

УДК 615.322

ФЛАВОНОИДЫ *CRATAEGUS CAUCASICA* С. КОСН

В. Б. Кулиев

Институт биоресурсов Нахчыванского отделения Национальной АН Азербайджана
AZ 7000 г. Нахчыван, ул. Бабека 10; E-mail: gbvahid@mail.ru

Статья посвящена изучению флавоноидного состава боярышника кавказского *Crataegus caucasica* С. Косн. Из плодов боярышника впервые выделены флавоноиды кверцетин, гиперозид, рутин и изокверцитрин. Выделенные флавоноиды идентифицированы на основании изучения химических превращений, а также УФ-, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР спектров. **Ключевые слова:** кверцетин, рутин, гиперозид, изокверцитрин, боярышник

В последние годы увеличился интерес к биологическим эффектам флавоноидных соединений. Многие флавоноиды проявляют ряд биологических эффектов, таких как антибактериальные, противовирусные, противовоспалительные, антиаллергические, антитромбические и сосудорасширяющие [1]. Выявлена их способность действовать как антиоксиданты, способные нейтрализовать свободные радикалы и реактивные разновидности кислорода [2]. Некоторые флавоноиды, обладающие антиоксидан-

тной активностью, могут предохранять клетки от повреждений, причиненных свободными радикалами. Ряд фармакологических эффектов боярышника рассматривается как результат действия содержащихся в них флавоноидных и процианидиновых соединений. Поэтому в последнее время флавоноидным соединениям боярышника уделяется большое внимание. Целью данного исследования было изучение флавоноидного состава боярышника кавказского.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плоды боярышника кавказского были собраны в местности Батабат Шахбузского района Нахчыванской Автономной Республики в период полного созревания. Мякоть плодов отделяли от семян и сушили при комнатной температуре и измельчали на кофемолке. 700г измельченного образца экстрагировали 80 %-ным этиловым спиртом при комнатной температуре в течение 6 ч (2 x 3 л). После экстракты фильтровали и концентрировали под вакуумом. Концентрированный экстракт растворяли в определенном объеме дистиллированной воды и последовательно экстрагировали диэтиловым эфиром, хлороформом и бутанолом.

Предварительное тестирование полученных фракций на антиоксидантную активность показало, что этилацетатная фракция характеризуется наибольшей активностью. Поэтому исследовали химический состав этилацетатной фракции. Этилацетатная фракция показала

положительную реакцию на флавоноиды (цианидиновая проба).

Для разделения этилацетатной фракции на компоненты использовали адсорбционную колоночную хроматографию на силикагеле (Silica Gel, 70-140 μ) [3]. Колонку элюировали хлороформом (хл) и смесью хлороформ: метанол (хл/м) по возрастанию полярности элюента и получили 4 фракции: I - хлороформ (2 л); II - 5% хл/м (2.5 л); III - 10 % хл/м (3 л) и IV - 20 % хл/м (1.5 л). Изолированные фракции рехроматографировали на колонке Sephadex LH-20 и выделили 8 веществ, из которых 4 (В, Г, Е, З) оказались флавоноидами. Чистоту и индивидуальность флавоноидных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии (Sulifol F₂₅₄). Химическую структуру полученных веществ определяли методами УФ-, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, хроматографии, химических реакций, а также сравнением полученных результатов с литературными данными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вещество В (Кверцетин). Желтый порошок (из MeOH), $T_{пл}$ 316-317 °C;

УФ спектр (CH₃OH), λ_{max} : 254, 373 нм.

¹H-ЯМР (DMCO-d₆, 200 МГц): δ 6.21 (1H, д, J=1,9 Гц, H-6), 6.44 (1H, д, J=1,9 Гц, H-8), 7.72 (1H, д, J=2.0 Гц, H-2'), 6.92 (1H, д, J=8,5 Гц, H-5'), 7.57 (1H, дд, J₁=8.5, J₂=2.0 Гц, H-6').

¹³C-ЯМР (DMCO-d₆, 50 МГц): δ 148.49 (C-2), 137.40 (C-3), 177.50 (C-4), 162.25 (C-5), 99.91 (C-6), 165.45 (C-7), 95.14 (C-8), 157.94 (C-9), 104.80 (C-10), 123.81 (C-1'), 116.86 (C-2'), 146.69 (C-3'), 149.30 (C-4'), 117.37 (C-5'), 121.81 (C-6') (рис.1).

В ¹H-ЯМР спектре вещества В синглетные сигналы, находящиеся в

области ниже 8.0 м.д., отнесены к протонам гидроксильных групп ароматического кольца, а широкий синглетный сигнал при δ 12.5 м.д. - к протону гидроксила С-5 [4-5]. Два однопротонных дублетных сигналов (J=1.9 Гц) при 6.21 м.д. и 6.44 м.д. отнесены к мета- взаимодействующим протонам H-6 и H-8. Это свидетельствует о наличии в позициях С-5 и С-7 кольца А гидроксильных групп. Два резонанса, находящиеся в области ниже 8.0 м.д., можно отнести к протонам гидроксильных групп С-3' и С-4' кольца Б. Результаты анализа ¹H-ЯМР спектра вещества В показывают наличие в молекуле протонов в позициях С-6, С-8, С-2', С-5', С-6' и гидроксильных групп при С-5, 7 и С-3',4'.

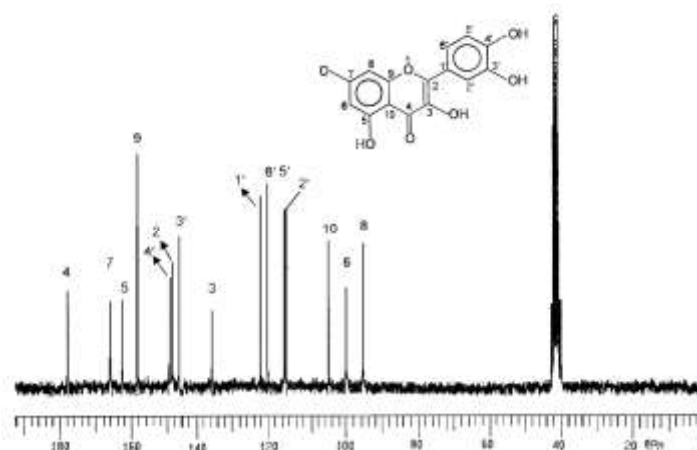


Рис. 1. Спектр ¹³C-ЯМР кверцетина (3,5,7,4-тетрагидроксифлавонола), (DMSO-D₆, 50 MHz).

По литературным данным в ¹³C-ЯМР спектрах флавонолов, С-2 и С-3 резонирует в областях 140.0-151.2 м.д. и 133.5-140.0 м.д, соответственно. Расположение резонанса С-2 по сравнению с С-3 в более низкой области спектра характерный признак флавонолов. На основании этого определяли что вещество В является флавонолом, а сигналы при 137.40 м.д и 148.49 м.д. отнесены к С-3 и С-2, соответственно. Положение сигнала карбонильного углерода флавоноидов является определителем наличия заместителя при С-5. Сигнал при 177.50 м.д.

в спектре свидетельствует о наличии 5-ОН группы [6]. В спектре расположение резонанса С-6 (99.91 м.д.) в области более низкой, чем резонанс С-8 (95.14 м.д), указывает на присутствие в молекуле 5,7-дигидрокси-группы. [7].

На основании изучения УФ-, ИК-, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР спектров и сравнением их литературными данными вещество В было идентифицировано как кверцетин.

Вещество Г (Гиперозид). Вещество слабо желтого цвета, $T_{пл}$ 234-238 °C.

УФ спектр (CH₃OH), λ_{max} : 259, 364 нм

¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 200 МГц): δ δ: 6.22 (1H, с, Н-6), 6.44 (1H, с, Н-8), 7.56 (1H, с, Н-2'), 6.85 (1H, д, J=8.4, Н-5'), 7.68 (1H, д, J=8.4 Гц, Н-6'), 5.38 (1H, д, J=7.7 Гц, Н-1''), 3.58 (1H, д, J=8.1 Гц, Н-2''), 3.43 (1H, дд, J=8.2 и 2.9, Н-3''), 3.68 (1H, д, J=2.6 Гц, Н-4''), 3.30-3.38 (1 Н, м, Н-5''), 3.49 (1H, д, J=4,0 Гц, Н-6'').

¹³C-ЯМР (DMSO-d₆, 50 МГц): δ δ: 157.9 (C-2), 135.27 (C-3), 179.16 (C-4), 162.95 (C-5), 100.66 (C-6), 166.64 (C-7), 95.39 (C-8), 158.12 (C-9), 105.6 (C-10), 122.82 (C-1'), 117.75 (C-2'), 146.66 (C-3'), 150.35 (C-4'), 117.04 (C-5'), 123.70 (C-6'), 103.76 (C-1''), 73.04 (C-2''), 75.05 (C-3''), 69.67 (C-4''), 77.60 (C-5''), 61.88 (C-6'').

Три синглетных и два дублетных сигнала в ¹H-ЯМР спектре вещества Г в области 6-8 м.д. характерны для протонов ароматических колец агликона (рис.2). Два синглетных сигнала при 6.22 м.д. и 6.44 м.д. отнесены к протонам Н-6 и Н-8, которые указывают на присутствие заместителей при С-5 и С-7. Широкий синглет в спектре (12.62 м.д) также свидетельствует о наличии гидроксильной группы у С-5 [7-8]. Протоны Н-5' и Н-6' проявляются при 6.85 м.д. виде дублета, что свидетельствует о наличии заместителей при С-3' и С-4', а протон Н-2' при 7.56 м.д. резонирует в виде синглета.

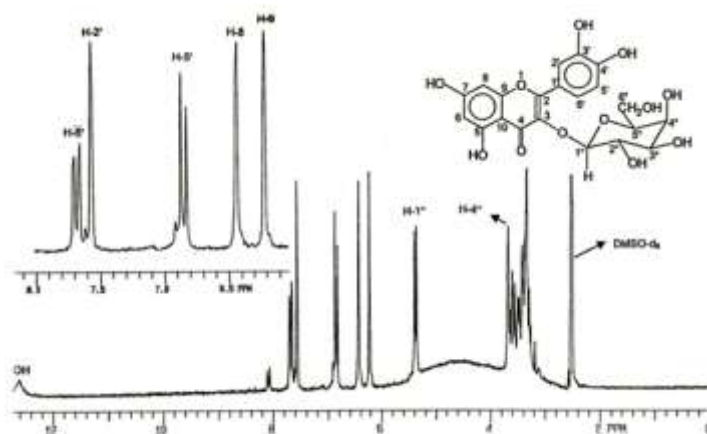


Рис.2. Спектр ¹H-ЯМР гиперозида (кверцетин-3-О-β-D-галактопиранозида), (DMSO-d₆, 50 МГц).

Указанные сигналы характерны для агликона-кверцетина. Однако по сравнению со спектром кверцетина химические сдвиги этих протонов проявляют некоторое смещение. Сигнал Н-6' по сравнению с кверцетином смещен в слабую (0.11 м.д), а Н-2' в сильную (0.16 м.д) область. Эти сдвиги проявляются в результате присоединения сахарного

остатка к положению С-3. Анализ сигналов (3.27-3.69 м.д.), характерных для сахарного остатка, а также наличие однопротонного дублета при 3.68 м.д. (Н-4'', J = 2.6 Гц) показывает, что сахарным остатком гликозида является галактоза. Сигнал аномерного протона галактозы (Н'') в виде дублета (J = 7.7 Гц) свидетельствует о β-конфигурации сахарного остатка.

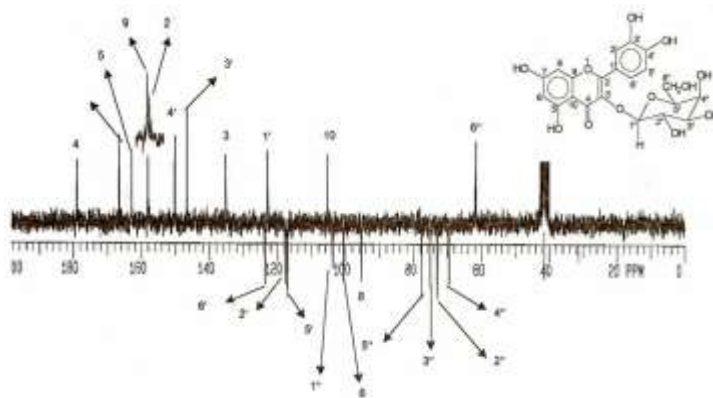


Рис.3. Спектр АПТ ^{13}C -ЯМР гиперозида (кверцетин-3-О- β -D-галактопиранозида), (DMSO-d_6 , 50 MHz)

В спектре ^{13}C -ЯМР вещества сигнал при 135.27 м.д. и 21 сигнал, относящийся к углеродным атомам, указывает принадлежность к флавонол-гликозидам (рис.3). Наличие 5-ти углеродных сигналов в области 6.0-8.0 м.д. также указывает на гликозидную природу вещества. Резонанс аномерного углеродного атома (C-1 β) расположен при 103.76 м.д. Сигналы, относящиеся к агликону, соответствуют сигналам кверцетина, это тоже доказывает, что вещество является флавонол-гликозидом.

Расположение сигнала C-3 вещества по сравнению с тем же сигналом кверцетина на 2.1 м.д. в более сильном поле утверждает указанное. Сигнал атома C-4 (карбонильный углерод) при 179.16 м.д. свидетельствует о наличии C-OH. Сигналы C-6 и C-8 при 100.66 и 95.39 указывают на присутствие гидроксильных групп при C-5 и C-7. На основании результатов анализа ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектров, качественных и хроматографических данных вещество Г идентифицировали как гиперозид (кверцетин-3-О- β -D-галактопиранозид).

Вещество 3 (Рутин). Вещество светло-желтого цвета, $T_{\text{пл}}$ 187- 190 $^{\circ}\text{C}$;

УФ (MeOH), λ_{max} нм. 257, 269, 349, 361.

ИК, ν_{max} (KBr) cm^{-1} . 3285 (OH), 2996, 2852 (C-H), 1635 (C=O), 1450,1552 (C=C), 1206 (C-O-C), 1020

^1H -ЯМР (DMSO-d_6 , 200 МГц): δ : 6.2 (1H, д, H-6), 6.3 (1H, д, J =2.4, H-8), 7.68 (1H, д, J=1.8, H-2'), 6.85 (1H, д, J = 8.5, H-5'), 7.6 (дд, J=8.5-1.8, H-6'), 5.0 (д, J =7.9, H-1''), 3.3 (м, H-2''), 3.3 (м, H-3''), 3.5 (м, H-4''), 3.4 (м, H-5''), 3.35-3.45 (м, H-6''), 4.5 (д, J=1.8, H-1'''), 3.55 (м, H-2'''), 3.65 (м, H-3'''), 3.45 (м, H-4'''), 3.8 (д, J = 9.0, H-5'''), 1.15 (д, J =5.0, H-6''').

^{13}C -ЯМР (DMSO-d_6 , 200 МГц): δ 158.70 (C-2), 135.44 (C-3), 178.85 (C-4), 162.59 (C-5), 102.43 (C-6), 169.90 (C-7), 95.82 (C-8), 158.92 (C-9), 104.43 (C-10), 122.95 (C-1'), 117.51 (C-2'), 145.92 (C-3'), 150.18 (C-4'), 116.09 (C-5'), 123.54 (C-6'), 105.16 (C-1''), 73.91 (C-2''), 77.15 (C-3''), 71.34 (C-4''), 78.19 (C-5''), 68.62 (C-6''), 102.40 (C-1'''), 72.18 (C-2'''), 72.06 (C-3'''), 75.63 (C-4'''), 69.69 (C-5'''), 17.88 (C-6''').

Сигналы в ^1H -ЯМР спектре при 6.2 м.д. (1H, д, J = 1,8 Гц) и 6.3 м.д. (1H, д, J = 2,4 Гц) отнесены к протонам H-6 и H-8 кольца А, а сигналы 7.68 м.д. (1H, д, J =1,8 Гц), 6.85 м.д. (1H, д, J = 8,5 Гц) и 7.6 и. (1H, дд, J =8,5-1,8 Гц) соответственно к протонам H-2', H-5' и H-6'. Результаты показывают, что в позициях C-5, C-7, C-4' и C-3' содержатся гидроксильные группы. Эти данные соответствуют литературным данным. Сигналы 5.0 м.д. (д, J = 7.9 Гц) и 4.5 (д, J= 1.8 Гц) отнесены к аномерным водородным атомам сахарных остатков и свидетельствуют о наличии в структуре вещества остатков двух различных сахаров.

Данные констант спин-спинового взаимодействия аномерных углеродных атомов сахарных остатков указывают нахождение их в β - и α -конфигурациях соответственно.

В спектре ^{13}C -ЯМР сигналы С-3 находятся при 135.44 м.д., а сигналы С-2 и С-4 - при 158.7 м.д. и 178.9 м.д. соответственно. Нахождение сигналов С-2 и С-4 по сравнению агликоном в более низкой области свидетельствует о гликозировании 3-ОН группы [9].

Сигналы атомов С-6 и С-8 (102.43 м.д. и 95.8 м.д.) по сравнению с сигналами С-5 и С-7 ($\delta = 162.6$ м.д. и 169.9 м.д.) расположены в более высокой области, что указывает на замещение атомов С-5 и С-7. Нахождение сигналов атомов С-3' и С-4' ($\delta = 150.2$ и 145.9 м.д.) по сравнению с сигналами С-2' и С-5' (117.5 м.д. и 116.1 м.д.) в более низкой области спектра связано с наличием гидроксильных групп при С-3' и С-4'.

Сигналы при 105.2 м.д. и 102.4 м.д., относящиеся к атомам С-1'' и С-1''', триплет при 66.8 м.д. ($\text{CH}_2\text{-OH}$) и квартет при 17.9 (CH_3) указывают, что сахарными остатками в молекуле являются β -D-глюкоза и α -L-рамноза. Сигнал атома С-6'' глюкозного остатка при 68.6 м.д. свидетельствует о присоединении рамнозы к глюкозе посредством С-6''. Данные,

полученные для вещества 3 соответствуют литературным данным, приведенным для рутина [10].

Вещество Е (Изокверцитрин). Вещество желтоватого цвета, $T_{\text{пл}}$ 234-236 °С;

УФ-спектр: λ_{max} в этаноле 256, 267 пл., 370 нм.

Соединение при кислотном гидролизе дает агликон, идентифицированный как кверцетин и глюкоза. Кроме того, данный гликозид расщепляется под воздействием β -глюкозидазы, что свидетельствует о β -связи с агликоном. Батхромный сдвиг длинноволновой полосы в УФ-спектре агликона в присутствии AlCl_3 (60 нм) в отличие от исходного соединения (+42 нм) позволяет сделать вывод о том, что гликозилирована 3-ОН-группа. Следовательно, совокупность спектральных данных и результатов химических превращений, а также непосредственное сравнение с достоверно известным образцом позволяет идентифицировать соединение как 3-О- β -D-глюкопиранозид кверцетина (изокверцитрин).

Т.о. впервые из плодов боярышника кавказского выделены кверцетин, рутин, гиперозид и изокверцитрин.

Кроме указанных флавоноидов, из плодов боярышника выделены протокатеховая и хлорогеновая кислоты, а также катехин и урсоловая кислота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cook, N. C., Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. // Nutr. Biochem. 1996. Vol. 7. № 2. P. 66-76.
2. Jung, H. A.; Jung, M. J.; Kim, J. Y. Et. al. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxy radical generation.// Arch. Pharm. Res. 2003. Vol. 26. № 10. P. 809-815.
3. Кулиев В.Б., Чакыр А. β -ситостерин и урсоловая кислота из плодов боярышника. // Химические проблемы. 2009. № 3. с. 487-492.
4. Berghofer R, Hoelzl J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3,II8-biapigenin. // Planta Med. 1987. Vol. 53. № 2. P. 216-217.
5. Williams C.A., Harborne J.B. The Flavonoids: The Favonoids Advances in Research. 1986.
6. Cardona L, Fernandez I, Pedro J.R, et.al. Xanthones from *Hypericum reflexum*. // Phytochemistry.1990. Vol. 29. № 9. P. 3003-3006.
7. Kim H.J., Woo E.R., Park H. A Novel Lignan and Flavonoids from *Polygonum aviculare*. // J. Nat. Prod. 1994. Vol.57. № 5. P. 581.
8. Liang H., Liang., Weimen Y. New Flavonol Glycoside from *Epimedium acuminatum*. // J. Nat. Prod. 1993. Vol. 56. № 6. P. 943-945.
9. Markham K.R, Ternai B., Stanley, R. et. al.

Carbon-13 NMR studies of Flavonoids-III Naturally Occurring Flavonoid. //Tetrahedron. 1978. 34. P.1389-1397.

10. Webby R.F., Markham K.R. Flavonol 3-O-triglycosides from Actinidia species. // Phytochemistry. 1990. Vol. 29. №1. P. 289-292.

CRATAEGUS CAUCASICA C. KOCH FLAVONOİDLƏRİ

V.B.Kuliyev

Məqalədə *Crataegus caucasica* (yemişan) meyvələrinin flavonoid tərkibi öyrənilib. Meyvələrin etanol ekstraktından adsorbsiyon xromatoqrafik metodla flavonoidlərin ayrılması, saflaşdırılması aparılıb və alınan maddələrin İQ-, UB-, $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ spektrlərinin tədqiqi və kimyəvi çevrilmələri əsasında quruluşları müəyyən edilib. İlk dəfə olaraq *Crataegus caucasica* meyvələrindən kversetin, hiperozid, rutin və izokversitrin kimi flavonoidlər alınmışdır.

Açar sözlər: kversetin, hiperozid, rutin, izokversitrin

FLAVONOIDS OF CRATAEGUS CAUCASICA C. KOCH

V.B.Kuliyev

The article deals with the study of flavonoid compound of caucasian hawthorn. Flavonoids quercetin, hyperozide, rutin and isoquercitrin have been obtained from hawthorn fruits. These flavonoids have been identified through the study of chemical transformations, as well as UV-, $^1\text{H-NMR}$ - and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra.

Keywords: quercetin, hyperozide, rutin, isoquercitrin, hawthorn

Поступила в редакцию 23.05.2011