

УДК 547.972

СТИЛЬБЕНЫ КОРЫ ЛИСТВЕННИЦЫ ГМЕЛИНА

© С.З. Иванова*, Т.Е. Федорова, С.В. Федоров, В.А. Бабкин

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, ул. Фаворского, 1,
Иркутск, 664033 (Россия) E-mail: babkin@irioch.irk.ru

В коре лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) впервые обнаружены стильбеновые соединения. Из луба (флоэмы) выделены астрингенин, астрингенин-3'-О-β-D-глюкопиранозид и питеид, структура которых установлена спектральными методами (УФ, ЯМР ¹H и ¹³C). В коре (ритидоме) методом ТСХ идентифицирован астрингенин.

Ключевые слова: лиственница Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.), кора, стильбены, ЯМР ¹H и ¹³C.

Введение

Стильбены образуют сравнительно небольшую группу фенольных соединений. Ранее считалось, что их распространение ограничивается несколькими семействами растений. Отмечалось, что стильбены обладают биологической активностью: в растениях действуют фитоалексины, проявляют антимикробное и фунгицидное действие по отношению к разрушающим древесину грибам [1–3].

В последнее десятилетие интерес к этому классу соединений резко возрос. Увеличивающийся поток научной информации свидетельствует о существенно более широком и распространении стильбенов в растительном мире и спектре их биологической активности [4–9]. В патенте [10] по разработке новых методов выделения резвератрола из растительного сырья приводится внушительный перечень лечебных свойств, выявленных для этого соединения, в том числе такие, как кардиопротекторные, антибактериальные, антивирусные, противовоспалительные, подавление агрегации тромбоцитов, а также антиоксидантная и противоопухолевая активности и др.

Род *Larix* относится к семейству *Pinaceae*, в древесине и коре представителей двух родов которого – ели (*Picea* A. Lietr.) и сосны (*Pinus* L.) – к середине 70-х гг. было идентифицировано около двух десятков стильбенов как в свободном виде, так и в виде метиловых эфиров и гликозидов [11, 12]. По имеющимся у нас данным, в научной литературе отсутствуют сведения об обнаружении стильбеновых соединений в представителях рода *Larix*.

Данная работа посвящена выделению и идентификации стильбеновых соединений, обнаруженных в лубе и коре лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.).

Экспериментальная часть

Стильбеновые соединения выделяли из этилацетатного экстракта луба лиственницы Гмелина, произрастающей в Хилокском районе Читинской области (время отбора проб – март 2006 г.).

Измельченный луб (1650 г, размер частиц 5–10 мм, влажность 55,9%) настаивали с этилацетатом при комнатной температуре в течение 2-х суток, операцию повторяли 3 раза. Этилацетат из объединенных экстрактов удаляли под вакуумом при 35–40 °С. Водный остаток разбавляли равным объемом воды и трижды экстрагировали растворителями различной полярности: хлороформом, диэтиловым эфиром и бутанолом. Выход хлороформрастворимых веществ составил 18,9 г (2,6% от массы а.с. луба), эфирорастворимых – 8,5 г (1,2%), бутанолрастворимых – 32,1 г (4,4%).

* Автор, с которым следует вести переписку.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C образцов регистрировали на приборе Bruker DPX 400 с рабочей частотой 400 и 100 МГц соответственно, в $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (нативные соединения) и CDCl_3 (ацетаты). Отнесение химических сдвигов (ХС) резонансных сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соединений **1** – **3**, **2a** и **3a** осуществлено с использованием двумерной спектроскопии: методик HMQC, HMBC, COSY, NOESY.

УФ спектры соединений регистрировали на приборе СФ-26, растворитель – метанол.

Соединение **1** – белое аморфное, УФ спектр: λ_{max} 305, 325 нм; спектры ЯМР ^1H и ^{13}C (табл. 1).

Соединение **2** – белое аморфное, УФ спектр: λ_{max} ($\log \epsilon$) 305(4,58), 320(4,61) нм. При ацетилировании (уксусный ангидрид-пиридин) получен гептаацетат (**2a**) – т.пл. 146–149 °С (белые иглы, ацетон-бензол); спектры ЯМР ^1H и ^{13}C (табл. 2).

Соединение **3** – белое аморфное, УФ спектр: λ_{max} 310, 320 нм. Гексаацет (**3a**) – УФ спектр: λ_{max} 300, 310, 325 (плечо) нм; спектры ЯМР ^1H и ^{13}C (табл. 3).

Обсуждение результатов

Данная работа является продолжением работ по изучению полифенольных соединений коры лиственниц сибирской (*Larix sibirica* L.) и лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) [13–16]. В указанных работах объектом исследования была корка, данное исследование посвящено выделению и идентификации фенольных соединений, обнаруженных в лубе лиственницы Гмелина.

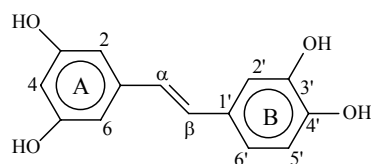
Из эфирного и бутанольного экстрактов луба колоночной хроматографией на силикагеле (элюент хлороформ – метанол 10 : 0 → 10 : 5 соотн.об.) были выделены соединения **1–3**. Полученные фракции анализировали методом ТСХ (Silufol).

Соединение **1**, выделенное из эфирного экстракта (выход – 2,7% от массы эфирного экстракта), при анализе ТСХ показало значения $R_f = 0,35$ и $0,64$ в системах (бензол – ацетон, 2 : 1) и (хлороформ–метанол, 7 : 1) соответственно. Обнаружение соединения проводили в УФ-свете по характерной ярко-синей флуоресценции и по цветной реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой (ДСК).

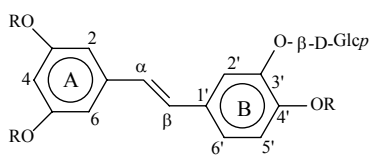
Соединения (**2**) и (**3**), выделенные из бутанольного экстракта луба (выход **2** – 16,9%, выход **3** – 8,7% от массы бутанольного экстракта), при анализе методом ТСХ показали значительно более низкие, по сравнению с соединением **1**, значения R_f , характерные для гликозидов, а именно: значение $R_f = 0,60$ и $0,50$ (бензол – ацетон – метанол, 6 : 6 : 1) и $R_f = 0,37$ и $0,23$ (хлороформ-метанол 7:1) для **3** и **2**, соответственно.

Кислотный гидролиз соединений **2** и **3** (по 0,02 г) проводили 10% HCl (5 мл) при нагревании на водяной бане (80–90 °С) в течение 3 ч. Охлажденную реакционную смесь экстрагировали диэтиловым эфиром и агликоны анализировали ТСХ (бензол – ацетон, 2 : 1, Silufol). Анализ показал идентичность соединения **1** и агликона соединения **2**. Водный остаток нейтрализовали на анионообменной смоле АВ-17 (ОН[–]), упаривали, в остатке углеводы анализировали методом бумажной хроматографии сравнением с аутентичными образцами (бутанол – пиридин – вода, 6 : 4 : 3, Whatman, Sigma-Aldrich). В гидролизатах соединений **2** и **3** идентифицирована глюкоза.

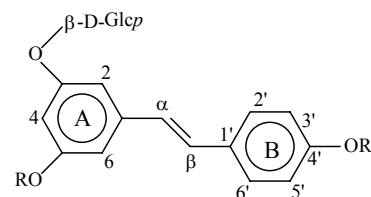
В УФ спектрах выделенных соединений **1–3** и их производных в области 300–330 нм наблюдается интенсивная полоса, характерная для стильбеновых соединений, обладающих высоко конъюгированной системой, причем наблюдаемый двойной максимум этой полосы свидетельствует о *транс*-изомерии выделенных стильбенов [11, 12, 17]. Характер замещения ароматических колец был установлен методом ЯМР ^1H и ^{13}C (табл. 1–3). В результате анализа данных УФ и ЯМР спектроскопии, установления их соответствия литературным данным [12, 17, 18–20] выделенные соединения были идентифицированы как астрингенин – (Е)-3,3',4',5'-тетрагидроксистильбен (**1**), гликозид астрингенина – (Е)-3,4',5'-тригидроксистильбен-3'-О-β-D-глюкопиранозид (**2**) и пицеид – (Е)-4',5'-дигидроксистильбен-3-О-β-D-глюкопиранозид (**3**).



1



2: R=H
2a: R=Ac



3: R=H
3a: R=Ac

Таблица 1. Данные спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C астрингенина (1)

Атом	1		
	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	(J/ Гц)
C(1)	140,4		
C(2)	105,4	6,51	d (2,0)
C(3)	158,8	8,16 – OH	
C(4)	101,7	6,25	t (2,0)
C(5)	158,8	8,16 – OH	
C(6)	105,2	6,51	d (2,0)
α	126,0	6,81	d (16,4)
β	128,6	6,94	d (16,4)
C(1')	130,1		
C(2')	113,3	7,06	d (2,0)
C(3')	145,5	7,88 – OH	
C(4')	145,8	8,01 – OH	
C(5')	115,4	6,79	d (8,3)
C(6')	119,3	6,89	dd (8,3; 2,0)

Таблица 2. Данные спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C (Е)-3, 4',5-тригидроксистильбен-3'-О- β -D-глюкопиранозида (2) и его ацетата (2а)

Атом	2			2а		
	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	(J/ Гц)	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	(J/ Гц)
C(1)	139,5			139,1		
C(2)	104,5	6,51	d (2,2)	116,9	7,10	d (2,0)
C(3)	158,3	8,15 – OH		151,3		
C(4)	101,5	6,25	t (2,2)	114,5	6,81	t (2,0)
C(5)	158,3	8,15 – OH		151,3		
C(6)	104,5	6,51	d (2,2)	116,9	7,10	d (2,0)
α	126,4	6,88	d (16,1)	127,7	6,92	d (16,4)
β	127,6	6,96	d (16,1)	129,5	7,00	d (16,4)
C(1')	129,4			135,8		
C(2')	116,0	7,46	d (2,0)	113,3	7,12	d (1,8)
C(3')	145,3			148,3		
C(4')	147,4	7,93 – OH		151,3		
C(5')	115,6	6,83	d (8,3)	123,5	7,01	d (8,3)
C(6')	122,6	7,12	dd (8,3; 2,0)	121,6	7,15	dd (8,3; 1,8)
β -D-глюкопиранозил				β -D-глюкопиранозил		
C(1)	103,4	4,81	d (7,3)	98,5	5,14	d (7,6)
C(2)	73,5	3,52	m	70,5	5,30	m
C(3)	76,9	3,55	m	72,5	5,30	m
C(4)	70,2	3,45	m	68,4	5,13	m
C(5)	76,3	3,53	m	71,9	3,98	m
C(6)	61,4	3,73	m	62,1	4,18	dd (2,5; 12,3)
					4,28	dd (5,8; 12,3)
*CH ₃ CO				20,4–21,1 (7 сигн.)	2,01–2,30 (7 сигн.)	
CH ₃ *CO				168,9–170,6 (7 сигн.)		

Интересно, что гликозидирование осуществляется у соединения **2** в кольце Б, а у соединения **3** в кольце А. Для стильбенов более характерно гликозидирование по кольцу А. Впервые у природных стильбенов гликозидирование в кольце В было установлено А.С. Громовой и соавторами для резвератролозида и пино-стильбенозида, выделенных из луба сосны сибирской (*Pinus sibirica* R. Mayr) [22], позднее эти два гликозида были обнаружены и в лубе сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) [23], выделение из корней ревеня и установление строения соединения **2** впервые описано в работе [17]. В работах [17, 22] для установления места присоединения углеводного остатка в исследуемых стильбеновых гликозидах авторы использовали много-стадийный химический метод. Современные методы ЯМР-спектроскопии позволяют получить однозначные данные о структуре этих соединений.

Таблица 3. Данные спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C пицеида (3) и его ацетата (3а)

Атом	3			3а		
	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	(J/Гц)	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	(J/Гц)
C(1)	139,6			140,6		
C(2)	105,3	6,79	dd (2,2; 1,7)	113,6	6,99	m
C(3)	159,0			158,4		
C(4)	102,6	6,45	t (2,2)	110,4	6,67	t (2,0)
C(5)	158,1	8,35 – OH		152,5		
C(6)	106,9	6,65	dd (2,2; 1,7)	115,3	6,98	m
α	125,2	6,88	d (16,4)	128,2	6,96	d (16,4)
β	128,4	7,07	d (16,4)	130,4	7,06	d (16,4)
C(1')	128,6			135,3		
C(2')	127,5	7,40	d (8,6)	128,5	7,50	d (8,6)
C(3')	115,2	6,82	d (8,6)	122,8	7,10	d (8,6)
C(4')	157,0			151,3		
C(5')	115,2	6,82	d (8,6)	122,8	7,10	d (8,6)
C(6')	127,5	7,40	d (8,6)	128,5	7,50	d (8,6)
β -D-глюкопиранозил				β -D-глюкопиранозил		
C(1)	100,8	4,93	d (7,6)	99,7	5,14	d (7,6)
C(2)	73,5	3,53	m	71,9	5,30	m
C(3)	76,6	3,50	m	73,7	5,30	m
C(4)	70,2	3,45	m	69,2	5,18	d (9,8)
C(5)	76,8	3,50	m	73,5	3,91	m
C(6)	61,5	3,73	m	62,9	4,19	dd (2,3; 12,3)
					4,29	dd (5,5; 12,3)
*CH ₃ CO					22,0–21,4 (6 сигн.)	2,32–2,1 (6 сигн.)
CH ₃ *CO					171,4–170,0 (6 сигн.)	

Спектры ЯМР ^1H соединений **1** и **2** в ароматическом и олефиновом диапазонах содержат сигналы двух олефиновых протонов, трех протонов, характерных для 1,3,5-замещенного бензольного кольца, и сигналы трех протонов кольца пирокатехинового типа (1,3,4-замещенного бензольного кольца) (табл. 1 и 2). Значения КССВ протонов двойной связи ($J = 16,4$ и $16,1$ Гц, соответственно) показывают, что она имеет *транс*-конфигурацию в этих соединениях. Эти данные указывают на 3,3',4',5-тетрагидроксизамещенный *транс*-стильбен – астрингенин.

В спектре ЯМР ^1H соединения **3** также наблюдаются сигналы двух олефиновых протонов, трех протонов, характерных для 1,3,5-замещенного бензольного кольца, и сигналы четырех протонов кольца параксифенильного типа (1,4 - дизамещенного бензольного кольца) (табл. 3). *Транс*-конфигурация протонов двойной связи подтверждается значением КССВ ($J = 16,4$ Гц). Анализ спектральных данных указывает на 3,4',5-тригидроксизамещенный *транс*-стильбен – резвератрол.

В спектрах соединений **2** и **3** кроме сигналов атомов стильбеновых агликонов присутствуют сигналы протонов углеводной единицы. Значения ХС и КССВ аномерного протона (δ 4,81 м.д., d, $J = 7,3$ Гц и 4,93 м.д., d, $J = 7,6$ Гц, соответственно) характерны для О- β -D-глюкопиранозного остатка. Обнаружение глюкозы в гидролизатах соединений **2** и **3** подтверждает, что **2** является глюкозидом астрингенина, а **3** – глюкозидом резвератрола.

Положение гликозидной связи в соединениях **2** и **3** подтверждали данными спектров НМБС и NOESY.

Полная эквивалентность протонов Н-2 и Н-6 (δ 6,51 м.д. (2H, d, $J = 2,2$ Гц) и фенольных гидроксильных 3-ОН и 5-ОН (δ 8,15 м.д.) в кольце А стильбенового фрагмента соединения **2** (астрингенина) предполагает присутствие углеводного заместителя в кольце В. Это однозначно подтверждает наличие кросс-пика сигнала аномерного протона глюкопиранозной единицы с сигналом одного из гидроксизамещенных атомов углерода (δ 145,3 м.д.) кольца В в спектре НМБС соединения **2**. Этот же атом углерода показал взаимодействие с протонами Н-2' (δ 7,46 м.д.), Н-6' (δ 7,12 м.д.) и Н-5' (δ 6,83 м.д.). Эти наблюдения поддерживаются корреляцией в спектре NOESY **2** – аномерного протона (δ 4,81 м.д.) и протона Н-2' (δ 7,46 м.д.) кольца В стильбенового агликаона, показывающей, что углеводная единица присоединена по 3'-положению кольца В. Таким

образом, на основании вышеизложенных данных было установлено строение соединения **2** – (Е)-3,4',5-тригидроксистильбен-3'-О-β-D-глюкопиранозид.

В спектре ЯМР ¹H соединения **3** сигналы протонов Н-2 и Н-6 стильбенового агликаона (резвератрола) не эквивалентны и наблюдаются как два триплета при δ 6,79 и 6,65 м.д. (t, J=2,2 Гц) соответственно. В спектре NOESY ацетата **3a** сигнал протона при аномерном атоме углерода углеводной единицы дал кросс-пики с сигналами протонов Н-2 (δ 6,99 м.д.) и Н-4 (δ 6,67 м.д.), на основании чего было сделано заключение о гликозидировании 3-положения кольца А стильбенового фрагмента. Таким образом, соединение **3** является (Е)-4',5-дигидроксистильбен-3-О-β-D-глюкопиранозидом (пицеидом).

В корке астрингенин присутствует в следовых количествах. Его обнаруживали при разделении этилацетатного экстракта коры лиственницы во фракциях, содержащих мономерные флавоноидные соединения [23], методом ТСХ в вышеприведенных условиях.

Следует отметить, что расположение заместителей в стильбенах **1–3** находится в полном соответствии с 5,7,4'- и 5,7,3',4'-положениями заместителей в ранее обнаруженных флавоноидных соединениях коры лиственниц сибирской и Гмелина [13–16], что, очевидно, обусловлено биогенезом этих соединений.

Выводы

Из луба лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) впервые выделены стильбеновые соединения – астрингенин, астрингенин -3'-О-β-D-глюкопиранозид и пицеид. В ритидоме обнаружен астрингенин.

Список литературы

1. Биохимия фенольных соединений / под ред. Дж. Харборна; пер. с англ. М., 1968. 451.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М., 1993. 272 с.
3. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. Новосибирск, 2000. 664 с.
4. Cuendet M., Potterat O., Salvi A., Testa B., Hostettmann K. A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens* // Phytochemistry. 2000. V. 54. P. 871–874.
5. Jong Pill Lee, Byung Sun Min, Ren Bo An et al. Stilbenes from the roots of *Pleuropteris ciliinervis* and their antioxidant activities // Phytochemistry. 2003. V. 64. P. 759–763.
6. Tombola F., Campello S., De Luka L. et al. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori* // FEBS Letters. 2003. №543. P. 184–189.
7. Pena-Neiro A., Hernandez T., Garcia-Vallejo C., Estrella I., Soares J.A. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin // Eur. Food Res. Technol. 2000. V. 210. P. 445–448.
8. Stecher G., Huck C.W., Popp M., Bonn G.K. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS // Fresenius J. Anal. Chem. 2001. V. 371. P. 73–80.
9. Fuendjiep V., Wandji J., Tillequin F., Mullholland D.A., Budzikiewicz H., Fomum Z.T., Nyemba A.M., Koch M. Chalconoid and stilbenoid glycosides from *Guibourtia tessmannii* // Phytochemistry. 2002. V. 60. P. 803–806.
10. Патент 22944919 C1 РФ. Способ получения резвератрола из растительного сырья / Э.Э. Шульц, Т.Н. Петрова, Н.И. Комарова, Н.Ф. Салахутдинов, Г.А. Толстиков / Б.И., 2007. №7.
11. Громова А.С. Фенольные соединения коры некоторых видов ели, пихты и сосны: дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск, 1975. 160 с.
12. Громова А.С., Луцкий В.И., Тюкавкина Н.А. Стильбены из коры некоторых видов семейства Pinaceae // Химия древесины. 1979. № 3. С. 103–109.
13. Иванова С.З., Федорова Т.Е., Иванова Н.В., Федоров С.В. и др. Флавоноидные соединения коры лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина // Химия растительного сырья. 2002. №4. С. 1–15.
14. Федорова Т.Е., Иванова С.З., Иванова Н.В., Федоров С.В. и др. Лариксидинол – новый спиробифлавоноид из коры лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина // Химия растительного сырья. 2003. №2. С. 5–8.
15. Иванова С.З., Федорова Т.Е., Иванова Н.В., Федоров С.В., Бабкин В.А. Трифлариксинол – новый спирофлавоноид из коры лиственницы // Химия растительного сырья. 2006. №1. С. 37–41.
16. Федорова Т.Е., Иванова С.З., Федоров С.В., Бабкин В.А. Ларизинол – новый спиробифлавоноид из коры лиственницы Гмелина // Химия природных соединений. 2007. №2. С. 172–173.
17. Kashiwada Y., Nonaka G., Nishiora I. Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). VI. Isolation and characterization of stilbenes // Chem. Pharm. Bull. 1984. V. 32. №9. P. 3501–3517.
18. Tatal A., Aburjai. Anti-platelet stilbenes from aerial parts of *Rheum palaestinum* // Phytochemistry. 2000. V. 55. P. 407–410.
19. Nyemba A.M., Ngando Mpondo T., Kimbu S.F., Connolly J.D. Stilbene glycosides from *Guibourtia tessmannii* // Phytochemistry. 1995. V. 39. P. 895–898.
20. Steynberg J.P., Brandt E.V., Burger J.W.F., Bezuidenhoudt B.C.B., Ferreira D. Stilbene glycosides from *Guibourtia coleosperma*: connectivities by homonuclear Nuclear Overhauser Effect difference spectroscopy // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1988. №1. P. 37–41.

21. Громова А.С., Тюкавкина Н.А., Луцкий В.И., Калабин Г.А., Кушнарев Д.Ф. Оксистильбены внутренней коры *Pinus sibirica* // Химия природных соединений. 1975. №6. С. 677–682.
22. Pan H., Lundgren L.N. Phenolics from inner bark of *Pinus sylvestris* // *Phytochemistry*. 1996. V. 42, №4. P. 1185–1189.
23. Гордиенко И.И., Федорова Т.Е., Иванова С.З., Бабкин В.А. Влияние экстрагента на компонентный состав фенольного комплекса, извлекаемого из коры лиственницы Гмелина // *Химия растительного сырья*. 2008. №2. С. 35–38.

Поступило в редакцию 21 февраля 2008 г.