

УДК 547.972

КЕМПФЕРОЛ И ЕГО ГЛИКОЗИДЫ ИЗ *EQUISETUM SILVATICUM* L. ХАНТЫ-МАНСКИЙСКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА

© В.М. Боначева*, Э.Х. Ботиров

Сургутский государственный университет ХМАО-Югры, ул. Ленина, 1,
Сургут, 628412 (Россия), e-mail: bwmbeml@mail.ru

Из надземной части *Equisetum silvaticum* L. (хвощ лесной) семейства Equisetaceae выделены три флавоноида, два из которых обнаружены в хвоще лесном впервые. Полученные соединения на основании химических превращений и результатов изучения данных ИК-, УФ-, ¹H-ЯМР и масс-спектров идентифицированы с кемпферолом, кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозил-7-О-α-L-рамнопиранозидом и кемпферол-3-О-рутинозил-7-О-рамнозидом.

Ключевые слова: *Equisetum silvaticum* (L.) Smeat – хвощ лесной, флавоноиды, кемпферол, гликозиды, агликон, β-D-глюкопиранозид, α-L-рамнопиранозид, рутинозид, β-D-галактопиранозид, гидролиз.

Введение

В последние десятилетия особым вниманием ученых пользуются растения, содержащие флавоноиды, вследствие их ценности для медицины и фармакологии как источников лекарственных средств широкого спектра действия. Они обладают антиоксидантными, противовоспалительными, капилляроукрепляющими, желчегонными, противоопухолевыми, иммуномодулирующими и другими лечебными свойствами и, что ценно, препараты, созданные на их основе, являются низкотоксичными [1, 2].

Большой интерес представляет с этой точки зрения *Equisetum silvaticum* L., содержащий некоторые ценные для исследователей вещества, но изучен недостаточно, а на территории Ханты-Мансийского автономного округа изучен впервые.

Equisetum silvaticum L. (хвощ лесной) – многолетнее травянистое растение высотой до 60 см. Распространен в лесной зоне тайги, лесотундры, лесостепи, в горнолесных поясах России, Юго-Восточной Азии, Северной Америки. Хвощ лесной чаще можно встретить на опушках лесов, вблизи водоемов, на влажных затененных местах, на заболоченных и торфяных лугах [3]. Этот вид хвоща ядовит для лошадей и крупного рогатого скота.

С давних времен хвощ лесной использовали в народной медицине как лекарственное растение, которое обладает мочегонными, противовоспалительными, противогрибковыми, диуретическими и другими полезными свойствами [4].

Раньше хвощ лесной использовали для окрашивания шерсти в серо-желтый цвет [5–6].

Хвощ лесной по распространенности, богатым сырьевым ресурсам, а также наличию в нем компонентов фенольной природы является наиболее перспективным для химико-фармакологического изучения. Этот факт говорит об актуальности исследований флавоноидов этих растений.

Экспериментальная часть

Боначева Виктория Михайловна – аспирант кафедры химии, тел. (3462) 76-28-00, e-mail: bwmbeml@mail.ru
Ботиров Эркин Хожиабарович – заведующий кафедрой химии, доктор химических наук, профессор, тел.: (3462) 76-30-91, e-mail: botirov-peri@mail.ru

Для выделения флавоноидов воздушно-сухую измельченную надземную часть хвоща лесного (700 г) пятикратно экстрагировали 85%-м этиловым спиртом при комнатной температуре. Объединенный

* Автор, с которым следует вести переписку.

экстракт сгущали в вакууме, разбавляли водой в соотношении 1 : 1 и затем последовательно обрабатывали на делительной воронке петролейным эфиром, хлороформом, этилацетатом и *n*-бутанолом. После отгонки растворителей получили 1,8 г хлороформной, 9,5 г этилацетатной и 19,5 г бутанольной фракций. Хроматографированием этилацетатной фракции на колонке (120×3 см) с силикагелем (220 г) в градиентной системе этилацетат–этанол выделили соединение 1. Вещество 1 (выход 0,2 г) элюировано смесью растворителей этилацетат – этанол в соотношении 98 : 2.

Хроматографированием части бутанольной фракции (12 г) на колонке с силикагелем (240 г) в системе растворителей этилацетат – этанол в соотношении (94 : 6) получили вещество 2 (0,45 г), а вещество 3 (выход 0,8 г) элюировано системой растворителей этилацетат – этанол (86 : 14).

Полученные вещества очищены колоночной хроматографией на полиамиде марки Woelm (Германия) в градиентной системе растворителей хлороформ – этанол.

Для установления месторасположения углеводных остатков проводили щелочной и кислотный (мягкий ступенчатый и полный) гидролиз соединений 2 и 3.

Щелочной гидролиз проводили следующим образом: навеску гликозида растворяли в 0,5%-м водном растворе гидроксида калия и гидролизовали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 ч. Раствор нейтрализовали 2%-м водным раствором серной кислоты, упаривали досуха, продукты идентифицировали методом ТСХ сравнением с подлинными образцами [7–8]. Для осуществления ступенчатого мягкого кислотного гидролиза гликозид нагревали при температуре 50–60 °С в 0,16%-м водном растворе хлороводородной кислоты. Через каждые 15 мин отбирали пробы и анализировали продукты методом ТСХ, используя стандартные образцы [9].

Полный кислотный гидролиз флавоноидных гликозидов проводили нагреванием на кипящей водяной бане с обратным холодильником раствора 10 мг вещества в 10 мл смеси 5% соляной кислоты и этанола в соотношении 1 : 1 в течение 2 ч [10]. Осадок агликона, выпавший при отгонке этанола в вакууме, отделяли фильтрованием. Фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в этаноле и углеводы анализировали методом тонкослойной хроматографии в присутствии подлинных образцов моносахаридов в системе растворителей *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (6 : 1,5 : 2,5). Пластинки проявляли смесью *n*-бутанол – вода – уксусная кислота – фосфорная кислота – анилин – дифениламин, мл (60 – 25 – 15 – 10 – 1 – 2 г), высушивали в термостате при 120 °С в течение 5 мин [11].

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord M 400 в этаноле, ИК-спектры снимали на ИК-Фурье-спектрометре IR Prestige-21. Масс-спектры снимали на хромато-масс-спектрометре Thermo Finnigan MAT 95 XP, энергия ионизации 70 эВ. Спектры ¹H-ЯМР снимали в DMSO-d₆ на приборе Bruker Avance III с рабочей частотой 500 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) в δ-шкале.

Температуры плавления определяли на столике Кофлера.

Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ. Пятна флавоноидов обнаруживали обработкой пластинок 1%-м спиртовым раствором AlCl₃. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле марки КСК 100/160 мкм.

Обсуждение результатов

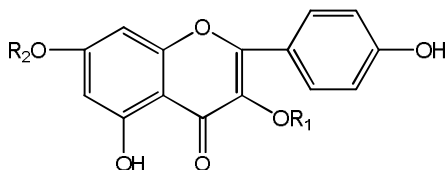
Выделенные индивидуальные соединения относятся к классу флавоноидов. Идентификацию полученных веществ проводили на основании результатов химических превращений и спектральных данных. Полученные результаты сравнивали с литературными данными.

3,5,7,4'-тетрагидроксофлавоон (кемпферол) (1) – светло-желтое кристаллическое вещество состава C₁₅H₁₀O₆, т. пл. 268–270 °С, масс-спектр (m/z): M⁺286. УФ-спектр: λ_{max} (этанол) 266,369 нм, что характерно для флавонолов; + NaOH: 281, 415 нм; + CH₃COOH 274, 387 нм, поэтому гидроксильная группа в положении 7 – свободна, так как наблюдаем батохромный сдвиг полосы II на 8 нм и полосы I на 18 нм.

В ИК-спектре вещества 1 присутствуют полосы поглощения гидроксильных групп (3323–3277 см⁻¹), карбонила γ-пирона (1662 см⁻¹), ароматических C=C-связей (1591 см⁻¹).

В спектре ПМР вещества, снятом в DMSO-d₆, проявляются сигналы протонов 3,5,7,4'-тетразамещенного флавонола: 6,19 (H, д, 2,0 Гц, H-6), 6,44 (H, д, 2,0 Гц, H-8), 6,93 (2H, д, 8,9 Гц, H-3', 5'), 8,05 (2H, д, 8,9 Гц, H-2', 6'), 12,49 (1H, уш.с, 5-OH).

Используя метод ТСХ с подлинным образцом кемпферола в системе растворителей хлороформ – этилацетат – этанол в соотношении (6 : 3 : 1), а также сравнивая спектральные данные, физико-химические свойства, соединение 1 идентифицировали с 3,5,7,4'-тетрагидроксофлавоном (кемпферолом) [12, 13]. Кемпферол из *Equisetum silvaticum* L. выделен впервые.



1. $R_1=H, R_2=H$
2. $R_1=\beta\text{-D-Galp}, R_2=\alpha\text{-L-Rhap}$
3. $R_1=\beta\text{-D-Glcp}(6\leftarrow 1)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}, R_2=\alpha\text{-L-Rhap}$

Кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозил-7-О-α-L-рамнопиранозид (2) – желтое кристаллическое соединение состава $C_{27}H_{30}O_{15}$, т.пл. 188–190 °С, масс-спектр (m/z): 286 (M^+ агликона кемпферола). УФ-спектр: λ_{\max} (этанол): 272, 359 нм. + NaOH: 277, 399 нм с уменьшением интенсивности полосы I; +AlCl₃: 276, 348, 400 нм; +CH₃COOH 267, 354 нм. Анализируя УФ-спектры, можно сделать вывод, что данное вещество относится к 3,7-ди-О-замещенным флавонолам.

В ИК-спектре соединения 2 наблюдаются полосы колебаний гидроксильных групп (3392–3219 cm^{-1}), карбонила γ-пирона (1647 cm^{-1}), гликозидных С–О связей (1006–1141 cm^{-1}) и ароматических связей.

¹H-ЯМР (δ, ДМСО-d₆): 12,6 (1H, уш.с, 5-OH), 8,06 (2H, д, 8,8 Гц, Н-2',6'), 6,95 (2H, д, 8,8 Гц, Н-3',5'), 6,80 (1H, д, 1,9 Гц, Н-8), 6,43 (1H, 1,9 Гц, Н-6), 5,53 (с, Н-1'' аномер Н-Rha), 5,47 (д, 7,3 Гц, Н-1''' аномер Н-Gal), 3,05-3,62 (м, протоны сахарной части), 1,05 (д, 6 Гц, CH₃-Rha).

Был проведен полный кислотный гидролиз 14 мг вещества 2 смесью 5% HCl - C₂H₅OH в соотношении 1 : 1 на водяной бане в течение 2 ч. Осадок агликона, выпавший при отгонке этанола в вакууме, отделяли фильтрованием, перекристаллизовали. Получили кемпферол состава C₁₅H₁₀O₆ (λ_{\max} 266, 369 нм, т. пл. 270–272 °С). Фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в этаноле и методом ТСХ в присутствии подлинных образцов обнаружили D-галактозу и L-рамнозу [ТСХ в системе n-бутанол – уксусная кислота – вода (6 : 1,5 : 2,5)].

Также провели щелочной гидролиз 10 мг вещества 0,5%-м водным раствором гидроксида калия (10 мл) на водяной бане в течение 2 ч. В результате получили кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозид и моносахарид L-рамнозу (ТСХ). Таким образом, можно сделать вывод, что в положении 7 гидроксильная группа замещена L-рамнозой, а 3-ОН гликозилирована D-галактозой.

Сигнал аномерного протона D-галактозы в спектре ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) проявляется в виде дублета с КССВ 7,3 Гц, что свидетельствует о β-конфигурации D-галактозы.

На основании проведенных химических превращений, а также сравнивая спектральные данные с литературными сведениями, мы идентифицировали вещество 2 с кемпферол-3-О-β-D-галактозил-7-О-α-L-рамнопиранозидом [14]. Кемпферол-3-О-β-D-галактозил-7-О-α-L-рамнопиранозид впервые выделен из растений рода *Equisetum* L.

Кемпферол-3-О-рутинозил-7-О-рамнозид (3) – светло-желтое кристаллическое вещество состава C₃₃H₄₀O₁₉, масс-спектр (m/z): 286 (M^+ агликона), т. пл. 147–148 °С. УФ-спектр: $\lambda_{\max}^{\text{этанол}}$ 272,361 нм. +NaOH: 277, 400 нм; +AlCl₃: 276, 350, 402 нм; +CH₃COONa: 267, 356.

ИК-спектр (cm^{-1}): 3373–3277 cm^{-1} (ОН-группы), 1654 cm^{-1} (C=O γ-пирона), 1591 cm^{-1} (ароматические C=C связи), 1100–1000 cm^{-1} (гликозидные С–О связи) и др.

¹H-ЯМР- спектр (δ, DMSO-d₆): 0,98 (д, 6,95 Гц, CH₃-рамнозы биозы), 1,13 (д, 6 Гц, CH₃-7-рамнозы), 3,05-3,87 (м, протоны углеводной части), 5,16 (д, 2,1 Гц, Н-1''' аномер Н-Rha биозы), 5,32 (д, 7,5 Гц, Н-1''' аномер Н-Glc), 5,53 (д, 2 Гц, Н-1'' аномер Н-Rha), 6,42 (Н, д, 2,0 Гц, Н-6), 6,76 (Н, д, 2,0 Гц, Н-8), 6,87 (2H, д, 8,8 Гц, Н-3', Н-5'), 8,00 (2H, д, 8,8 Гц, Н-2', Н-6'), 12,60 (уш.с, 5-OH).

В результате полного кислотного гидролиза гликозида 3 смесью 5%-й соляной кислоты и этанола в соотношении 1 : 1 получили кемпферол (4 мг), L-рамнозу и D-глюкозу.

Для установления месторасположения углеводных остатков нами был проведен щелочной и кислотный мягкий ступенчатый гидролиз данного соединения. В ходе мягкого кислотного гидролиза на первой стадии (через 15 мин) образуются дигликозид, который идентифицировали как кемпферол-3-О-глюкозид-7-О-рамнозид, т. пл. 151–153 °С, УФ-спектр: λ_{\max} 272, 359 нм и моносахарид L-рамноза [4,8]. На второй стадии (через 30 мин) образуется гликозид, т. пл. 177–179 °С, УФ-спектр: λ_{\max} 260,366 нм и моносахарид D-глюкоза (ТСХ, ИК-спектр). Сравнивая данные с литературой, мы идентифицировали его как кемпферол-7-О-рамнозид [15–16].

Также был проведен гидролиз соединения 3 в щелочной среде, методика которого описана выше. При этом было получено вещество с т. пл. 182–185 °С, УФ-спектр: λ_{\max} 266, 352 нм, которое сравнением с литературными данными идентифицировали как кемпферол-3-О-рутинозид, ранее выделенный из хвоща лесного, и моносахарид L-рамнозу [4]. Углеводный остаток идентифицировали, используя метод ТСХ, сравнением с подлинным образцом L-рамнозы.

Обобщая полученные данные, а также сравнивая спектральные данные и физико-химические свойства с литературными сведениями, соединение 3 идентифицировали с кемпферол-3-О-рутинозил-7-О-рамнозидом [4, 15–17].

Выводы

Из наземной части хвоща лесного впервые выделены известные флавоноиды: 3,5,7,4'-тетрагидроксофлавоон (кемпферол), кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозил-7-О-α-L-рамнопиранозид, а также ранее выделенный кемпферол-3-О-рутинозил-7-О-рамнозид.

Выделенные соединения идентифицированы на основании результатов химических превращений, данных УФ-, ¹H-ЯМР, ИК- и масс-спектров.

Список литературы

1. Hollman P.C.H., Feskens E.I.M., Katan M.B. The Flavonoids in cardio-vascular disease and cancer prevention // *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999. Vol. 220, no. 4, Pp. 198–202.
2. Hernandez N.E., Tereschur M.L., Abdala L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina) // *J. Ethnopharmacol.* 2000. Vol. 73, №1-2. Pp. 317–322.
3. *Flavonoids in Health and Disease*, edited by Catherine A Rice-Evans and Lester Packer, New-York, Marsel Dekker, Inc. 2003, 458 p.
4. Коломиец Н.Э., Калинин Г.И. Сравнительное исследование химического состава видов рода флоры Сибири // *Химия растительного сырья.* 2010. №1. С. 149–154.
5. Носов А. Лекарственные растения. М., 2001. 348 с.
6. Шамрук С.Г. Лекарственные растения. М., 1989. 286 с.
7. Макаров В.А., Шинкаренко А.Л., Литвиненко В.И., Ковалев И.П. Флавоноидные дигликозиды *Prunus spinosa* // *Химия природных соединений.* 1969. №5. С. 366–369.
8. Литвиненко В.И., Макаров В.А. Щелочной гидролиз флавоноидных гликозидов // *Химия природных соединений.* 1969. №5. С. 366–369.
9. Максютин Н.П., Литвиненко В.И., Ковалев И.П. Неоробинин – новый гликозид из *Cheiranthus Allioni* // *Химия природных соединений.* 1966. №6. С. 367–454.
10. Chander R.F., Harpek K.A. Identification of Saccharides in Anthcyanins and other Flavonoids // *Austral. J. Chem.* 1961. Vol. 14, N4. Pp. 586–595.
11. Методы исследования углеводов / Пер. с англ. В.А. Несмеянова; под ред. А.Я. Хорлина. М., 1975. 445 с.
12. Markham K.R. *Techniques of Flavonoid Identification.* London: Academic Press, 1982. 113 p.
13. Yuldashev M.P., Muminova B.A., Drenin A.A., Botirov E.Kh. Flavonoids from the aerial Part of *Vicia subvillosa* // *Chem. Nat. Comp.* 2007. Vol. 43. №1. Pp. 34–36.
14. Perez-Jimenez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database // *European Journal of Clinical Nutrition.* 2010. Vol. 64. Pp. 112–120.
15. Самокина О.В., Шинкаренко А.П. Кемпферол 7-рамнозид из *Aconitum orientale* // *Химия природных соединений.* 1969. №5. С. 441.
16. Yonekura-Sakakibara K., Tohge T., Niida R., Saito K. Identification of a Flavonol 7-O-Rhamnosyltransferase Gene Determining Flavonoid Pattern in Arabidopsis by Transcriptome Coexpression Analysis and Reverse Genetics // *Biological Chemistry.* 2007. №2. P. 282.
17. Запесочная Г.Г. Изучение структуры и стереохимии флавоноидных О-рамнозидов с помощью спектроскопии ПМР // *Химия природных соединений.* 1982. №5. С. 695–709.

Bonacheva V.M.* , Botirov E.Kh. KAEMPFEROL AND ITS GLYCOSIDES FROM *EQUISETUM SILVATICUM* L. SMEET HUNTS-MANSIJSKOGO OF AUTONOMOUS REGION

Surgut State Universit, Lenina st., 1, Surgut, 628412 (Russia), e-mail: bwmbeml@mail.ru

The article is devoted to the phytochemical study of Glycosides flavonoids *Equisetum silvaticum* (L.) Smeets . From the overgrown part of *Equisetum silvaticum* (L.) Smeets of the first flavonoids kaempferol, kaempferol-3-O- β -D-galactopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside and already kaempferol-3-O-rutinoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside were isolated. The resulting compounds were identified on the basis of results of chemical transformations and IR, UV, ¹H-, ¹³C-NMR and mass spectra.

Keywords: *Equisetum silvaticum* L. Smeets, flavonoids, kaempferol, glycosides, aglycone, β -D-glucopyranoside, α -L-rhamnopyranoside, rutinoside, β -D-galactopyranoside, hydrolysis.

References

1. Hollman P.C.H., Feskens E.I.M., Katan M.B. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999, vol. 220, no. 4, pp. 198–202.
2. Hernandez N.E., Tereschur M.L., Abdala L.R. *J. Ethnopharmacol.*, 2000, vol. 73, no. 1-2, pp. 317–322.
3. *Flavonoids in Health and Disease*, edited by Catherine A Rice-Evans and Lester Packer, New-York, Marsel Dekker, Inc. 2003, 458 p.
4. Kolomiets N.E., Kalinkina G.I. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2010, no. 1, pp. 149–154. (in Russ.).
5. Nosov A. *Lekarstvennye rasteniia*. [Medicinal plants]. Moscow, 2001, 348 p. (in Russ.).
6. Shamruk S.G. *Lekarstvennye rasteniia*. [Medicinal plants]. Moscow, 1989, 286 p. (in Russ.).
7. Makarov V.A., Shinkarenko A.L., Litvinenko V.I., Kovalev I.P. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1969, no. 5, pp. 366–369. (in Russ.).
8. Litvinenko V.I., Makarov V.A. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1969, no. 5, pp. 366–369. (in Russ.).
9. Maksjutina N.P., Litvinenko V.I., Kovalev I.P. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1966, no. 6, pp. 367–454. (in Russ.).
10. Chander R.F., Harpek K.A. *Austral. J. Chem.*, 1961, vol. 14, no. 4, pp. 586–595.
11. *Metody issledovaniia uglevodov*. Ed. A.Ia. Khorlina. [Research methods carbohydrates]. Moscow, 1975. 445 c. (in Russ.).
12. Markham K.R. *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Press, 1982. 113 p.
13. Yuldashev M.P., Muminova B.A., Drenin A.A., Botirov E.Kh. *Chem. Nat. Comp.*, 2007, vol. 43, no. 1, pp. 34–36.
14. Perez-Jimenez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010, vol. 64, pp. 112–120.
15. Samokina O.V., Shinkarenko A.P. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1969, no. №5, pp. 441. (in Russ.).
16. Yonekura-Sakakibara K., Tohge T., Niida R., Saito K. *Biological Chemistry*, 2007, no. 2, pp. 282.
17. Zapesochnaia G.G. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1982, no. 5, pp. 695–709. (in Russ.).

Received February 13, 2012

* Corresponding author.

