

Распространение 20-гидроксиэкдизона и его аналогов в растениях

The spread of 20-hydroxyecdysone and its analogues in plants

Беспяева А.М., Тулеуов Б.И., Хабдолда Г., Турмухамбетов А.А., Тулеуова Б.К.,
Исайынова Л.А., Куатбаев О.У., Адекенов С.М.

Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда (E-mail: arglabin@phyto.kz)

Қазақстан флорасы өсімдіктерінің ішінен 20-гидроксиэкдизонды және оның аналогтарын іздеу бойынша жүргізілген зерттеулердің қорытындылары келтірілді. Олардың *Amaranthaceae* Juss., *Caryophyllaceae* Juss., *Chenopodiaceae* Vent. және *Asteraceae* Dumort тұқымдастары, *Lychnis* L., *Silene* L., *Rhaponticum* Adans, *Serratula* L. туыстары, *Lychnis chalconica* L., *Kochia prostrata* L., *Silene cretaceae* Fisch., *Serratula coronata* L. және *Silene wolgensis* (Hornem) Bess. түрлері сияқты тиімді көздері анықталды.

The studies were carried out to search for 20-hydroxyecdysone and its analogs among plants in the flora of Kazakhstan. There were determined their long-term sources which were families of *Amaranthaceae* Juss., *Caryophyllaceae* Juss., *Chenopodiaceae* Vent. and *Asteraceae* Dumort., genus *Lychnis* L., *Silene* L., *Rhaponticum* Adans, *Serratula* L., species of *Lychnis chalconica* L., *Kochia prostrata* L., *Silene cretaceae* Fisch., *Serratula coronata* L. and *Silene wolgensis* (Hornem) Bess.

Несмотря на уникальность и богатое разнообразие местной флоры (более 6000 видов) ранее работы по химии, технологии и фармакологии фитоэктистероидов в Казахстане не проводились, и, учитывая острую необходимость разработки оригинальных отечественных адаптогенных, анаболических и тонизирующих средств, в холдинге «Фитохимия» с 2000 г. начато систематическое исследование растений нашей республики, перспективных в качестве сырья для получения 20-гидроксиэктистерона (20E) или эктистерона (2 β ,3 β ,14 α ,20R,22R,25-гексагидрокси-5 β (H)-холест-7-ен-6-он) — действующего вещества многих адаптогенных препаратов.

Поиск эктистерона также особо необходим в связи с тем, что на всех этапах стандартизации адаптогенных и анаболических средств в ряду сырья – субстанция – препарат для оценки его подлинности и количественного определения действующего вещества он используется в качестве внешнего стандарта — стандартного образца [1].

Приступая к работе по поиску эктистерона и выявлению закономерностей распространения других эктистероидов среди растений Казахстана, прежде всего было необходимо разработать методологию самого скрининга: какими методами анализировать растительные образцы и какие виды растений отбирать для анализа [2].

По данным Л.Н.Зибаревой [3], в последние годы поиск перспективных эктистероидсодержащих видов нередко ведется путем химического изучения родовых комплексов, поскольку это является достаточно испытанной и надежной методикой.

В этой связи нами также для скрининга привлекались виды, представляющие неисследованные растения наиболее перспективных родов из эктистероидсодержащих семейств изучаемой флоры. Образцы, которые по данным тонкослойной хроматограммы и научной литературы предположительно содержали эктистероиды, далее подвергали анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Поскольку к настоящему времени эктистерон является самым распространенным фитоэктистероидом и известно его хроматографическое поведение, то на основании сопоставления времен удержания анализируемых соединений и эктистерона — стандартного образца в различных хроматографических системах — можно было предполагать структуру не только 20-гидроксиэктистерона, но и некоторых родственных эктистероидов. При особой необходимости для идентификации фитоэктистероидов применялись методы масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа.

Несмотря на то, что содержание эктистероидов может сильно варьироваться даже у близкородственных видов, доказано, что среди представителей определенных семейств и родов эктистероидсодержащие виды встречаются чаще, чем в произвольно отобранных растениях [4, 5].

Флора Центрального Казахстана не богата экистероидсодержащими видами, и в этой связи, с целью выявления перспективных для выращивания в данном регионе экистероидсодержащих растений, в качестве объектов исследования были выбраны некоторые роды *Rhaponticum* Adans. и *Serratula* L. семейств *Asteraceae* Dumort., *Caryophyllaceae* Juss. (роды *Lychnis* L. и *Silene* L. и др.), *Amaranthaceae* Juss. и *Chenopodiaceae* Vent.

Для исследований был отобран 41 вид растений (собраны в 2000–2011 гг. в фазе цветения в окрестностях г. Караганды, в Карагандинской области, Казахском Алтае и на коллекционном участке холдинга «Фитохимия») указанных выше семейств, хорошо отзывающихся на условия культуры, способных формировать значительную фитомассу и полноценные семена в условиях резко-континентального климата Центрально-Казахстанского региона. Исключением является перспективный экистероидсодержащий вид *Lychnis chalconica* L., который на территории Центрального Казахстана встречается редко, только среди луговой растительности, и в условиях культуры отличается худшей, чем в природных местообитаниях жизнеспособностью.

Все исследуемые виды *Caryophyllaceae* Juss. встречаются на территории Казахстана в природных местообитаниях. Из видов *Chenopodiaceae* Vent. и *Amaranthaceae* Juss. только *Chenopodium hybridum* L. и *Kochia prostrata* L. являются представителями местной флоры. Семена остальных видов данных семейств получены из ботанических садов Франции и Португалии. *Amaranthus caudatus* L., *A. paniculatus* L. и *Saponaria officinalis* L. часто используются по всему Казахстану для оформления клумб, *Agrostemma githago* L. и *Chenopodium hybridum* L. — широко распространенные на территории Казахстана сорные виды.

На первом этапе исследован выход экстрактивных веществ, извлекаемых 70 %-ным этанолом, а далее методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) (Zorbax RX C-18, «Agilent Technologies», США, длина 150 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, размер частицы сорбента 5 мкм, температура колонки 40 °С, подвижная фаза (ПФ) — метанол–вода (1:1), скорость потока 0,2 мл/мин; УФ-детектирование в области 192–798 нм) изучено содержание экистерона (табл.).

При этом установлено, что среди исследованных растений перспективным источником экистерона являются *Lychnis chalconica* L. (0,45 % экистерона в пересчете на вес воздушно-сухого сырья надземной части в фазе цветения.), *Kochia prostrata* L. (0,40 % в фазе цветения), *Saponaria calabrica* Guss. (0,1 % в фазе цветения), *Serratula gmelinii* Tausch. (0,22 %), *Serratula radiata* (Waldst. et Kit.) M.B. (0,20 %), *Serratula coronata* L. (1,5 %), *Silene cretaceae* Fisch. (0,51 %) и *Silene wolgensis* (Hornem) Bess (1,76 %), остальные исследованные растения содержат значительно меньше данного компонента.

Установлено, что содержание экистерона в надземной части *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pijl, собранного из культуры, достигает 0,60 % в фазу отрастания. В корнях *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pijl, в зависимости от фенофазы, содержание экистерона стабильно (0,18–0,30 %) и достигает максимума в фазу покоя (октябрь). В корнях *Rhaponticum serratuloides* (Georgi) Bobr. экистерон накапливается в количестве от 0,10 до 0,12 %. В надземной части указанного растения максимальное количество экистерона отмечено в фазу отрастания (0,12 %) — в процессе развития побегов оно снижается (0,11 % в период бутонизации и цветения) [6].

Т а б л и ц а

Содержание экистерона в исследованных видах растений

Семейство	Вид	Содержание экистерона, % от веса воздушно-сухого сырья
1	2	3
<i>Amaranthaceae</i> Juss.	<i>Amaranthus blitum</i> L.	0,016
	<i>Amaranthus cruentus</i> L.	0,015
	<i>Amaranthus paniculatus</i> L.	0,050
	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	0,050
	<i>Amaranthus powellii</i> S.	0,026
	<i>Amaranthus gangeticus</i> L.	0,016
	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	0,026

1	2	3
Caryophyllaceae Juss.	<i>Cucubalus baccifer</i> L.	0,013
	<i>Minuartia Kryloviana</i> Schischk.	0,003
	<i>Melandrium noctiflorum</i> (L.) Fries	0,005
	<i>Arenaria stenophylla</i> Ldb.	0,005
	<i>Lychnis chalconica</i> L.	0,45
	<i>Lychnis coronaria</i> L.	0,07
	<i>Lychnis yunnanensis</i> Franch.	0,016
	<i>Lychnis alba</i> Mill.	0,003
	<i>Agrostemma githago</i> L.	0,027
	<i>Agrostemma gracile</i> L.	0,021
	<i>Gypsophila patrinii</i> Ser.	0,04
	<i>Gypsophila elegans</i> Bieb.	0,023
	<i>Dianthus giganteiformis</i> D.	0,013
	<i>Saponaria officinalis</i> L.	0,07
	<i>Saponaria calabrica</i> Guss.	0,1
	<i>Saponaria hausknechtii</i> Simml.	0,020
	<i>Saponaria ocymoides</i> L.	0,021
	<i>Gypsophila acutifolia</i> Fisch.	0,021
	<i>Vaccaria hispanica</i> Mill. Rausehert.	0,010
	<i>Silene altaica</i> Pers.	0,14
	<i>Silene cretaceae</i> Fisch.	0,51
<i>Silene fruticulosa</i> (Pall.) Schischk	0,08	
<i>Silene wolgensis</i> (Hornem) Bess.	1,76	
Chenopodiaceae Vent.	<i>Chenopodium giganteum</i> D.	0,060
	<i>Chenopodium guinoa</i> Willd.	0,040
	<i>Chenopodium hybridum</i> L.	0,030
	<i>Kochia prostrata</i> L.	0,40
Asteraceae Dumort.	<i>Serratula gmelini</i> Tausch.	0,22
	<i>Serratula cardunculus</i> (Pall.) Schischk	0,61
	<i>Serratula kirghisorum</i> Ilijin	0,06
	<i>Serratula radiata</i> (Waldst. et. Kit) M.B.	0,20
	<i>Serratula quinquefolia</i> M.B.	0,03
	<i>Serratula erucifolia</i> (L.) Boriss.	0,1
	<i>Serratula coronata</i> L.	1,5

Помимо экистерона из *Rhaponticum serratuloides* (Georgi) Bobr. выделен новый С-29 экистероид, содержащий аллильную гидроксильную группу при углеродном атоме С-29 — расерстерон (2 β ,3 β ,14 α ,20R,22R,29-гексагидрокси-5 β (H)-стигмаст-7,24(28)-диен-6-он) и новый экистероид 25-эпи-амарастерон А (2 β ,3 β ,14 α ,20R,22R,26-гексагидрокси-5 β (H)-стигмаст-7-ен-6-он), структура которого установлена с применением спектральных методов (ИК-, УФ-, масс-, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры, ^1H - ^1H и ^1H - ^{13}C COSY-эксперименты), а также впервые обнаруженный в растении *Silene cretaceae* Fisch. 2-дезоксизон (3 β ,14 α ,22R,25-тетрагидрокси-5 β (H)-холест-7-ен-6-он), строение молекулы которого установлено с применением рентгеноструктурного анализа (рис. 1, 2).

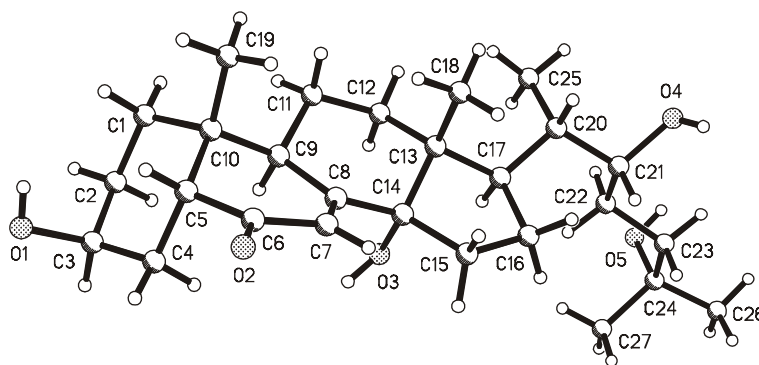


Рис. 1. Пространственное строение молекулы 2-дезоксизона

Проведение рентгеноструктурного исследования 2-дезоксизекдизона было связано с тем, что при изучении стереохимии дегидроксилирования указанного выше вновь выделенного фитоэктистероида установлено, что в Кембриджском банке структурных данных не было обнаружено сведений по его кристаллической и молекулярной структуре.

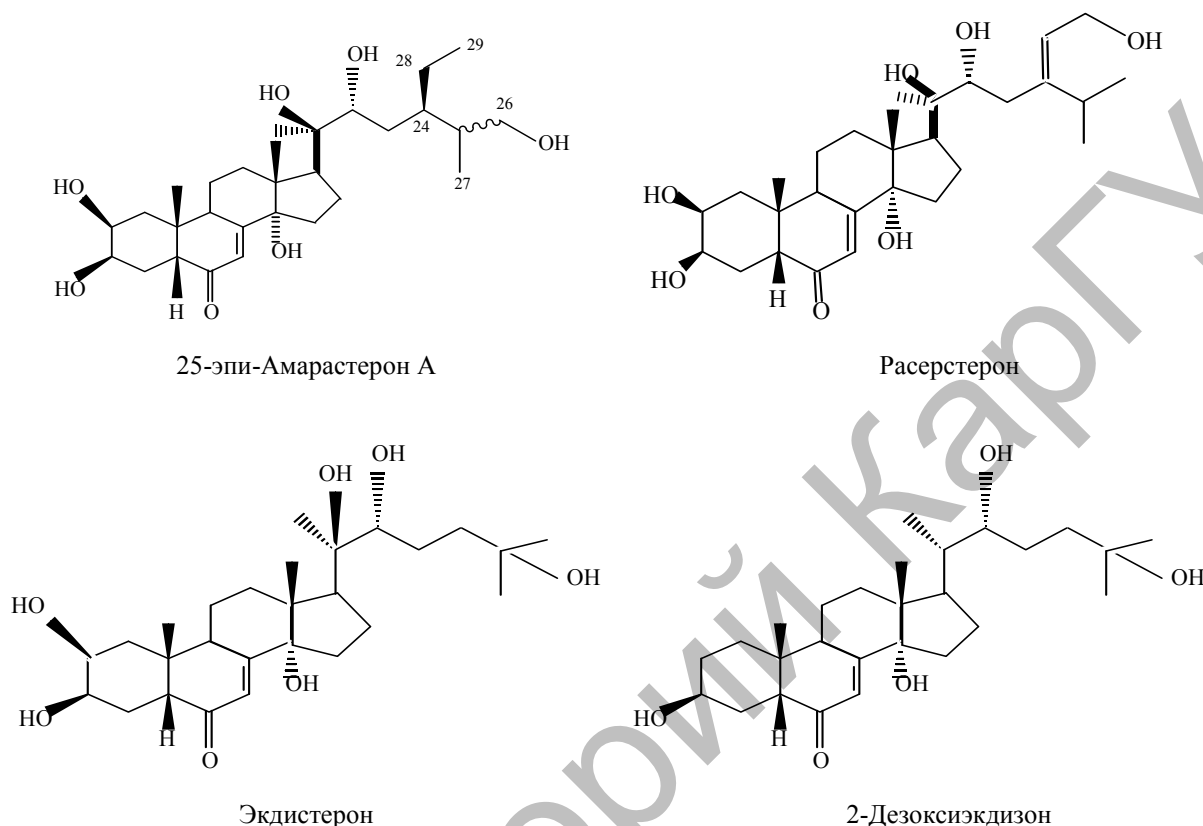


Рис. 2. Структурные формулы эктистерона и новых фитоэктистероидов

Таким образом, результаты химического скрининга на содержание эктистерона среди 41 вида растений показали, что количественное содержание 20E обнаружено в *Silene wolgensis* (Hornem) Bess., превосходящее его содержание в *Serratula coronata* L., что в дальнейшем открывает перспективность использования данного вида — сверхконцентрактора в качестве одного из основных источников эктистерона.

References

1. ТРА РК 42–1322–04 Ecdysterone — standard sample.
2. Tuleuov B.I. Steroid compounds of plants and medicines on their basis. Search, chemical modification and practical aspects of the application. — Karaganda: Glasir, 2009. — 208 p.
3. Zibareva L.N. Avtoref. dis. ... doct. chem. sciences. — Novosibirsk, 2003. — 31 p.
4. Lafon P. Phytoecdysteroids and world flora: diversity, distribution and evolution // Physiology of plants. — 1998. — Vol. 45. — № 3. — P. 326–346.
5. Revina T.A., Revushkin A.S., Rakitin A.V. Ecdysteroid species in the flora of the Mountain Altai // Plant resources. — 1998. — Vol. 24. — № 4. — P. 565–570.
6. Berdin A.G. Optimization of number of cuts and productivity of *Rhaponticum carthamoides* (Willd) Ilijn. in Central Kazakhstan // Development of chemistry and prospects of creation of new preparations. — Book 2. — Almaty: Gylym, 2004. — P. 341–356.