

## ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ АРАЛИЕВЫХ: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И УСТАНОВЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ

*В.И. ГРИШКОВЕЦ<sup>1</sup>, доктор химических наук;*

*В.Я. ЧИРВА<sup>1</sup>, доктор химических наук;*

*В.В. КАЧАЛА<sup>2</sup>, кандидат химических наук;*

*А.С. ШАШКОВ<sup>2</sup>, доктор химических наук*

<sup>1</sup>Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва)

Тритерпеновые гликозиды (сапонины) представляют собой один из очень многочисленных классов природных соединений и относятся к вторичным метаболитам сложного или смешанного биогенеза. Терпеноидная часть (агликон) тритерпеновых гликозидов является метаболитом мевалоновой кислоты, а углеводные части – метаболитами глюкозы или других моносахаридов [1]. Главные группы тритерпеноидов и соответственно их гликозидов представлены тетрациклическими производными рядов ланостана (А), циклоартана (В), даммарана (С) и эуфана (D), а также пентациклическими производными рядов урсана (Е), олеанана (F), лупана (G) и гопана (H) [2] (рис. 1).

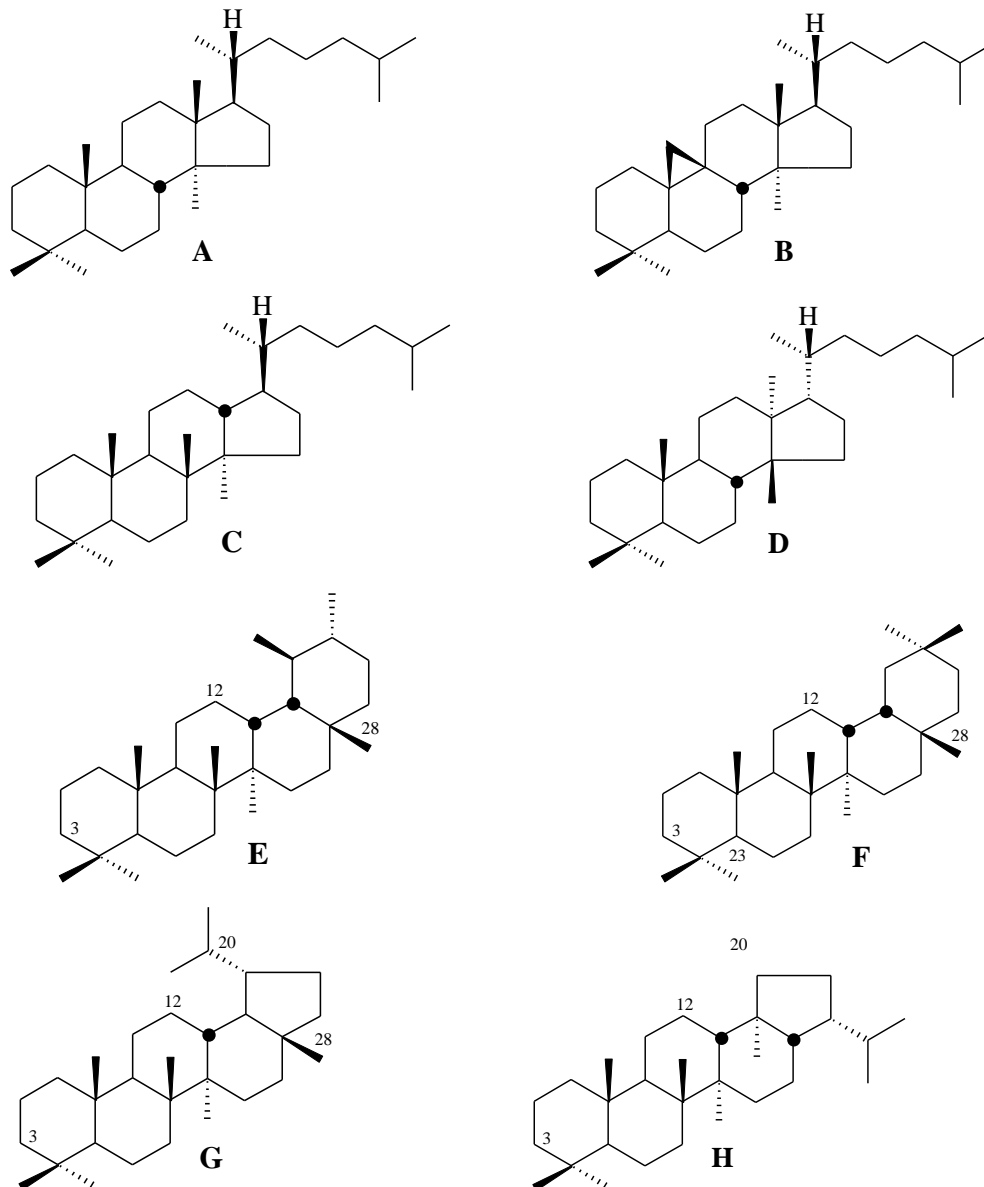


Рис. 1. Главные группы тетра- и пентациклических тритерпеноидов

Неослабевающий интерес к природным тритерпеновым гликозидам обусловлен не только чисто научными вопросами выделения и установления структур новых гликозидов, часто с необычными структурами углеводных или агликонных частей, а также использованием сведений о распространении гликозидов для решения проблем разграничения видов, родов, семейств, но и тем, что сапонины обнаруживают чрезвычайно широкий спектр биологической активности. Большинство изученных тритерпеновых гликозидов обладают тем или иным видом действия на клеточном или организменном уровне. У сапонинов обнаружены следующие виды биологической активности: антимикробная, фунгицидная, антибактериальная, антивирусная, цитотоксическая и антираковая, антимуtagenная, ихтиотоксическая, моллюскицидная, спермицидная и контрацептивная, инсектицидная, антигельминтная, диуретическая, кардиоваскулярная, противовоспалительная, антиэкссудативная, анальгетическая, иммуномодулирующая, адаптогенная, седативная, гипогликемическая, антиаллергическая и другие [3], а также аллелопатическая активность в биоценозах [4]. Кроме того, сапонины и экстракты сапониноносных растений в последнее время все шире используются в коммерческих масштабах в пищевой промышленности, сельском хозяйстве [4] и медицине [5]. Особое значение для медицины представляют выявленные у ряда тритерпеновых гликозидов, в частности, из южноамериканского растения *Quillaja saponaria*, иммуноадьювантные свойства и возможность использования в вакцинах для человека [6].

Большой интерес к тритерпеновым гликозидам растений семейства аралиевых (*Araliaceae*) во многом обусловлен уже давно завоевавшими мировое признание фармакологическими, главным образом стимулирующими центральную нервную систему, и адаптогенными свойствами препаратов на основе женьшеня (*Panax ginseng*), элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus*), заманихи (*Oplopanax elatus*), аралии (*Aralia mandshurica*), действующим началом которых, по всеобщему признанию, являются тритерпеновые гликозиды [7]. Разработанные в последнее время на основе плюща обыкновенного *Hedera helix* препараты "Prospan" и "Hedelix" успешно используются при лечении острых и хронических воспалений дыхательных путей, кашля и как спазмолитические средства. Целый ряд других растений семейства аралиевых широко применяется в народной медицине при лечении самых различных заболеваний [8], а также занимает важное место в традиционной Восточной медицине [9].

### Предварительный ТСХ-анализ экстрактов растительного сырья

Первичная качественная оценка растительного сырья на наличие и состав тритерпеновых гликозидов проводится путем одномерного хроматографирования водно-спиртовых экстрактов различных органов растений на тонких слоях силикагеля в различных хроматографических системах растворителей. Наилучшее разделение достигается в системах растворителей на основе смеси хлороформа и метанола (в различных соотношениях в зависимости от полярности разделяемых соединений), насыщенной водой, водным аммиаком или водным раствором муравьиной кислоты.

Очень часто гликозидный состав аралиевых представлен достаточно сложными смесями, включая и изомерные гликозиды с очень близкими хроматографическими подвижностями, так что использование одномерного хроматографического анализа даже в различных хроматографических системах не позволяет добиться полного разделения всех компонентов и носит лишь предварительный характер. Для аналитического разделения многокомпонентных природных смесей гликозидов единственный простой путь для существенного повышения разрешающей способности – использование двумерной ТСХ с различными системами растворителей в двух направлениях. Метод двумерной ТСХ принципиально хорошо известен и широко используется в разделении многокомпонентных смесей природных соединений, в особенности фенольных гликозидов, аминокислот, алкалоидов и целого ряда других веществ [10]. Из работ по двумерной ТСХ тритерпеновых гликозидов можно отметить статью по двумерному разделению даммарановых гликозидов *Panax trifolius* [11] и статью по использованию двумерного варианта ТСХ-анализа

природных гликозидсодержащих экстрактов с целенаправленно выбираемыми системами растворителей [12].

В качестве специфических детектирующих реагентов для одно- и двумерного ТСХ-анализов применяются спиртовые растворы фосфорновольфрамовой кислоты, иногда с добавлением ароматических альдегидов (*n*-оксибензальдегида или ванилина) для усиления окраски хроматографических зон.

ТСХ-анализ спиртовых экстрактов различных органов растений позволяет полуколичественно оценить и содержание отдельных компонентов. Хорошо известно, что ТСХ может использоваться для количественного определения компонентов хроматографируемых смесей путем оценки интенсивности окраски пятен [10] или их площади (диаметра) [13]. Первый вариант метода точнее, но требует применения специального фотометрического оборудования.

### **Подготовка растительного сырья, выделение и предварительная очистка суммы гликозидов**

Для выделения гликозидов обычно используются достаточно однотипные схемы, представляющие собой лишь несущественные видоизменения классической схемы Кочеткова-Хорлина: воздушно-сухое сырье тщательно измельчается, обрабатывается смесью бензола с хлороформом для удаления восков, жиров и прочих малополярных соединений и затем гликозиды исчерпывающе экстрагируются 80%-ным водным изопропиловым спиртом. Объединенные спиртовые экстракты упариваются досуха, остаток растворяется в бутаноле, насыщенном водой, и для удаления сильнополярных соединений (свободных моно- и олигосахаридов, солей и некоторых фенольных соединений) бутанольный слой промывается водой или водным аммиаком.

Промывка водным аммиаком в сравнении с водой дает значительно лучшие результаты, так как при этом удаляется и большая часть фенольных гликозидов, переходящих при этом в водно-аммиачный слой в виде сильнополярных фенолятов. Однако при наличии в сырье гликозидов с ацильными группами метод промывки водным аммиаком неприменим.

Следует отдельно отметить, что измельчение свежесобранного (не высушенного) растительного материала и выделение гликозидов по вышеописанной схеме приводит к существенному преобладанию в экстракте монодесмозидных гликозидов, тогда как получение экстрактов из высушенного перед измельчением сырья дает сумму гликозидов с существенным преобладанием бисдесмозидных гликозидов. Этот эффект объясняется тем, что в растительных тканях имеется специфическая гликозидаза, расщепляющая ацилгликозидную связь, что и приводит к превращению бисдесмозидных гликозидов в монодесмозидные. Хотя наличие подобных ферментов в растениях и характер их действия на нативные гликозиды известны достаточно давно [14, 15], этому факту обычно не уделялось должного внимания.

### **Разделение суммы гликозидов на фракции и индивидуальные компоненты**

Очищенная сумма тритерпеновых гликозидов подвергается препаративному хроматографическому разделению на силикагеле с использованием чаще всего градиентного элюирования нейтральной системой растворителей хлороформ-этанол или хлороформ-метанол (10:1→1:1), насыщенными водой. В результате получают индивидуальные гликозиды или узкие фракции близких по хроматографической подвижности гликозидов. Гликозидные фракции разделяют на индивидуальные соединения путем рехроматографирования на силикагеле или других сорбентах.

### **Химические методы в установлении частичной структуры выделенных гликозидов**

В настоящее время такие классические химические методы установления структуры углеводсодержащих соединений как метилирование, периодатное окисление, распад по

Смиту и ряд других [3] в связи с появлением многочисленных методик спектроскопии ЯМР используются крайне редко, поскольку требуют значительных количеств веществ. В работе современных исследователей из химических методов используют главным образом гидролитические методы для получения первичной информации о структурных единицах гликозидов и в большинстве случаев для установления предварительных структур гликозидов без определения типов и конфигураций гликозидных связей [3, 16].

Полный кислотный гидролиз используют для установления агликонного и моносахаридного состава гликозидов путем идентификации продуктов гидролиза с заведомыми образцами агликонов и моносахаридов. Частичный кислотный гидролиз – для установления последовательности соединения моносахаридных остатков в гликозидах путем идентификации или выделения продуктов частичного гидролиза [16].

Щелочной гидролиз используется для расщепления ацилгликозидной связи в исследуемых бисдесмозидных гликозидах и превращения их таким образом в монодесмозидные прогенины, которые или идентифицируют с заведомыми образцами, или подвергают дальнейшему установлению строения. Мягкий щелочной гидролиз водно-спиртовым раствором бикарбоната натрия или аммиака используют для избирательного удаления нативных сложноэфирных (обычно ацетильных) групп при сохранении ацилгликозидной связи [3]. Из прочих химических методов используют метилирование diazometаном для доказательства наличия свободных карбоксильных групп в составе гликозида в агликонной части или в виде остатка глюкуроновой кислоты [3].

#### **Ферментативные методы в установлении частичной структуры выделенных гликозидов**

В ряде случаев особенно информативными с точки зрения установления структуры оказываются методы ферментативного гидролиза. Наиболее часто в работах используется сумма гликозидаз, полученная из желудочного сока виноградной улитки *Helix pomatia* [3]. Хорошо известно, что этот ферментный препарат содержит экзогликозидазу, и способен отщеплять лишь концевые остатки  $\beta$ -глюкозы с любым типом связи. Это свойство и используется для высокоселективного отщепления концевых остатков глюкозы и выделения прогенинов более простого или же обычно известного строения. Реже используются другие суммарные ферментные препараты, такие как нарингиназа, гесперидиназа или же индивидуальные гликозидазы [3].

#### **Методы ЯМР-спектроскопии в установлении структуры выделенных гликозидов**

Предварительный анализ спектров ЯМР выполняется на основе данных вышеописанных химических методов, прежде всего данных по установлению моносахаридного состава и в ряде случаев (при наличии заведомых образцов) идентификации агликонной части.

Одномерные спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР позволяют, прежде всего, точно определить число моносахаридных остатков по количеству дублетных сигналов аномерных протонов в сравнительно низкочастотной области (4,6 – 6,3 м.д.), а по величине константы спин-спинового взаимодействия КССВ  $J_{1,2}$  и химическому сдвигу с учетом литературных данных иногда и однозначно отнести к тому или иному моносахаридному остатку. Последняя задача сравнительно легко решается лишь для остатков арабинофуранозы, рамнопиранозы и арабинопиранозы, имеющих КССВ  $J_{1,2}$  соответственно в 1.0, 1.5 и 6-7 Гц, что явно отличает их от КССВ  $J_{1,2}$  для остатков глюкопиранозы, глюкуронопиранозы, галактопиранозы и ксилопиранозы, которые имеют практически одинаковые КССВ  $J_{1,2}$  около 8 Гц. Кроме того, в низкочастотной области (выше 5 м.д.) обычно легко идентифицируются псевдотриплетные сигналы винильного протона H-12 агликонной части гликозидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амириновых рядов, протона H-16 $\beta$  (5.2-5.3 м.д.) в 16 $\alpha$ -гидроксипроизводных агликонов этих же рядов,

синглетный сигнал альдегидного протона Н-23 (около 9.8 м.д.) в гликозидах гипсогенина, а в высокопольной области (0.8–1.3 м.д.) – синглетные сигналы метильных групп у четвертичных С-атомов агликонной части. Достаточно легко также идентифицируются дублетные сигналы метильной группы (Н-6) остатков рамноз в области -1,7 м.д. с КССВ  $J_{5,6}$  6,5 Гц. В спектрах гликозидов с ацетильными группами также легко удается идентифицировать их синглетные сигналы в области 1,9–2,2 м.д. и определить число этих групп в молекуле. В ряде случаев можно идентифицировать и специфически расщепленные дублет-дублетные сигналы протонов Н-3 и Н-18 агликонных частей гликозидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амиринового рядов в области 3,0–4,3 м.д., когда они не перекрывались с сигналами скелетных протонов углеводных частей гликозида.

Скелетные протоны углеводных фрагментов (кроме вышеотмеченных аномерных протонов и протонов Н-6 остатков рамноз) находятся в довольно узкой области 3,5–4,8 м.д. и в случае двух и более сахаров неизбежно перекрываются даже при использовании приборов на 500 МГц. Аналогичная ситуация наблюдается и для большинства скелетных протонов агликонной части, находящихся в области 0,8–2,3 м.д. Непосредственный анализ этих частей спектров невозможен. Поскольку химические сдвиги и, прежде всего КССВ скелетных протонов моносахаридных остатков, несут информацию об их природе, то отнесения сигналов в этой области очень важны и выполняются обычно с использованием двумерной гомоядерной корреляционной спектроскопии COSY с двуквантовой фильтрацией [17]. Однако даже на спектрах, полученных на приборах с рабочей частотой 500 МГц, далеко не всегда удается выполнить полные отнесения сигналов скелетных углеводных протонов в случае четырех-пяти и более моносахаридных остатков, особенно при наличии нескольких стереохимически подобных моносахаридов.

Кардинальным решением в нахождении и отнесении сигналов протонов каждого моносахаридного остатка, представляющих собой изолированные спиновые системы, стало использование в сочетании с COSY двумерной методики по наблюдению полных корреляций TOCSY [18]. В спектре TOCSY, от аномерных протонов Н-1 (или от Н-6 для остатков рамноз) наблюдаются кросс-пики не только с собственными соседними протонами Н-2 (или Н-5), но и всеми прочими скелетными протонами собственных моносахаридных остатков. Определенные проблемы здесь возникают лишь в тех случаях, когда сигналы аномерных протонов либо перекрываются, либо расположены на расстоянии менее  $1,5-2J_{1,2}$ . Определение характера расщепления и КССВ скелетных протонов моносахаридных остатков возможно на контурном представлении двумерного спектра TOCSY, однако значительно нагляднее и удобнее выполняется на одномерных сечениях по  $\nu_1$  на частотах аномерных протонов.

Найденные на основании вышеперечисленных методов величины КССВ для моносахаридных остатков определяют прежде всего взаимное расположение вицинальных скелетных протонов (*aa*, *ae*, *ee*) на основании хорошо известных зависимостей вицинальных констант  $^3J$  от величин двугранных углов между НСС-плоскостями в жестких циклических системах (уравнения Карплуса) [19], а тем самым определяют ориентацию гидроксильных групп и соответственно стереохимическую конфигурацию асимметрических С-атомов в моносахаридных остатках, то есть их химическую природу, а величины  $^3J$  для аномерных протонов (то есть  $J_{1,2}$ ) определяют  $\alpha$ - или  $\beta$ -конфигурацию гликозидной связи.

Аналогично отнесению сигналов скелетных протонов моносахаридных остатков в ряде случаев с использованием двумерных методик COSY и TOCSY выполнялись отнесения и для скелетных протонов агликонных частей в области 0,8–2,5 м.д., начиная от однозначно опознаваемых и расположенных в относительно низкопольной области сигналов Н-3, Н-5, Н-12, Н-16, Н-18 и ряда других, входящих в изолированные спиновые системы. А анализ величин КССВ позволял в случае необходимости устанавливать или подтверждать конфигурацию интересующих С-атомов в циклах агликоной части гликозидов.

Спектроскопия протонного магнитного резонанса полных ацетатов тритерпеновых гликозидов позволяет, с одной стороны, достичь лучшего разрешения мультиплетов по сравнению со спектрами исходных гликозидов вследствие значительно большего диапазона

химических сдвигов сигналов скелетных протонов (от 3,5 до 6,0 м.д.) из-за того, что при ацетилировании свободных гидроксильных групп соответствующие скелетные протоны испытывают значительные низкочастотные сдвиги от 1 до 1,5 м.д. С другой стороны, это позволяет получить ценную и однозначную информацию о типах гликозидных связей, поскольку скелетные протоны у С-атомов, образующих гликозидные связи, не испытывают эффектов ацетилирования, и их сигналы находятся в области 3,5-4,7 м.д. В этой же области находятся еще лишь легко опознаваемые вследствие специфического характера расщепления сигналы скелетных протонов Н-5 сахаров в пиранозной форме. Сигналы же остальных скелетных протонов оказываются в отдельной, более низкочастотной области 4,9-6,0 м.д.

Анализ эффектов ацилирования использовался и при определении положения нативных сложноэфирных (обычно ацетильных) групп в углеводных частях ряда гликозидов. Как правило, для этого изучался двумерный спектр COSY (в сочетании с TOCSY), и необычное низкочастотное положение (по одной из частотных осей) кросс-пика сигнала определенного скелетного протона однозначно свидетельствовало о наличии О-ацильной группы у соответствующего С-атома.

С точки зрения структурных исследований гликозидов, ценная информация получалась регистрацией одномерных спектров ЯМР по наблюдению ядерных эффектов Оверхаузера (ЯЭО) при преднасыщении аномерных протонов [20]. Значительный структурный интерес представляет обнаружение ЯЭО на сигналах скелетных протонов агликона или другого моносахаридного остатка, связанного с аномерным центром облучаемого Н-1 гликозидной связью. Так, проявление ЯЭО, например, на протоне Н-3 агликонной части гликозида свидетельствует о присоединении данного моносахаридного остатка по гидроксильной группе у С-3 агликона. Аналогичное проявление ЯЭО при преднасыщении аномерного Н-1 на определенном скелетном протоне другого моносахаридного остатка однозначно указывает на последовательность их соединения и тип гликозидной связи.

Использовавшийся нами двумерный эксперимент по наблюдению ЯЭО – NOESY [21] дает качественно ту же информацию (корреляции за счет диполь-дипольных взаимодействий при пространственной сближенности протонов), что и одномерный вариант с преднасыщением аномерных протонов. Более современная двумерная методика ROESY [22] по наблюдению ЯЭО во вращающейся системе координат отличается от методики NOESY тем, что здесь ЯЭО всегда отрицательны и нет проблем с нулевыми ЯЭО.

Анализ ROESY спектра для агликонной части гликозидов выполняют лишь при отсутствии предварительных данных о природе агликона и начинают с кросс-пиков от протона Н-3 или ряда других легко и однозначно интерпретируемых сигналов протонов в низкочастотной части спектра (например, винильного протона Н-12), последовательно прослеживая корреляции с другими протонами. При этом дополнительно для идентификации протонов и их корреляции через КССВ используют спектры COSY и TOCSY.

Спектры ЯМР-<sup>13</sup>C с полным подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами наиболее информативны для установления структур гликозидов. Это объясняется рядом хорошо известных причин – очень высокой воспроизводимостью значений химических сдвигов сигналов С-атомов ( $\pm 0,1-0,2$  м.д.), слабой зависимостью химических сдвигов от внешних факторов (температура, концентрация, наличие примесей и т.д.), узкой шириной линий и широким спектральным диапазоном, практически исключая их перекрывание. Все это делает спектроскопию ЯМР-<sup>13</sup>C очень ценной в идентификации известных соединений по величинам химических сдвигов сигналов. При этом степень надежности идентификации является исключительно высокой. Такой способ идентификации постоянно использовался нами при выделении гликозидов с уже установленными нами или другими авторами структурами после получения первичной информации путем идентификации гликозидов по хроматографической подвижности и идентификации продуктов полного кислотного и щелочного гидролизом. В ряде случаев такой подход позволял выявить изомерные соединения, например гликозиды урсоловой кислоты в смеси с гликозидами олеаноловой кислоты, которые хроматографически неразделимы, 23-О-глюкозилированные

производные хедерагенина вместо обычно встречающихся 3-О-глюкозидов, гликозиды с различными положениями нативных ацетатных групп, изомерные гликозиды с остатком галактозы вместо остатка глюкозы и так далее.

Анализ обзорного спектра ЯМР-<sup>13</sup>С прежде всего позволял выявлять наличие сигналов карбонильных С-атомов в области выше 160 м.д. – а именно сигналов углерода альдегидной группы в гликозидах гипсогенина (~210 м.д.), углеродов свободной карбоксильной группы агликона (~180 м.д.), гликозилированной карбоксильной группы агликона (~176 м.д.), карбоксильных углеродов остатков глюкуроновой кислоты (~170-174 м.д.), карбонильных углеродов ацетильных групп (~171 м.д.), углерода карбоксильной группы, сопряженной с двойной связью, в остатке кофейной кислоты (~168 м.д.). Анализ области 107-150 м.д. позволял выявить сигналы олефиновых и ароматических С-атомов и сделать предварительные заключения об их принадлежности. Так наиболее часто встречающийся тип двойной связи у С-12 ( $\Delta^{12,13}$ ) в тритерпеноидах  $\beta$ -амиринового ряда характеризуется значениями химических сдвигов ~123 и ~145 м.д. для атомов С-12 и С-13, соответственно. Тритерпеноиды  $\alpha$ -амиринового ряда с таким же типом двойной связи – значениями соответственно ~126 и 139 м.д. Тритерпеноиды лупанового ряда с 20(29)-двойной связью характеризуются химическими сдвигами в ~151 и ~110 м.д. для атомов С-20 и С-29, соответственно, а 30-нортритерпеноиды имеют дополнительную 20(29)-двойную связь с химическими сдвигами С-атомов в ~148 и ~108 м.д.

Следующая высокоинформативная область углеродного спектра – 95-109 м.д., в которой в тритерпеновых гликозидах располагаются исключительно сигналы аномерных С-атомов углеводных остатков, так что простой анализ сигналов в этой области однозначно указывает на количество моносахаридных остатков в молекуле гликозида. Анализ величин химических сдвигов сигналов в этой области позволяет сделать предварительные заключения и о природе моносахаридных остатков. Так в самой низкопольной части этой области (108-109 м.д.) располагается сигнал С-1 арабинофуранозы, в области 106-108 м.д. – сигнал С-1 ксилопиранозы, в области 104-107 м.д. – сигналы С-1 остатков глюкуронопиранозы, галактопиранозы, арабинопиранозы и глюкопиранозы, в области 101-103 м.д. – С-1 рамнопиранозы и в области 95-97 м.д. – С-1 глюкопиранозы, связанной ацилгликозидной связью с агликоном. Однако ситуация несколько усложняется в случае 2-О-ацетилированных или 2-О-гликозилированных сахаров, так как при этом сигнал С-1 испытывает высокопольный сдвиг ( $\beta$ -эффект замещения) на 1,5-2 м.д.

В области 61-88 м.д. располагаются сигналы прочих скелетных протонов моносахаридных остатков. Однако в самой низкопольной части этой области (87-88 м.д.) может находиться лишь сигнал атома С-4 арабинофуранозы, в области 78,5-85 м.д. – сигналы С-2 и С-3 арабинофуранозы и лишь сигналы гликозилированных С-атомов сахаров в пиранозной форме, в области 61-79 м.д. – сигналы как незамещенных, так и замещенных (гликозилированных, ацилированных) атомов С-2-С-5 сахаров, а в области 61-70 м.д. – сигналы атомов С-6 гексопираноз, С-5 пентопираноз, арабинофуранозы и рамнопиранозы и С-4 арабинопиранозы и галактопиранозы. К сожалению, в область 61-88 м.д. попадают и сигналы агликонных С-атомов, у которых имеется гидроксильная группа, что иногда существенно усложняет анализ этой части спектра. В оставшейся высокопольной области спектра 12-57 м.д. располагаются сигналы остальных С-атомов агликонных частей гликозидов и сигналы С-6 остатков рамноз (~18-19 м.д.).

Как указывалось в предыдущем разделе, для отнесения сигналов в одномерном углеродном спектре обязательно необходима какая-либо априорная информация о структуре фрагментов и данные по химическим сдвигам сигналов С-атомов в аналогичных фрагментах иных соединений, полученные тем или иным способом. Однако во многих случаях такие данные или отсутствуют, или не являются надежными, поскольку отнесения обычно выполнены косвенными методами (расчетами, сопоставлением данных по различным производным, анализом <sup>13</sup>С-ЯМР-спектров с частичной релаксацией и тому подобное).

Использование двумерной гетероядерной корреляционной спектроскопии HETCOSY [23] практически полностью решило проблему однозначного отнесения сигналов в углеродном спектре (по крайней мере для углеводных частей) по кросс-пикам сигналов непосредственно связанных С- и Н-атомов, поскольку обычно имеются однозначные отнесения сигналов протонов в ПМР-спектре, выполненные с помощью корреляционных методик COSY, TOCSY и ROESY. Существенным недостатком спектроскопии HETCOSY, ограничивающим ее применение, является низкая чувствительность. Эта проблема в значительной степени решилась с появлением обращенной корреляционной методики HSQC (гетероядерная корреляция через одну связь) [24].

Возможности полного и однозначного отнесения углеродных сигналов углеводных частей гликозида с помощью методики HSQC позволяют однозначно решить целый ряд структурных задач. Так,  $\alpha$ -эффекты гликозилирования (на гликозилируемых С-атомах), в сравнении с химическими сдвигами С-атомов незамещенных гликозидов сахаров, положительны и обычно составляют от 5 до 11 м.д., напротив,  $\beta$ -эффекты на соседних С-атомах отрицательны и обычно не превышают 3 м.д. Эти закономерности при анализе найденных химических сдвигов сигналов С-атомов углеводных частей позволяют однозначно определять типы гликозидных связей или же определять концевые моносахаридные остатки, на которых эффекты гликозилирования отсутствуют. Данный способ определения типов гликозидных связей является прямым и наиболее надежным.

Кроме установления типов гликозидных связей анализ наблюдаемых величин химических сдвигов и эффектов замещения позволяет установить и места присоединения ацильных групп в углеводных частях гликозидов. Наблюдаемые при этом  $\alpha$ -эффекты ацилирования в любые положения положительны и обычно составляют от 1,5 до 3,5 м.д., что заметно меньше  $\alpha$ -эффектов гликозилирования, тогда как  $\beta$ -эффекты, как и в случае гликозилирования всегда отрицательны и составляют от -2,2 до -3,5 м.д, что обычно даже несколько больше, чем в случае гликозилирования.

Однако даже сочетание трех вышеперечисленных методик далеко не всегда дает положительные результаты для высокопольной области спектра (ниже 57 м.д.), где находится большинство сигналов агликонных С-атомов. В таких случаях, в частности при установлении структуры новых агликонов, особенно эффективной оказалась двумерная гетероядерная корреляционная методика HMBC [25], основанная на наблюдении корреляций протонов с углеродами через несколько химических связей. В данной методике наиболее эффективно проявляются корреляции через 3 связи, особенно в случае *s-транс*-расположения Н- и С-атомов.

Обычно анализ спектра HMBC агликонной части начинают с однозначно идентифицируемого в относительно низкопольной области сигнала протона Н-3, у которого наблюдаются кросс-пики с атомами и группами кольца А: С-1, С-5, С-23 и С-24. Иногда наблюдается и кросс-пик через 2 связи с атомом С-4. Аналогично от С-3 прослеживаются корреляции с протонами у вышеперечисленных С-атомов. Далее от Н-5 или Н-1 прослеживаются кросс-пики с С-25, С-9 и с С-7 от Н-5, то есть атомами и группами кольца В. Аналогично проводятся отнесения для кросс-пиков между С- и Н-атомами других колец. Для проверки найденных решений делают "обратные" ходы и находят корреляции от протонов (или атомов углерода) метильных групп С-23-С-27, С-29 и С-30 или от низкопольных сигналов атомов С(Н)-12, С(Н)-13, С-28 и от С(Н)-атомов агликона с оксигруппами или от других групп, сигналы которых расположены в низкопольных областях. Для углеводных частей гликозидов методика HMBC позволяет в большинстве случаев определить или подтвердить типы гликозидных связей, поскольку обычно легко обнаруживаются кросс-пики через три связи между аномерным протоном Н-1 гликозилирующего моносахаридного остатка и соответствующим гликозилируемым С-атомом (и наоборот между аномерным С-атомом и соответствующим скелетным протоном у гликозилируемого С-атома).



По получаемой информации в отношении типов гликозидных связей применение методики НМВС к углеводной части в определенном смысле подобно методике ROESY и иногда может удачно дополнять ее при неоднозначностях интерпретации в том или ином случае. Однако сложности в отнесении кросс-пиков в большинстве случаев заставляют отдавать предпочтение методике ROESY. Следует отметить, что методика НМВС является чрезвычайно эффективной в установлении строения гликозидов и особенно их агликонных частей, поскольку позволяет получить информацию, не даваемую иными вышеописанными корреляционными методами.

### Список литературы

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. / М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 320 с.
2. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. / М.: Мир, 1986. – Т. 2. – 312 с.
3. Hostettmann K., Marston A. Saponins. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
4. Saponins used in food and agriculture / Eds. G.R. Waller and K. Yamasaki. – New York: Plenum Press, 1996. – 441 p.
5. Saponins used in traditional and modern medicine / Eds. G.R. Waller and K. Yamasaki. – New York: Plenum Press, 1996. – 606 p.
6. Lacaille-Dubois M.A. Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants in: Immunomodulatory agents from plants / Ed. H. Wagner. – Basel: Birkhauser Verlag, 1999. – 215 p.
7. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 1978. – 656 с.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Rutaceae-Elaeagnaceae* / АН СССР. Бот. ин-т им. В.Л. Комарова. – Л.: Наука, 1988. – 357 с.
9. Perry L.M., Metzger J. Medicinal plants of East and Southeast Asia. – Cambridge: MIT Press, 1980. – 470 p.
10. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармазии и клинической биохимии. – М.: Мир, 1980. – 621 с.
11. Lee T.M., Marderosian A.H. Two-dimensional TLC analysis of ginsenosides from root of dwarf ginseng (*Panax trifolius* L.), *Araliaceae* // J. Pharm. Sci. – 1981. – Vol. 70, № 1. – P. 89-91.
12. Гришкoveц В.И. Двумерная тонкослойная хроматография в анализе тритерпеновых гликозидов // Химия природ. соедин. – 2001. – № 1. – С. 53-55.
13. Гришкoveц В.И., Горбачева Л.А. Количественное определение содержания тритерпеновых гликозидов в плодах *Sophora japonica* // Химия природ. соедин. – 1996. – № 1. – С. 104-106.
14. Schlosser E. Role of saponins in antifungal resistance. II. The hederasaponins in leaves of English ivy // Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz. – 1973. – Vol. 80. – P. 704-710.
15. Domon B., Hostettmann K. New saponins from *Phytolacca dodecandra* L'HERIT. // Helv. Chim Acta. – 1984. – Vol. 67. – P. 1310-1315.
16. Бочков А.Ф., Афанасьев В.А., Зайков Г.Е. Образование и расщепление гликозидных связей. – М.: Наука, 1978. – 180 с.
17. Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner G., Ernst R.R., Wuthrich K. Improved spectral resolution COSY <sup>1</sup>H NMR spectra of proteins via double-quantum filtering // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1983. – Vol. 17. – P. 479-483.
18. Homans S.W., Dwek R.A., Fernandes D.L., Rademacher T.W. Multi-step relayed correlation spectroscopy: sequential resonance assignments in oligosaccharides // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1984. – Vol. 81. – P. 6286-6290.
19. Панов В.П., Жбанков Р.Г. Конформации сахаров // Конформационный анализ методом ЯМР. – Минск: Наука и техника, 1975. – С. 81-121.

20. Стоддарт Дж. Стереохимия углеводов // Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Константы взаимодействия. – М.: Мир, 1975. – С. 177-187.

21. Kumar A., Ernst R.R., Wuthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the evolution of complete proton-proton cross relaxation networks in biological molecules // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. – Vol. 95. – P. 1-12.

22. Bothner-By A.A., Stephens R.L., Lee J.T., Warren C.D., Jeanloz R.W. Structure determination of tetrasaccharide by transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame // J. Amer. Chem. Soc. – 1984. – Vol. 106, № 3. – P. 811-815.

23. Bodenhausen G., Freeman R. Correlation of protonated carbon-13 NMR spectra by heteronuclear two-dimensional spectroscopy // J. Magn. Reson. – 1977. – Vol. 28. – P. 471-475.

24. Bax A., Egan W., Kovac P. New NMR techniques for structure determination and resonance assignments of complex carbohydrates // J. Carbohydr. Chem. – 1984. – Vol 3. – P. 593-597.

25. Bax A., Summers M.F.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple-quantum NMR // J. Amer. Chem. Soc. – 1986. – Vol. 108. – P. 2093-2095.

**Triterpene glycosides of *Araliaceae*: methods of exudation  
and establishment of structure  
Grishkovets V.I., Chirva V.Ya., Kachala V.V., Shashkov A.S.**

The article summarized the results of author's works on methods of exudation and establishment of structure of triterpene glycosides of *Araliaceae*.