

Рахимов Рахматилла Нуриллаевич
Старший научный сотрудник Института биоорганической химии,
Доцент Чирчикского педагогического университета
E-mail:rrakhimov.83@mail.ru

УДК 547.982/83/84

ТАНИНЫ EUPHORBIA HIMUFUSA И EUPHORBIA CANESCENS (L.)

Аннотация: Изучены дубильные вещества *Euphorbia Himufusa*, *E. Canescens* L, относящегося к семейству *Euphorbiaceae*. Из надземных органов этих растений выделено более 20 соединений, относящихся к классу дубильных веществ. Среди выделенных соединений 2 оказались новыми танинными соединениями, ранее не описанными в литературе. Изучены физико-химические свойства этих соединений.

Ключевые слова: эллаготаннины, галлоильная группа, гексагидроксидифеноильная группа, валонеильная группа; ¹³C ЯМР-спектроскопия; Q-TOF LC-MS.

Raximov Raxmatilla Nurillayevich
Bioorganik kimyo instituti katta ilmiy xodimi,
Chirchiq davlat pedagogika universiteti dosenti
E-mail:rrakhimov.83@mail.ru

EUPHORBIA HIMUFUSA VA EUPHORBIA CANESCENS L O'SIMLIKLARINING TANNINLARI

Annotasiya: *Euphorbiaceae* oilasiga kiruvchi *Euphorbia Himufusa*, *E. Canescens* L o'simliklarining tanninlari o'rganildi. Ushbu o'simliklarning yer ustki organlaridan 20 dan ortiq tannin moddalar sinfiga kiruvchi birikmalar ajratib olindi. Ajratib olingan birikmalar ichidan 2 tasi ilgari adabiyotlarda keltirilmagan yangi tannin birikma ekanligi aniqlandi. Ushbu birikmalarni fizik-kimyoviy kattaliklari o'rganildi.

Kalit so'zlar: ellagitanninlar, galloil guruhi, geksagidroksidifenoil guruhi, valonil guruhi; ¹³C NMR spektroskopiyasi; Q-TOF LC-M

Rakhimov Rakhmatilla Nurillayevich.

Senior Researcher at the Institute of Bioorganic Chemistry,
Associate Professor at Chirchik Pedagogical University
E-mail:rrakhimov.83@mail.ru

TANNINS OF EUPHORBIA HIMUFUSA AND EUPHORBIA CANESCENS (L.)

Abstract: *The tannins of Euphorbia Himufusa, E. Canescens L, belonging to the Euphorbiaceae family, were studied. More than 20 compounds belonging to the class of tannins were isolated from the above-ground organs of these plants. Among the isolated compounds, 2 were found to be new tannin compounds not previously reported in the literature. Physico-chemical properties of these compounds were studied.*

Keywords: *ellagitannins, galloyl group, hexahydroxydiphenoyl group, trigalloyl group, valoneoyl group; ^{13}C NMR-spectroscopy; Q-TOF LC-MS.*

Введение: Среди важнейших классов природных соединений, обуславливающих лечебный эффект лекарственных растений, значительное место занимают полифенолы. Широкий спектр биологического действия и малая токсичность ставит их в ряд перспективных в этом плане соединений. Поэтому поиск растений, содержащих полифенолы, разработка методов их выделения, установление их химической структуры и изучение зависимости биологической активности от химической структуры с целью создания новых эффективных лекарственных средств является важной и актуальной проблемой современной биоорганической химии.

Результаты и обсуждение: Исследования, проводимые в Институте биоорганической химии АН РУз, показали перспективность использования природных фенольных соединений как противовирусных, антиоксидантных, противоопухолевых агентов [1]. Оказалось, что эти соединения обладают высокой биологической активностью, которая проявляется в подавлении активности разных вирусных инфекций, окислительно-восстановительных ферментов и др. Кроме того, показано, что природные полифенолы обладают анти-ВИЧ действием. [2].

Исходя из этого, нами были исследованы полифенолы 2 растений рода *Euphorbia* [3]. Из них было выделено более 20 фенольных соединений и установлено их химическое строение, а также выявлена биологическая активность некоторых из них. Выявлено, что ряд из них являются новыми, ранее не описанными в литературе веществами. С помощью физико-химических и спектральных данных установлены структуры этих соединений.

По ранее отработанной методике [4], высушенные надземные органы растений обрабатывали хлороформом, водным ацетоном, экстрагировали эфиром, этилацетатом. С помощью колоночной хроматографии из этилацетатных экстрактов исследованных растений выделили 2 новых веществ.

Для определения мономерного состава, а также установления структуры вещества-1, проведен ряд химических превращений согласно. В продуктах кислотного гидролиза с 5% H_2SO_4 обнаружены глюкоза, галловая и валоневая кислоты. Метилирование вещества с диметилсульфатом и безводным K_2CO_3 привело к образованию перметилата, после щелочного гидролиза метанольным раствором метоксида натрия образовались метил три-О-метилгаллат (ТСХ, R_f 0.75, система растворителей-1: бензол-ацетон 4:1), и триметил-окта-О-метилвалониевой кислоты (ТСХ, R_f 0.27, система-1). В продуктах частичного гидролиза вещества-1 (нагревание в воде при 90°C) образуются 1-О-галлоил- β -D-глюкоза, 6-О-бисгаллоил- β -D-глюкоза и 2,4-валонеил- β -D-глюкоза.

Действительно, в спектре ЯМР ^{13}C вещества-1, полученного в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами, обнаруживаются сигналы, характерные для глюкозы, галловой и валониевой кислоты [5]. Интенсивный сигнал при 92.37 м.д., относящийся к углеродному атому C-1 указывает на то, что аномерный центр молекулы глюкозы имеет β -конфигурацию [6]. Смещение в более сильное поле и проявление в области 92.37, 76.78, 76.89, 63.34 м.д. сигналов, относящихся к атомам C-1, C-2, C-4 и C-6, соответственно, сахарного остатка указывают на ацилирование углеводных остатков в этих положениях. В спектре ЯМР C^{13} присутствуют сигналы трех остатков галловой кислоты: сигналы углеродных атомов карбонильных групп проявляются при 167.23, 168.70, 166.40 м.д., а сигнал C-1 углеродных атомов

тригаллоильной группы наблюдается при 119.88, 120.44, 120.44 м.д.. Сигналы углеродных атомов C-2 и C-6, а также C-3 и C-5 совпадают и дают относительно интенсивные сигналы при 110.20, 110.15 и 110.20, 110.10 м.д., а также 145.82, 145.54 и 145.80, 145.51 м.д., соответственно. Углеродный атом C-4 этого остатка экранируется и в результате диамагнитного сдвига резонирует при 139.61 и 139.22 м.д. В спектре также имеются сигналы 21 углеродных атомов валониевой группы. Резонансные сигналы от C-1, C-1' и C-1'' углеродных атомов валониевой кислоты проявляются при 114.30, 118.85 и 112.22 м.д., соответственно. Интенсивные сигналы при 144-145 м.д. относятся к C-4 и C-6 углеродным атомам валониевой кислоты. Химические сдвиги углеродов C-3, C-3' и C-3'' проявляются в области 106.80, 110.58 и 130.44 м.д. Анализ ЯМР ^{13}C -спектров показывают, что значения химических сдвигов валониевой кислоты совпадают с литературными данными [16-18]. Сигналы углеродных атомов C-7, C-7' и C-7'' карбонильных групп дают интенсивные сигналы при 169.1, 168.32 и 163.36 м.д.

В УФ-спектре вещества-1 имеются полосы поглощения, характерные для фенольных соединений (λ_{max} 216, 270 нм).

Эти данные подтверждаются данными масс-спектрометрического распада вещества-1, полученные на приборе LC-MS Q-TOF при отрицательной ионизации. Как видно из схемы, молекулярный ион вещества-1 с m/z 1105, расщепляется на два фрагмента с m/z 953 и 153. Это указывает на разрыв сложноэфирной связи между глюкозой и галлоильной группой, который и согласуется с литературными данными. Вторичный ион с m/z 953 далее расщепляется на фрагменты с m/z 649 и 305. Наличие в масс-спектре интенсивного осколочного ионного сигнала с m/z 469, образованного при распаде иона с m/z 649 свидетельствует о том, что в составе вещества-

1содержится

валонеильная

группа.

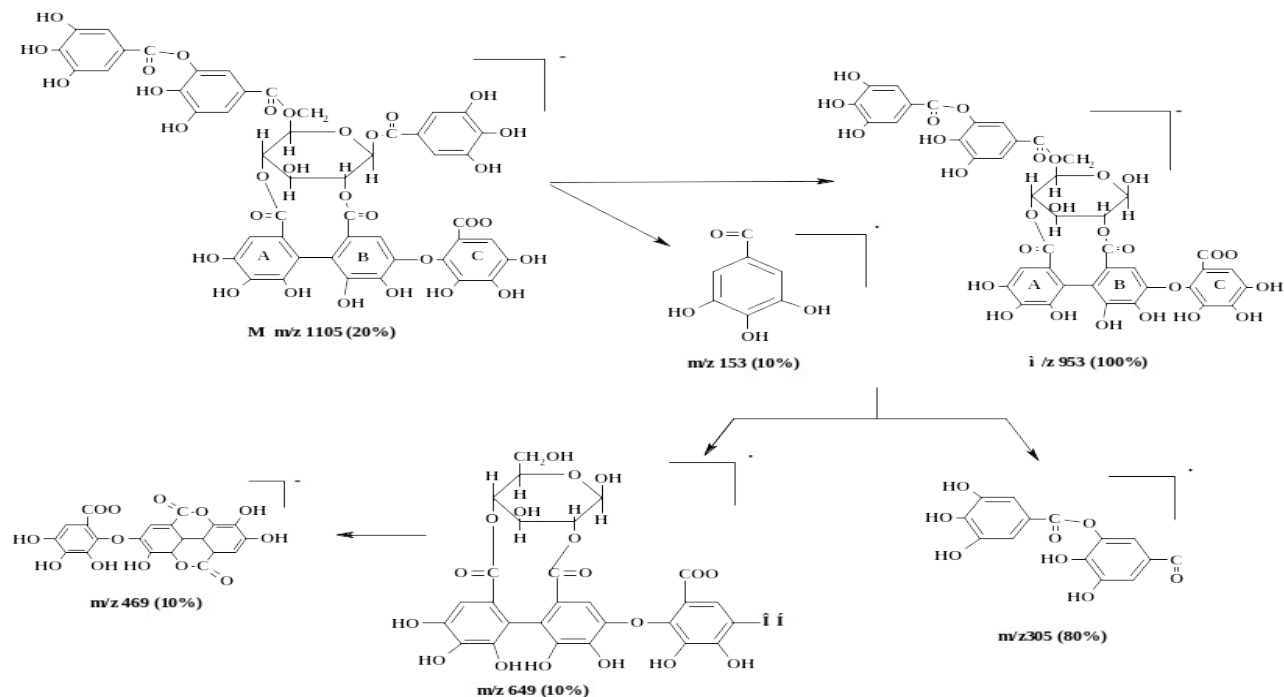
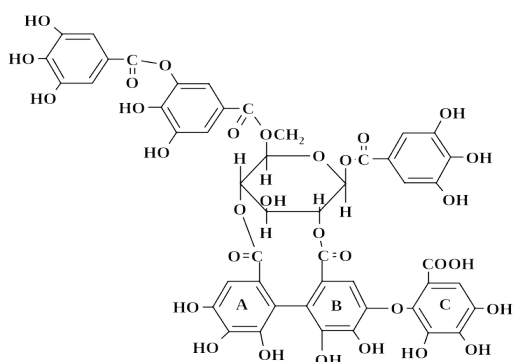


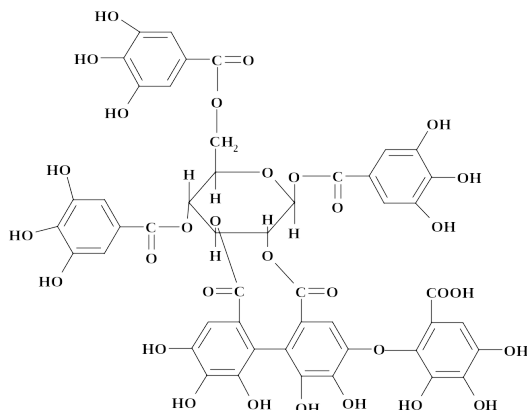
Схема 1. Возможные пути фрагментации вещества-1.

На основании анализа химических продуктов и спектральных параметров и сравнения их с литературными данными установили структуру вещества-1.



вещества-1

Аналогичным путем установили структуры остальных новых эллаготаннинов, выделенных из растений рода *Euphorbia*.



вещества-2

Экспериментальная часть: Разделение эллаготаннинов проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле марки LS 100/40 (Чехословакия). Для идентификации и определения однородности веществ применяли метод ТСХ на пластинках Silufol UV – 254 (элюент- бензол:ацетон, 9:4). Источником сырья служили измельченные и высушенные надземные органы растений, относящиеся к сем. Euphorbiaceae (молочай), произрастающие в Узбекистане, собранные в конце вегетативного периода. Для экстракции растительного сырья использовали растворители ЗАО «Himreaktivkomplekt» (Узбекистан), все остальные реактивы производства Реахим (Россия).

Оптическую активность эллаготаннинов определяли на фотоэлектроколориметре ФЭК-56М. УФ- спектры эллаготаннинов сняли в спиртовом растворе на приборе EPS-3T фирмы «Hitachi» (Япония). ¹³C-ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker AM 400 (Германия) в дейтероацетоне. В качестве внутреннего эталона использовали тетраметилсилан, сигнал которого принят за 0 (δ-шкала). Масс-спектрометрические исследования эллаготаннинов проводили на приборе Q-TOF LC-MS Agilent Technologies (США) серии 6520B в следующих условиях: источник ионизации: ESI-, поток осушающего газа: 5 л/мин, температура осушающего газа: 300°C, напряжение на конуса скиммера: 20V, на фрагменторе 125V, диапазон масс: в режиме MS 100 – 2000 m/z, а в режиме Targeted MS/MS 25 – 2000 m/z, энергия столкновения (collision energy) - 65. Способ ионизации: отрицательный. Образцы фракционировали с помощью

хроматографа фирмы Agilent Technologies серии 1200, на колонке Zorbax SB C18, 3 μ m, 0.5x150 мм. Мобильная фаза: А - 0,1% раствор муравьиной кислоты, В – ацетонитрил + 0,1 % муравьиная кислота. Элюцию осуществляли на приборе Agilent Technologies серии 1260 Cap Pump при скорости потока 15 мкл/мин. Градиент концентрации раствора В – в минутах: 0% - 5 мин, 25% - 20 мин, 50% - 35-40 мин, 0% - 43 мин. Растворы дегазировали на приборе Agilent Technologies 1260 μ -degasser. Образцы наносили в колонку с помощью прибора Agilent Technologies Micro WPS по 1 мкл.

Выделение танинов. Высушенные и измельченные растения, *Euphorbia Himufusa*, *E.Canescens* L. обрабатывали хлороформом для удаления липофильных веществ. Затем сырье экстрагировали 70% водным ацетоном. Водно-ацетоновый экстракт выпаривали под вакуумом, водный остаток обрабатывали этилацетатом. Сгущением этилацетатной вытяжки под вакуумом, добавлением к сгущенным экстрактам четырехкратного объема гексана, фильтрованием выпавших осадков получили суммы полифенолов, где их количество составляет в пределах 2.1% - 6.2%.

Суммы полифенолов надземных органов растений хроматографировали на силикагеле в системах растворителей хлороформ-метанол (17:3; 17:4; 17:5) и выделили 3 фракции. Из первой фракции были выделены известные фенолоксикислоты.

В результате бумажной хроматографии (система растворителей-2: н-бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:5, система растворителей-3: н-бутанол-уксусная кислота-вода 40:12:28) во второй фракции наблюдали наличие соединений, относящихся к флавонолам, а в третьей фракции - танинов.

После рехроматографирования третьей фракции на силикагеле в различных системах растворителей, выделили индивидуальные танины. Посредством физико-химических методов исследований установлено их строение. Из всех изученных видов растений выделено более 20 соединений фенольной природы, 2 из которых являются новыми, ранее не описанными в литературе веществами.

Вещества-1. 1-О-галлоил-6-О-бисгаллоил-2,4-валонеил- β -D-глюкоза- выделен из *Euphorbia Himufusa*, аморфный порошок белого цвета. $C_{48}O_{31}H_{34}$, $[\alpha]_D$

+70⁰ (с= 0,5 MeOH), R_f 0.48 (система -1). УФ-спектр λ_{max} (EtOH, нм) nm (lgε): 216 (5.22), 270 (4.86) MS m/z: 1106 [M-H]⁻; ¹³C-ЯМР (100 МГц, ацетон-d₆+D₂O, м.д): галлоильная гр.: 119.88 (C-1), 110.20 (C-2), 145.82 (C-3), 139.61 (C-4), 145.8(C-5), 110.20 (C-6), 167.23 (C-7); бисгаллоильная гр.: 120.44 (C-1, C-1'), 110.15 (C-2, C-2'), 145.54 (C-3, C-3'), 139.22 (C-4, C-4'), 145.51 (C-5, C-5'), 110.10 (C-6, C-6'), 166.40 ,168.70 (C-7, C-7'); валонеильная гр.: 114.30 (C-1), 126.44 (C-2), 106.80 (C-3), 145.14 (C-4), 136.10 (C-5), 144.44 (C-6), 169.10 (C-7), 118.85 (C-1'), 128.09 (C-2'), 110.58 (C-3'), 148.84 (C-4'), 135.64 (C-5'), 147.03 (C-6'), 168.32 (C-7'), 112.22 (C-1''), 138.65(C-2''), 130.44(C-3''), 141.17(C-4''), 143.55(C-5''), 110.15(C-6''), 163.36(C-7''); глюкоза: 92.37 (C-1), 76.78 (C-2), 76.99 (C-3), 76.99 (C-4), 73.49 (C-5), 63.34 (C-6).

Вещества-2. 1,4,6-три-О-галлоил-2,3-валонеил-β-D-глюкоза—выделен из *Euphorbia canescens* L., аморфный порошок коричневого цвета, C₄₈O₃₁H₃₄, [α]_D-26⁰ (с 0.5, MeOH); УФ-спектр (MeOH, λ_{max}, нм): 225, 290; MS m/z: 1106 [M-H]⁻, ¹³C-ЯМР-(100 МГц, ацетон-d₆ +D₂O, м.д): галлоил. гр.:125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6), 167.0 (C-7); валонеильная гр.: 119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.5 (C-5), 144.7 (C-6), 167.0 (C-7), 119.5 (C-1'), 123.1 (C-2'), 113.0 (C-3'), 146.5 (C-4'), 138.1 (C-5'), 143.0 (C-6'), 167.0 (C-7'), 114.8 (C-1''), 138.9 (C-2''), 134.6 (C-3''), 136.6 (C-4''), 138.9 (C-5''), 111.0 (C-6''), 172.0 (C-7''). Глюкоза.: 94.2 (C-1), 70.9 (C-2), 65.3 (C-3), 67.2 (C-4), 64.3 (C-5), 65.4 (C-6).

Список литературы:

1. Салихов Ш.И., Ким Р.Ю., Мавлянов С.М., Абдулладжанова Н.Г., Земляницына И.В., Алланазарова З.Х. // Медицинский журнал Узбекистана 2007, №5, С.64-67.
2. Borisova M.P., Kataev A.A., Mavlyanov S.M., Abdullajanova N.G. Effects of Hydrolysable Tannins on Native and Artificial Biological Membranes // Membrane and Cell Biology, 2015, Vol. 9, No.1, P. 53–60.
3. Sękowski S., Ionov M., Mavlyanov S., Dubis A., Bryszewska M., M.Zamarajewa Biomolecular Interactions of Tannin Isolated from *Oenothera gigas* with Liposomes. *J. Membrane Biol* (2016) 249:171-179.

4. Sękowski S., Ionov M., Mavlyanov S., Dubis A., Bryszewska M., Zamarajewa M. Spectroscopy methods in studies of biopolymers-tannins interactions. *Membrane and Cell Biology*, 2015, Vol. 9, No.1, P. 53–60.
5. *Seeram N.P., Lee R., Scheuller S.H., Heber D.* Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electro spray ionization mass spectroscopy// *Food Chemistry*. 2006. V. 97. P. 1–11
6. *Karonen M., Parker J., Agrawal A., Salminen J-P.* First evidence of hexameric and heptameric ellagitannins in plants detected by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010; V.24. P. 3151–3156.