G., Gao K. Structural Investigation and Biological Activity of Sesquiterpene Lactones from the Traditional Chinese Herb *Inula racemosa* // *J. Nat. Prod.* 2013. Vol. 76. N4. Pp. 564–570. DOI: 10.1021/np300742d.
26. Патент 727646 (СССР). Способ получения алантолактона / Н.В. Плеханова, С.А. Луговская, Г.П. Федорченко. 1980.
27. Патент №2056856 (РФ). Способ получения средства, обладающего противоопухолевой активностью / В.Г. Евдошенко, С.А. Луговская, Ю.В. Немальцев, О.А. Белова. 1996.
28. Hussain S., Sharma M. Selective Oxygenation and Plant-Growth Regulatory Activity of Sesquiterpene Lactones // *Journal of Physical Science.* 2010. Vol. 21. N2. Pp. 99–107.

Поступила в редакцию 6 декабря 2018 г.

После переработки 14 апреля 2020 г.

Принята к публикации 16 июня 2020 г.

Для цитирования: Семаков А.В., Клочков С.Г. Способы препаративного выделения изоалантолактона и алантолактона из корней девясила высокого // *Химия растительного сырья.* 2020. №3. С. 145–154. DOI: 10.14258/jcrpm.2020034681.

Semakov A.V.*, Klochkov S.G. METHODS OF PREPARATIVE ISOLATION OF ISOALANTHOLACTONE AND ALANTHOLACTONE FROM ELECAMpane ROOT

Institute of Physiologically Active Substances RAS, Severny pr., 1, Chernogolovka, 142432 (Russia),
e-mail: L_vok@list.ru

Alantolactone and isoalantolactone accumulate in large quantities in elecampane (*Inula helenium* L.) roots, however, their isolation in individual states is difficult due to the same chromatographic mobility. This work presents various working methods for producing alantolactone and isoalantolactone as individual substances from elecampane root in multigram quantities. Although alantolactone and isoalantolactone can be isolated simultaneously when separated on silica gel with impregnated silver nitrate, it is more practical to obtain alantolactone or isoalantolactone from the extract of elecampane roots separately. Pure isoalantolactone can be isolated by repeated crystallization from 75% aqueous methanol. Another, faster, method of producing isoalantolactone is to react a mixture of elecampane lactones with dimethylamine or morpholine. Isoalantolactone in the form of an adduct with an amine is readily separated by crystallization and then regenerated through the preparation of a quaternary ammonium salt. Alantolactone is conveniently produced in large quantities through the oxidation of isoalantolactone in a mixture of selenium dioxide to more polar lactones, which are separated chromatographically. Hydrogen peroxide, t-butyl hydroperoxide or potassium periodate can be used as co-oxidizing agents.

Keywords: isoalantholactone, alantolactone, sesquiterpene lactones, isolation.

References

1. Fischer N.H., Olivier E.J., Fischer H.D. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1979, vol. 38, pp. 47–408. DOI: 10.1007/978-3-7091-8548-3_2.
2. Wu Q.-X., Shi Y.-A., Jia Z.-J. *Nat. Prod. Rep.*, 2006, vol. 23, pp. 699–734. DOI: 10.1039/B606168K.
3. Chu H., Smith J.M., Felding J., Baran P.S. *ACS Cent. Sci.*, 2017, vol. 3, no. 1, pp. 47–51. DOI: 10.1021/acscentsci.6b00313.
4. Amara Z., Bellamy J.F.B., Horvath R., Miller S.J., Beeby A., Burgard A., Rossen K., Poliakoff M., George M.G. *Nature Chemistry*, 2015, vol. 7, pp. 489–495. DOI: 10.1038/nchem.2261.
5. Sharma M. *Der Pharmacia Sinica*, 2011, vol. 2, no. 6, pp. 6–10.
6. Ohta Y., Niels H.A., Liu C.-B. *Tetrahedron*, 1977, vol. 33, pp. 617–628. DOI: 10.1016/0040-4020(77)80301-3.
7. Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Pushin A.N. *Chemistry of Natural Compounds*, 2006, vol. 42, no. 4, pp. 400–406. DOI: 10.1007/s10600-006-0166-7.
8. Patent 102558120A (CN). 2012.
9. Dumas H. *Annalen der Pharmacie*, 1835, vol. 15, no. 2, pp. 158–160. DOI: 10.1002/jlac.18350150204.
10. Gerhardt C. *Journal für Praktische Chemie*, 1840, vol. 20, no. 1, pp. 47–56. DOI: 10.1002/prac.18400200103.
11. Kallen J. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1873, vol. 6, no. 2, pp. 1506–1509. DOI: 10.1002/cber.187300602184.
12. Kallen J. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1876, vol. 9, no. 1, pp. 154–157. DOI: 10.1002/cber.18760090148.
13. Bredt J., Posth W. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1895, vol. 285, no. 3, pp. 349–384. DOI: 10.1002/jlac.18952850306.
14. Ruzicka L., van Melsen J.A. *Helv. Chim. Acta*, 1931, vol. 14, no. 1, pp. 397–410. DOI: 10.1002/hlca.19310140136.
15. Sprinz J. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1901, vol. 34, no. 1, pp. 775–781. DOI: 10.1002/cber.190103401131.
16. Marshall J.A., Cohen N. *J. Org. Chem.*, 1964, vol. 29, no. 12, pp. 3727–3729. DOI: 10.1021/jo01035a527.
17. Hansen K.F.W. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 1931, vol. 64, no. 1, pp. 67–71. DOI: 10.1002/cber.19310640111.
18. Wunderlich W. *J. Prakt. Chemie*, 1959, vol. 9, no. 3–4, p. 107. DOI: 10.1002/prac.19590090304.
19. Ruzicka L., Pieth P. *Helv. Chim. Acta*, 1931, vol. 14, pp. 1090–1103. DOI: 10.1002/hlca.19310140519.
20. Steele J.W., Stenlake J.B., Williams W.D. *J. Chem. Soc.*, 1959, pp. 2627–2628. DOI: 10.1039/JR9590002627.
21. Frechet J.M.J., Hagen A.J., Benezra C., Cheminat A. *Pure and Applied Chemistry*, 1982, vol. 54, no. 11, pp. 2181–2188. DOI: 10.1351/pac198254112181.
22. Srivastava S.C., Mehra M.M., Trivedi G.K., Bhattacharyya S.C. *Indian J. Chem.*, 1971, vol. 9, pp. 512–514.
23. Srivastava S.C., Paknikar S.K., Bhattacharyya S.C. *Indian J. Chem.*, 1970, vol. 8, no. 2, pp. 201–202.
24. Lima P.D.D.B., Garcia M., Rabi J.A. *J. Nat. Prod.*, 1985, vol. 48, no. 6, pp. 986–988. DOI: 10.1021/np50042a020.
25. Ma Y.-Y., Zhao D.-G., Gao K. *J. Nat. Prod.*, 2013, vol. 76, no. 4, pp. 564–570. DOI: 10.1021/np300742d.
26. Patent 727646 (USSR). 1980. (in Russ.).
27. Patent 2056856 (RU). 1996.
28. Hussain S., Sharma M. *Journal of Physical Science*, 2010, vol. 21, no. 2, pp. 99–107.

Received December 6, 2018

Revised April 14, 2020

Accepted June 16, 2020

For citing: Semakov A.V., Klochkov S.G. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 3, pp. 145–154. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpr.2020034681.

* Corresponding author.