



УДК 547.475.02

НЕНАСЫЩЕННЫЕ ПОЛИОКСИКИСЛОТЫ С ПРОСТАГЛАНДИНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ *BRYONIA ALBA* L.

I. ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ФРАКЦИИ

Навосян А. Г., Аветисян Г. М., Мнацаканян В. А.,
Асатрян Т. А., Вартамян С. А.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Минджояна
Академии наук АрмССР, Ереван

Боролян Р. Г.

Ереванский государственный медицинский институт

Батраков С. Г.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Из корней *Bryonia alba* L. выделена фракция ненасыщенных жирных полиоксикислот, обладающая простагландиноподобной активностью. Методами ИК- и ПМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также на основании результатов анализа продуктов озонлиза основные компоненты фракции идентифицированы как 9,12,13-триокси-10-транс-15-цис-октадекадиеновая и 12,15,16-триокси-9-цис-13-транс-октадекадиеновая кислоты. Обсуждаются возможные пути биогенеза указанных триоксикислот.

Поиск новых природных источников простагландинов, а также их аналогов, отличающихся специфичностью действия и достаточной метаболической стабильностью, имеет большое практическое значение. В качестве одного из достижений такого рода исследований можно назвать обнаружение простагландинов в кораллах *Plexaura homomalla* [1, 2], которые до сих пор являются самым богатым, хотя и труднодоступным, источником этих веществ. Изучение распространения простагландинов среди животных показало, что они синтезируются не только позвоночными, но и низшими видами [3]. Правда, их содержание в тканях последних (за исключением вышеупомянутых кораллов *P. homomalla*) чрезвычайно низкое — 1—500 нг/г [3].

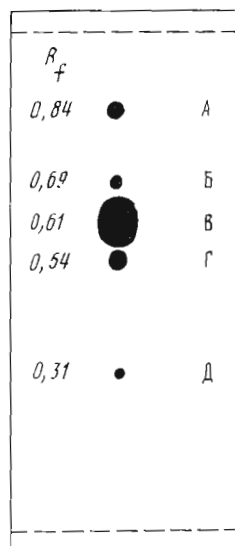
В литературе имеются лишь два сообщения [4, 5] о поисках простагландинов в растениях, которые, однако, не привели к однозначным результатам. В связи с этим нами предпринят поиск веществ с простагландиноподобной активностью в корнях переступня белого (*Bryonia alba* L.), дикого растения семейства тыквенных (Cucurbitaceae), распространенного в Европе, Азии и Америке. Переступень издавна используется для приготовления лекарственных средств в гомеопатии и народной медицине [6, 7]. В частности, в

Армении настои и отвары корня этого растения (местное название «лоштак») с древнейших времен применяются для лечения язв желудочно-кишечного тракта, астмы, опухолей, глазных болезней, для снижения кровяного давления, как кровоостанавливающее, abortивное и родовспомогательное средство [8, 9], т. е. именно в тех областях, в которых считается перспективным использование простагландинов.

В ходе исследования корня *B. alba* мы выделили жирорастворимую фракцию полиоксикислот (ФПОК), которая в опытах *in vitro* в концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ г/мл вызывала повышение тонуса гладкой мускулатуры (отрезка толстой кишки и полоски дна желудка крысы, прямой кишки и матка и рога матки морской свинки); активность ФПОК в указанных тестах составляла от 0,03 до 0,05% активности простагландина E_1 . Добавление к препаратам ФПОК полифлоретинфосфата — специфического антагониста простагландинов [10, 11] — снижало их активность на 35,5%. Это дает основание предположить, что соединения, входящие в состав фракции, взаимодействуют с рецепторами простагландинов. ФПОК оказывала также заметное влияние на агрегацию тромбоцитов: введение ФПОК кроликам породы шиншилла в дозе 10 мкг/кг веса увеличивало время retrакции сгустка крови с $23,5 \pm 1,4$ до $71,0 \pm 5,1$ мин.

Для выделения активной ФПОК свежесобранные или высушенные корни *B. alba* экстрагировали трис-буфером (pH 8) или органическими растворителями — изопропанолом, смесью хлороформа с метанолом (2 : 1) или метанолом. Применение того или иного из перечисленных экстрагентов не оказывало существенного влияния на конечный выход ФПОК, но при обработке больших количеств корня экстракция метанолом оказалась самой удобной. Экстракт подвергали фракционированию на колонке с DEAE-целлюлозой, после чего ФПОК выделяли хроматографией фракции, содержащей оксикислоты, на колонке с силикагелем.

При ТСХ на силикагеле во всех испытанных нами системах растворителей полученная ФПОК мигрировала в виде одного пятна (зоны). Однако метиловые эфиры, образовавшиеся в результате обработки ФПОК диазо-метаном, разделились при ТСХ на пять субфракций (рисунок). На долю одной из них (субфракция В) приходилось ~ 60% суммарных метиловых эфиров ФПОК. Триметилсилилирование субфракции В и последующий газохроматографический анализ триметилсилиловых производных (ТМСИ) показали, что эта доминирующая субфракция также в свою очередь гетерогенна и представляет собой смесь двух веществ, причем количественное соотношение более летучего ТМСИ и менее летучего равно ~ 3. В настоящем сообщении описываются результаты изучения структуры оксикислот (I) и (II), соответствующих указанным ТМСИ*.



ТСХ метиловых эфиров активной ФПОК из *B. alba*, система $CHCl_3$ — ацетон (1 : 1), обнаружение 50%-ной H_2SO_4 (~200°)

* Здесь в дальнейшем шифр «I» относится к оксикислоте, отвечающей более летучему доминирующему ТМСИ; производные этой кислоты имеют шифр «I» с соответствующим буквенным индексом; шифр «II» используется для обозначения оксикислоты и ее производных (с буквенным индексом), отвечающих менее летучему ТМСИ. Шифр «III» относится к метиловому эфиру гидрированной оксикислоты (I), производные этого эфира имеют шифр «III» с буквенным индексом; для обозначения метилового эфира гидрированной оксикислоты (II) используется шифр «IV» (для производных с буквенными индексами).

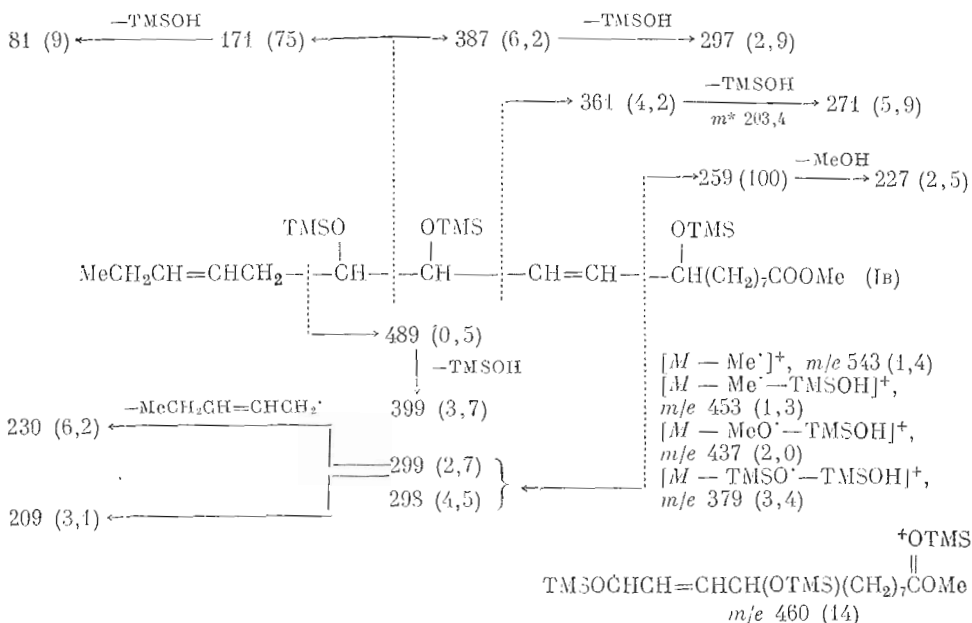
Наши попытки разделить субфракцию В, т. е. выделить индивидуальные метиловые эфиры оксикислот (Ia) и (IIa), методами адсорбционной или распределительной хроматографии оказались безрезультатными. Разделение не удалось и после превращения оксифиров (Ia) и (IIa) в ацетильные производные (Iб) и (IIб). Однако некоторые сведения о строении оксифиров (Ia) и (IIa) удалось получить на основании данных ИК-, ПМР- и масс-спектров субфракции В.

ИК-спектр субфракции В содержал полосы валентных колебаний связей Н—О спиртовых гидроксильных групп (широкая полоса с максимумом около 3400 см^{-1}), винильных связей С—Н (3012 см^{-1}), сложноэфирного карбонила (1740 см^{-1}); заметных полос других функциональных групп не наблюдалось. Полоса поглощения при 3012 см^{-1} исчезала после мягкого каталитического гидрирования субфракции В, так же как и полосы гидроксильных групп после ее ацетилирования.

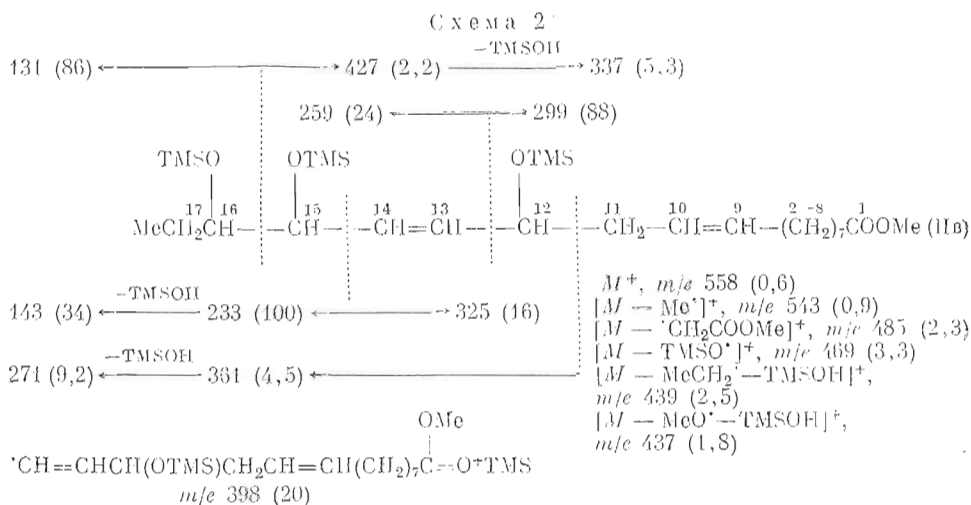
В масс-спектре ацетилированной субфракции В — смеси ацетоксиэфиров (Iб) и (IIб), — полученной методом десорбции полем, присутствовал только один пик молекулярного иона — с m/e 468, откуда можно заключить, что ацетоксиэфиры (Iб) и (IIб) являются изомерами. В масс-спектре смеси оксифиров (Ia) и (IIa) (субфракция В), полученном методом ионизации полем, единственный наблюдаемый молекулярный ион имел m/e 342. Таким образом, каждый из изомерных ацетатов — (Iб) и (IIб) — должен содержать по три ацетильных, а каждый из оксифиров — (Ia) и (IIa) — по три гидроксильных группы.

Наиболее информативные элементы спектра ПМР субфракции В (см. «Экспериментальную часть», ср. [4, 12—17]) — сигналы от протонов С-метиловых групп, метильной группы карбометоксильной группировки, метиленовой группы, соседней с этой группировкой, метиленовых групп, связанных с ненасыщенными углеродными атомами, характерный интенсивный узкий мультиплет от протонов метиленовых групп алифатических цепей и два мультиплета от винильных протонов двух типов. Подсчет площадей под перечисленными сигналами, а также под сигналами от протонов ацетильных групп в спектре ПМР смеси ацетоксиэфиров (Iб)

Схема 1*



* На схемах 1—3 и 5 указываются массовые числа образующихся ионов, в скобках — их относительная интенсивность в %. TMS = Me₃Si.

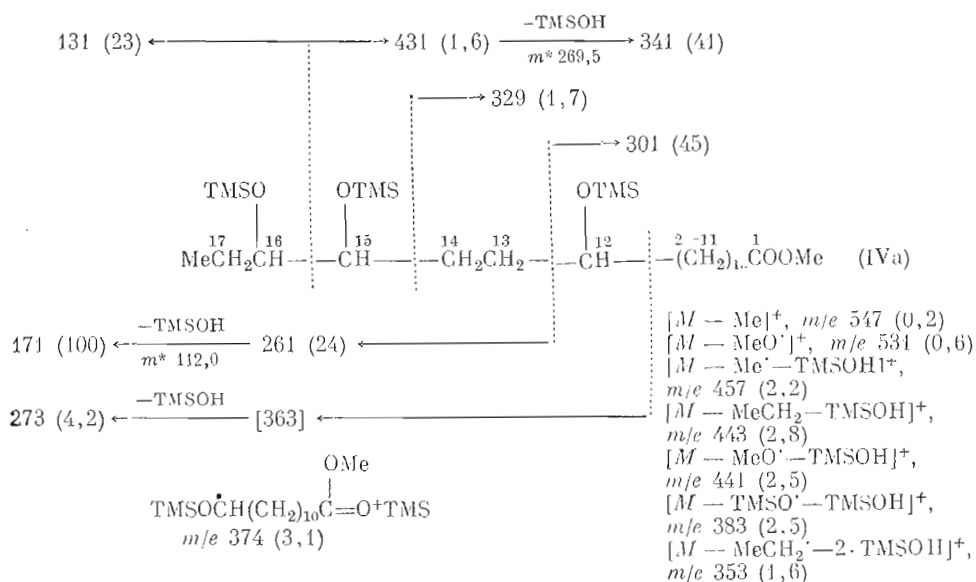


и (IIб) дал возможность установить, что молекула каждого компонента субфракции В — (Iа) и (IIа) — содержит по одной карбометоксильной и С-метильной группе, три оксигруппы и две двойные связи. Спектр ПМР гидрированной субфракции В (см. «Экспериментальную часть»), т. е. смеси насыщенных метиловых эфиров (III) и (IV), имеет характерные особенности спектра ПМР метиловых эфиров нормальных насыщенных жирных оксикислот. Совокупность вышеописанных результатов исследования субфракции В приводит к выводу, что она состоит из метиловых эфиров двух изомерных триокси-*n*-октадекадиеновых кислот; длина углеводородных цепей кислот рассчитана по приведенным выше масс-спектрометрическим данным.

Дальнейшую информацию о структуре компонентов субфракции В дал анализ методом ГЛХ-масс-спектрометрии их ТМСЭ (Iв) и (IIв), а также ТМСЭ (IIIа) и (IVа) продуктов гидрирования субфракции В. Масс-спектр более летучего при ГЛХ ТМСЭ (Iв) близко совпадал с масс-спектром ТМСЭ метилового эфира 9,12,13-триоксип-10-транс-15-цис-октадекадиеновой кислоты [12]. Более того, масс-спектр ТМСЭ (IIIа) доминирующего компонента гидрированной субфракции В оказался весьма сходным с масс-спектром ТМСЭ метилового эфира 9,12,13-триоксиоктадекановой кислоты [13, 18]. На основании этих фактов мы приписали основному компоненту субфракции В строение метилового эфира 9,12,13-триокси-10,15-октадекадиеновой кислоты (Iа). Поскольку в цитированной выше работе [12] масс-спектр ТМСЭ указанного диенового триоксиэфира практически не обсуждается, ниже приводится схема распада под электронным ударом молекулярного иона ТМСЭ (Iв), подтверждающая его строение (схема 1; ср. [13—15, 18]).

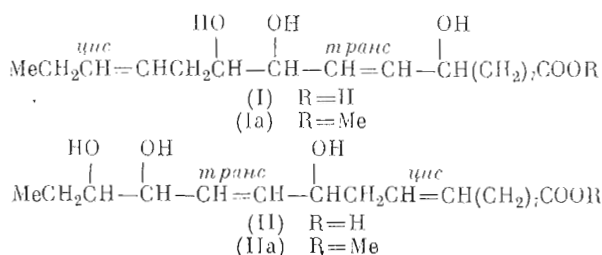
Отнесение основных пиков масс-спектра ТМСЭ (IIв) минорного компонента субфракции В (схема 2) сделано по аналогии с вышерассмотренными масс-спектрами, а также на основании имеющихся в литературе данных о масс-спектрометрическом поведении ТМСЭ эфиров жирных полиокси-кислот [12—15, 18, 19]. Это дало возможность предложить для ТМСЭ (IIв) структуру, изображенную на схеме 2. Расположение одной из двойных связей при C₍₁₃₎ углеводородной цепи молекулы вытекает из сравнения масс-спектров ТМСЭ (IIв) и его гидрированного аналога — ТМСЭ (IVа) (см. схему 3). Так, присутствующий в спектре ТМСЭ (IIв) пик фрагмента с *m/e* 427, содержащего атомы C₍₁₎ — C₍₁₅₎ углеводородной цепи, сдвигается в спектре насыщенного ТМСЭ (IVа) в область больших массовых чисел на 4 единицы; в то же время значение *m/e* иона, включающего участок цепи C₍₁₎ — C₍₁₂₎ (*m/e* 299), увеличивается всего лишь на 2 массовые единицы. На столько же возрастает массовое число иона с *m/e* 259, в состав которого входят атомы C₍₁₃₎ — C₍₁₈₎.

Схема 3



Данные масс-спектров ТМСП (IIв) и (IVа) не позволяют ответить на вопрос о локализации второй двойной связи. Для выяснения этого элемента структуры мы подвергли озонолизу ацетилованную субфракцию В, т. е. смесь ацетатов (Iб) и (IIб). Продукты озонолиза, главным образом ацетоксикислоты, анализировали в виде метиловых эфиров методом ГЖХ-масс-спектрометрии. В результате были идентифицированы метиловые эфиры 2,3-диацетоксиглутаровой (V), 2-ацетоксисебациновой (VI), 2,3-диацетоксипентановой (VII), 2-ацетоксиянтарной (VIII) и азелаиновой (IX) кислот. Происхождение перечисленных кислот достаточно ясно из схемы 4. Следует лишь подчеркнуть, что присутствие в озонлизате азелаиновой кислоты однозначно указывает на локализацию второй этиленовой связи оксифира (IIа) при $\text{C}_{(6)}$ углеводородной цепи.

Конфигурация двойных связей в молекулах оксифиров (Iа) и (IIа) следует из обсуждавшегося выше спектра ПМР субфракции В. В области слабого поля спектр содержит два двухпротонных мультиплета от винильных протонов (δ 5,42 и 5,71 м. д.). Согласно литературным данным, относящимся к ПМР-спектроскопии аналогичных соединений [12—17], сигнал при δ 5,42 м. д. принадлежит винильным протонам группировки *цис*- $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$, а узкий мультиплет при δ 5,71 м. д. — винильным протонам группировки *транс*- $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}=\text{CHCH}(\text{OH})$. Таким образом, компонентами субфракции В являются метиловые эфиры 9,12,13-триокси-10-*транс*-15-*цис*-октадекадиеновой (Iа) и 12,15,16-триокси-9-*цис*-13-*транс*-октадекадиеновой (IIб) кислот, а соответствующие кислоты (I) и (II) представляют собой доминирующие компоненты активной фракции полиоксикислот корня *B. alba*.



Основные характеристичные пики в масс-спектре смеси бензолборонатов (Iг) и (IIг)

| m/e | Относительная интенсивность, % | Брутто-формула | Тип иона | m/e | Относительная интенсивность, % | Брутто-формула | Тип иона |
|-------|--------------------------------|--------------------|----------------|-------|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| 428 | 0,6 | $C_{25}H_{37}BO_5$ | M^+ | 253 | 4,9 | $C_{16}H_{18}BO_2$ | $\sigma-H_2O$ |
| 410 | 21,4 | $C_{25}H_{35}BO_5$ | $M-H_2O$ | 253 | 0,3 | $C_{15}H_{25}O_3$ | σ' |
| 399 | 0,2 | $C_{23}H_{32}BO_3$ | e' | 241 | 4,5 | $C_{15}H_{18}BO_2$ | ξ |
| 397 | 0,5 | $C_{24}H_{34}BO_4$ | $M-MeO^+$ | 237 | 9,6 | $C_{14}H_{23}O_3$ | $e--PhBO--H_2O$ |
| 381 | 1,6 | $C_{22}H_{30}BO_3$ | $e'-H_2O$ | 235 | 3,8 | $C_{15}H_{23}O_2$ | $\sigma'-H_2O$ |
| 379 | 3,8 | $C_{24}H_{32}BO_4$ | $M-MeO^+ H_2O$ | 231 | 12,9 | $C_{12}H_{16}O_3$ | σ' |
| 357 | 2,6 | $C_{22}H_{28}BO_3$ | $e'-MeOH$ | 227 | 1,2 | $C_{13}H_{20}O_3$ | σ' |
| 359 | 0,6 | $C_{20}H_{28}BO_5$ | e | 221 | 2,0 | $C_{14}H_{21}O_2$ | $\sigma'-MeOH$ |
| 341 | 5,9 | $C_{20}H_{26}BO_4$ | $e-H_2O$ | 215 | 14,5 | $C_{13}H_{16}BO_2$ | δ |
| 327 | 2,1 | $C_{19}H_{24}BO_3$ | $e'-MeOH$ | 200 | 8,4 | $C_{12}H_{17}BO_2$ | $\delta'-H$ |
| 309 | 0,9 | $C_{19}H_{22}BO_3$ | $e-H_2O-MeOH$ | 187 | 3,6 | $C_{10}H_{19}O_3$ | a |
| 306 | 4,5 | $C_{19}H_{20}O_3$ | $M-PhBO-H_2O$ | 175 | 21,4 | $C_{10}H_{17}BO_2$ | δ' |
| 295 | 0,4 | $C_{17}H_{27}O_3$ | $e'-PhBO$ | 167 | 6,2 | $C_{10}H_{15}O_2$ | $\sigma-PhBO$ |
| 277 | 8,4 | $C_{17}H_{25}O_3$ | $e'-PhBO-H_2O$ | 149 | 10,8 | $C_{10}H_{13}O$ | $\sigma-PhBO-H_2O$ |
| 271 | 6,0 | $C_{16}H_{20}BO_3$ | a | 137 | 8,8 | $C_8H_{13}O$ | $\delta-PhBO$ |
| 263 | 2,2 | $C_{16}H_{18}O_3$ | $e'-PhBO-MeOH$ | 127 | 6,3 | $C_7H_{11}O_2$ | $\sigma'-PhBO$ |
| 255 | 1,6 | $C_{14}H_{23}O_4$ | $e-PhBO$ | 109 | 23,8 | C_7H_9O | $\delta-PhBO-H_2O$ |
| | | | | 97 | 22,8 | C_8H_9O | $\delta'-PhBO$ |

* Указываются борсодержащие ионы с изотопом ^{11}B .

** Максимальную интенсивность имеет ион $[C_6H_5BO_3]^+$ с m/e 159, вероятно, образующийся в результате перегруппировочных процессов.

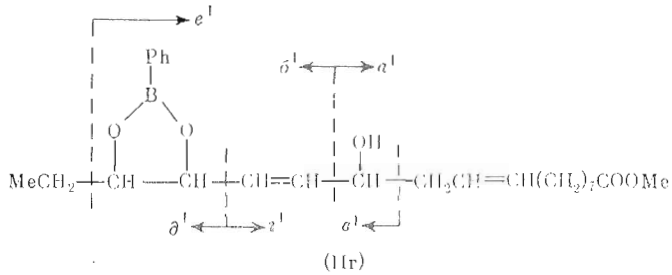
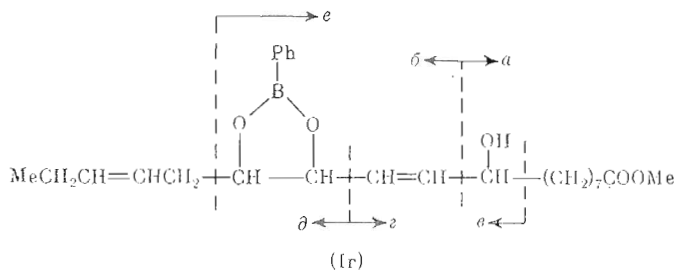
кислотой. Наиболее интенсивные пики в масс-спектрах субфракции В и гидрированной субфракции В при $m/e > 100$ (схема 5) принадлежат ионам, образующимся при разрыве связи у гидроксильированного углеродного атома, ближайшего к карбометоксильной группе, и локализации заряда на карбонилсодержащем фрагменте. Правильность отнесения этих пиков подтверждается их смещением на 3 массовые единицы в область больших массовых чисел в спектре смеси дейтерометилловых эфиров (d_3 -III) и (d_3 -IV), которую мы получили путем переэтерификации гидрированной субфракции В с тридеутерометанолом. Из приведенных масс-спектрометрических данных следует, что ближайший к карбометоксильной группе гидроксил расположен при $C_{(9)}$ в одном из оксифиров (Iа) и при $C_{(12)}$ — в другом (IIа), т. е. так, как это демонстрируют формулы.

Масс-спектрометрический анализ алкил- и арилборонатных производных эфиров жирных α -диоксикислот представляет собой распространенный метод определения положения α -гликольной группировки в углеводородных цепях кислот указанного типа [20]. Одним из основных направлений распада молекулярных ионов подобных боронатов является элиминирование алкильных заместителей 1,3-диокса-2-боронатового цикла, что позволяет установить локализацию последнего в алифатической цепи.

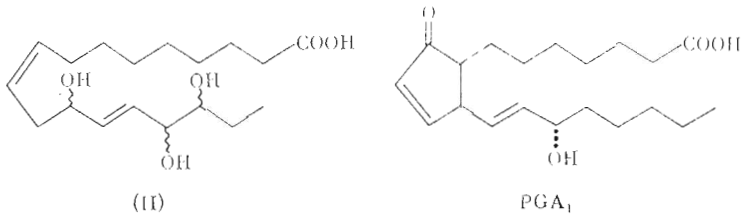
Как можно видеть из схемы 6 и таблицы, данные масс-спектра смеси бензолборонатов (Iг) и (IIг) находятся в полном соответствии со структурами (Iа) и (IIа), предложенными для компонентов субфракции В.

В последнее время появились сообщения, согласно которым некоторые синтетические аналоги простагландинов с открытой углеродной цепью (секо-простагландины) обладают определенными видами простагландиновой активности и связываются рецепторами простагландинов [21]. Предполагается, что это сходство биологических свойств определяется близостью молекулярных размеров простагландинов и их секо-аналогов. Наличие соответствующим образом расположенной несопряженной *цис*, *транс*-диеновой системы в молекуле описанной в настоящем сообщении окси-

Схема 6



кислоты (II) позволяет рассматривать ее как отдаленный аналог природных соединений простанового ряда.



Что касается биосинтеза оксикислот (I) и (II), то их предшественником, несомненно, является линоленовая кислота, которая в значительных количествах входит в состав корня *B. alba* [22]. Ранее [12] было установлено, что в присутствии липоксигеназы пшеничной муки линоленовая кислота подвергается быстрому и высокоспецифичному 9-гидропероксидированию. Последующие превращения 9-гидроперекиси приводят к возникновению диеновой триоксикислоты (I), а также 9-окси-10-*транс*-12-*цис*-15-*цис*-октадекатриеновой и 9-окси-10-*кето*-12-*цис*-15-*цис*-октадекадиеновой кислот. По имеющимся литературным данным, действие липоксигеназ растений на линоленовую кислоту отличается высокой позиционной специфичностью [12, 23]. В связи с этим вызывает интерес происхождение триоксикислоты (II). Ее молекула содержит такую же, как и у триоксикислоты (I), 1,4,5-триокси-2-*транс*-пентеновую группировку, смещенную, однако, на 3-углеродных атома к терминальной метильной группе. Принципиально к кислоте (II) может приводить та же последовательность превращений линоленовой кислоты, в результате которой образуется кислота (I), но гидропероксидирование линоленовой кислоты в таком случае должно происходить по атому C₍₁₂₎. Это в свою очередь заставляет предположить, что *B. alba* продуцирует либо неспецифически действующую липоксигеназу, либо два позиционно-специфичных энзима.

Экспериментальная часть

Для хроматографии на колонках применяли силикагель марки КСК (100—150 меш), который предварительно обрабатывали ранее описанным способом [24]. ТСХ проводили микрометодом Светашева и Васильковского [25] на силикагеле той же марки. Хроматограммы проявляли в следующих системах растворителей: 1) CHCl_3 — MeOH — вода, 60 : 10 : 1; 2) CHCl_3 — MeOH — AcOH — вода, 95 : 5 : 1 : 0,8; 3) бензол — диоксан — AcOH , 20 : 20 : 1; 4) CHCl_3 — ацетон, 1 : 1; 5) CHCl_3 — CH_2Cl_2 , 1 : 5. Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием: а) 50% серной кислотой с последующим нагреванием пластинок при 180—200°; б) 1% раствором ванилина в 15% фосфорной кислоте с последующим нагреванием при 90°; в) 0,2% спиртовым раствором морина (пятна и зоны веществ наблюдали в УФ-свете); г) 2% водным раствором ацетата меди; д) периодатом — реактивом Шиффа [26]; е) парами иода.

ИК-спектры регистрировали на спектрографе UR-10 (Carl Zeiss, ГДР) в пленке вещества, спектры ПМР — на приборе XL-100 (Varian, США) в CDCl_3 при рабочей частоте 100 МГц, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре Polamat (Carl Zeiss, ГДР) в этилацетате. Масс-спектры высокого разрешения (ионизация электронным ударом) измеряли на масс-спектрометре MS-902 (Англия) с системой обработки данных DS-30 при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющем напряжении 3 кВ и разрешающей способности 10 000; температура испарения образцов ~ 80°. Масс-спектрометрический анализ с десорбцией полем и ионизацией полем проводили на приборе Varian MAT CN-5 DF (США), снабженном комбинированным источником для ионизации электронным ударом, полем и десорбции полем. При получении масс-спектров методом десорбции полем в качестве эмиттера использовали вольфрамовую проволоку диаметром 10 мкм, активированную бензонитрилом при высокой температуре; ток нагрева эмиттера 15 мА, напряженность поля 10 кВ. Масс-спектры с ионизацией полем получали при напряжении 9 кВ. Для комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии применяли хромато-масс-спектрометр LKB 9000 (Швеция); разделение смесей на компоненты осуществляли на колонке (1500 × 2 мм) с 3% SE-30 на Gas Chrom Q (80—100 меш), газ-носитель — гелий (30 мл/мин). Газохроматографический анализ ТМСП проводили на хроматографе Chrom-41 (ЧССР), снабженном колонкой (1500 × 4 мм) с 5% SE-30 на Chromaton N-AW (75—90 меш) и пламенно-ионизационным детектором, в изотермическом режиме при 248°, газ-носитель — аргон (60 мл/мин).

При определении биологической активности полиоксикислот в качестве стандартов использовали простагландины E_1 и $F_{2\alpha}$, выпускаемые фирмой Urjohn (США). Сокращение отрезков изолированных гладкомышечных органов (дно желудка и толстая кишка белых крыс, прямая кишка цыпленка и рог матки морской свинки) в аэрируемом растворе Кребса — Генслайта регистрировали при помощи кимографа. В состав среды перфузии входили также (в мкг/мл) метизергид (0,1), атропин (1,0), мепирамин (0,1), пропранол (4,0), феноксibenзамин (0,2) и индометацин (1,0). Процесс биотестирования начинали с контроля ареактивности тканей к стандартным растворам ацетилхолина, серотонина, гистамина, адреналина и норадреналина (конечная концентрация 1,0 мкг/мл). Расчет активности ФПОК производили относительно активности простагландина E_1 (0,05 мкг) в том же опыте. Растворы испытываемых образцов готовили по ранее описанной методике [27]. В качестве специфического блокатора действия простагландинов применяли полифлорентифосфат (фирма АВLeo, Швеция). Влияние ФПОК на время ретракции сгустка крови в опытах *in vivo* изучали на кроликах породы шиншилла модифицированным методом Хиршбека (см. [28]).

Экстракция корней V. alba. а) Мелкопореженные корни (6 г), собранные в различных районах Армении, перемешивали 2 ч при 20—22° с 10 мл 0,2 М трис-буфера (рН 8,0), смесь фильтровали, твердый осадок повторно подвергали вышеописанной операции. Объединенные фильтраты подкисляли до рН 3,6 щавелевой кислотой и экстрагировали охлажденным до 0—5° эфиром (3 × 30 мл). Объединенный эфирный экстракт упаривали досуха, остаток высушивали в вакууме, получили 42 мг смеси веществ. Аналогично экстрагировали высушенные корни.

б) Свежие мелкопореженные корни (200 г) гомогенизировали 2 мин при 20—22° с 500 мл смеси CHCl_3 — MeOH (1 : 2). Гомогенат фильтровали, твердый осадок повторно гомогенизировали 5 мин с 500 мл той же смеси растворителей. Смесь фильтровали, осадок промывали 150 мл MeOH, 400 мл смеси CHCl_3 — MeOH (1 : 1) и 300 мл смеси CHCl_3 — MeOH (2 : 1). После упаривания объединенных фильтратов и высушивания остатка в вакууме получили 6,1 г смеси веществ.

в) Свежие мелкопореженные корни (200 г) гомогенизировали 5 мин при 60° с 500 мл изопропанола, гомогенат фильтровали, твердый осадок гомогенизировали 5 мин при 20° с 500 мл смеси изопропанол — CHCl_3 (1 : 1). Смесь фильтровали, осадок промывали 500 мл той же смеси растворителей и 300 мл CHCl_3 . После упаривания объединенных фильтратов и высушивания остатка получили 4,8 г смеси веществ.

г) Высушенные и измельченные корни (4226 г) заливали 4 л MeOH и оставляли на сутки при 20—22°, жидкую фазу декантировали, к твердому остатку снова добавляли 4 л MeOH и смесь выдерживали 24 ч, указанную операцию повторяли еще 8 раз. Объединенный экстракт упаривали, после высушивания остатка получали 705 г (16,4% от веса сухих корней) смеси веществ.

Фракционирование экстракта корней V. alba. Метанольный экстракт корней (50 г) растворяли в 200 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8), раствор экстрагировали эфиром (3 × 300 мл), объединенный экстракт упаривали до объема ~ 200 мл и экстрагировали 1/15 М фосфатным буфером (рН 8,0; 3 × 100 мл). Объединенные водиче вытяжки подкисляли 6 н. соляной кислотой до рН 3,6 и экстрагировали эфиром (3 × 500 мл). Экстракт сушили безводным Na_2SO_4 , упаривали досуха, остаток (260 мг) растворяли в 5 мл CHCl_3 , раствор наносили на колонку с 15 г DEAE-целлюлозы (AcO⁻-форма). Вымывали последовательно 400 мл CHCl_3 , 600 мл смеси CHCl_3 — MeOH (9 : 1), 1700 мл смеси CHCl_3 — MeOH (7 : 3) и 1000 мл MeOH. Элюат, полученный при вымывании смесью (7 : 3), упаривали досуха, остаток (52 мг) растворяли в 2 мл CHCl_3 и раствор наносили на колонку (30 × 1 см) с 10 г силикагеля. Вымывали последовательно смесями CHCl_3 — этилацетат — EtOH — 24 : 6 : 2, 24 : 6 : 3 и 24 : 6 : 5 (по 120 мл). После упаривания элюатов, собранных при вымывании двумя последними смесями растворителей, получили 29 мг (~ 0,01% от веса сухих корней) ФНОК, мигрирующей в виде одного пятна при ТСХ в системах 1—4; R_f 0,1 (в системе 1), 0,4 (2), 0,4 (3), 0,1 (4).

Разделение метиловых эфиров ФНОК. Выделение субфракции В. Раствор 340 мг ФНОК в 1 мл MeOH обрабатывали избытком раствора диазометана в эфире (20°, 10—15 мин), после чего смесь упаривали досуха. Раствор остатка в 5 мл CHCl_3 наносили на колонку (60 × 2,8 см) с 35 г силикагеля. Вымывали последовательно 300 мл CHCl_3 и смесями CHCl_3 — MeOH — 200 : 1, 200 : 2, 200 : 3, 200 : 4 и 200 : 5 (по 250 мл), собирая элюаты в пробирки по 15 мл. Элюаты анализировали при помощи ТСХ в системе 4. Системой CHCl_3 — MeOH (200 : 1) вымывали 30 мг субфракции А (см. рисунок), 200 : 2 — 68 мг смеси субфракций Б, В и Г, системами 200 : 3 и 200 : 4 — 139 мг смеси субфракций В и Г, системой 200 : 5 — 12 мг смеси субфракций Г и Д. Элюаты, содержащие субфракцию В, объединяли, упаривали досуха, остаток хроматографировали в тех же условиях. При вымывании смесью CHCl_3 — MeOH (200 : 4) получали элюаты, содержащие

17 мг хроматографически индивидуальной субфракции В — смеси оксиэфиров (Ia) и (IIa); $[\alpha]_D^{23} +7,6 \pm 0,6^\circ$ (с 0,37).

Спектр ПМР (δ , м. д.): 0,97, 3H, мультиплет (C — CH₃); 1,32, мультиплет [(CH₂)_n алифатической цепи]; 2,06, 4H, кватер (=C—CH₂); 2,25, 2H, триплет, J 6,5 Гц (CH₂COO); 3,3—4,2, 6H, мультиплет (O—C—H и O—H); 3,63, 3H, синглет (COOCH₃); 5,42, 2H, мультиплет (=C—H); 5,71, 2H, мультиплет (=C—H).

Ацетилирование субфракции В. Смесь 15,8 мг субфракции В, 0,5 мл пиридина и 0,5 мл As₂O оставляли на 24 ч при 20—22°, после чего упаривали досуха. Остаток растворяли в 1 мл CH₂Cl₂, раствор наносили на колонку (30 × 1 см) с 10 г силикагеля, вымывали 50 мл CH₂Cl₂. После упаривания элюата получали 16,0 мг смеси ацетоксиэфиров (Iб) и (IIб), которая при ТСХ в системе 5 мигрировала в виде одного пятна с R_f 0,2. ИК-спектр: 3015 (ν_{C-H}), 1743 ($\nu_{C=O}$), 1240 (ν_{C-O}), 697 (γ_{C-H}) см⁻¹.

Гидрирование субфракции В. Раствор 10 мг субфракции В в 5 мл этилацетата перемешивали 2 ч в атмосфере H₂ при 20° с 20 мг PtO₂. Катализатор отфильтровывали и промывали на фильтре этилацетатом. После упаривания объединенного фильтрата получали 10 мг смеси насыщенных оксиэфиров (III) и (IV), мигрирующей при ТСХ в системе 4 в виде одного пятна с R_f 0,61. ИК-спектр: 1745 ($\nu_{C=O}$), 1242, 1060 (ν_{C-O}) см⁻¹.

Спектр ПМР (δ , м. д.): 0,94, 3H, триплет, J 6,5 Гц (C—CH₃); 1,32, мультиплет [(CH₂)_n алифатической цепи]; 2,1—2,3, 6H, мультиплет (O—C—H и O—H); 2,30, 2H, триплет, J 6,5 Гц (CH₂COO); 3,65, 3H, синглет (COOCH₃).

Деютерометилловые эфиры (d₃-III) и (d₃-IV). Смесь 2 мг гидрированной субфракции В и 1 мл 1% раствора конц. H₂SO₄ в CD₃OD кипятили 4 ч, по охлаждении нейтрализовали дауэксом 1 × 8 (HO⁻), смолу отфильтровывали, промывали 3 мл MeOH и 3 мл SiCl₄. Объединенный фильтрат упаривали досуха, остаток наносили в 0,1 мл CHCl₃ на пластинку (6 × 9 см) для препаративной ТСХ со слоем (0,25 мм) силикагеля. Хроматограмму проявляли в системе 3, затем сушили 15 мин на воздухе, осыпывали 0,2% спиртовым раствором морина и снова сушили 30 мин на воздухе. Зону основного вещества (R_f 0,6) обнаруживали в УФ-свете, отделяли и экстрагировали смесью CHCl₃ — MeOH (5 : 1; 3 × 5 мл). После упаривания объединенного экстракта получали 1,1 мг смеси деютерометилловых эфиров (d₃-III) и (d₃-IV).

Бензолборонаты (Iг) и (IIг). К раствору 1,4 мг субфракции В в 1 мл сухого диоксана добавляли 0,8 мг бензолбороновой кислоты. Смесь оставляли на 1 ч при 20—22° и упаривали досуха. Остаток растворяли в 3 мл сухого бензола, раствор упаривали досуха, эту операцию повторяли 4—5 раз, после чего сухой остаток подвергали масс-спектрометрическому анализу.

ТМСИ (Iв) и (IIв) получали обработкой 0,5—1 мг субфракции В 0,2 мл смеси N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида и триметилхлорсилана (5 : 1 по весу) при 20° в течение 2 ч. Реакционную смесь анализировали методами ГЖХ (время удерживания Iв и IIв соответственно 8,0 и 9,4 мин) и ГЖХ-масс-спектрометрии (температурный режим колонки: 180 → 250°, 3 град/мин).

Озонолиз ацетилированной субфракции В — смеси ацетоксиэфиров (Iб) и (IIб) (см. [29]). В раствор 6 мг смеси ацетатов (Iб) и (IIб) в 2 мл CHCl₃ в течение 20 мин при —60° пропускали кислород, содержащий озон, после чего смесь нагревали до 20°, обрабатывали 2 мл AsOH, 0,4 мл 3% H₂O₂ и выдерживали 13 ч при 55°. Реакционную смесь упаривали досуха, остаток обрабатывали избытком эфирного раствора диазометана и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии; температурный режим колонки при ГЖХ: 60 → 280° (8 град/мин). Масс-спектры продуктов озонолиза (V—IX) сопоставляли с ранее опубликованными масс-спектрами тех же соединений [30] или (п) с измеренными нами для заведомых образцов.

Авторы выражают глубокую благодарность чл.-кор. АН СССР Л. Д. Бергельсону за участие и большую помощь при обсуждении результатов настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weinheimer A. J., Spraggins R. L. (1969) *Tetrahedron Lett.*, 59, 5185—5188.
2. Schneider W. P., Hamilton R. D., Rhuland L. E. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 2122—2123.
3. Nomura T., Ogata H. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, 431, 127—131.
4. Albro P. W., Fishbein L. (1971) *Phytochemistry*, 10, 631—636.
5. Attrep K. A., Mariani J. M., Jr., Attrep M., Jr. (1973) *Lipids*, 8, 484—486.
6. Иорданов Д., Николов Л., Бойчинов А. (1970) *Фитотерапия*, с. 118, «Медицина и физкультура», София.
7. Гамерман А. Ф., Гром И. И. (1976) *Дикорастущие лекарственные растения СССР*, с. 245, «Медицина», М.
8. Золотницкая С. Я. (1965) *Лекарственные ресурсы флоры Армении*, т. 2, с. 283, Изд. АН АрмССР, Ереван.
9. Сенетчан Л. О. (1949) *Лекарственные растения Армении и их лечебные препараты*, т. 1, с. 106, Изд. АН АрмССР, Ереван.
10. Eakins K. E., Karim S. M. M., Miller J. D. (1970) *Brit. J. Pharmacol.*, 39, 556—563.
11. Eakins K. E., Miller J. D., Karim S. M. M. (1971) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 176, 441—447.
12. Graveland A. (1973) *Lipids*, 8, 606—611.
13. Graveland A. (1970) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 47, 352—361.
14. Heimann W., Dresen P. (1973) *Helv. chim. acta*, 56, 463—469.
15. Sessa D. J., Gardner H. W., Kleiman R., Weisleder D. (1977) *Lipids*, 12, 613—619.
16. Tallent W. H., Harris J., Wolff I. A. (1966) *Tetrahedron Lett.*, 4329—4334.
17. Gardner H. W., Weisleder D. (1972) *Lipids*, 7, 191—193.
18. Streckert G., Stan H.-J. (1975) *Lipids*, 10, 847—854.
19. Argondelis C. J., Perkins E. G. (1968) *Lipids*, 3, 379—381.
20. Brooks C. J. W., Maclean I. (1971) *J. Chromatogr. Sci.*, 9, 18—24.
21. Bicking J. B., Robb C. M., Smith R. L., Cragoe E. J., Jr., Kuehl F. A., Jr., Mandel L. R. (1977) *J. Med. Chem.*, 20, 35—43.
22. Паносян А. Г., Димазян Э. Р., Аветисян Г. М., Мнацаканян В. А. (1977) *Арм. хим. ж.*, 30, 255—262.
23. Galliard T., Phillips D. R. (1971) *Biochem. J.*, 124, 431—438.
24. Batrakov S. G., Panosian A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 337, 29—40.
25. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) *J. Chromatogr.*, 67, 376—378.
26. Shaw N. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, 164, 435—436.
27. Бороян Р. Г. (1974) *Ж. эксперим. и клин. мед.*, 4, 23—29.
28. Годоров И. (1963) *Клинические лабораторные исследования в педиатрии*, с. 404, «Медицина и физкультура», София.
29. Hamberg M., Samuelsson B. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 257—263.
30. Stenhagen E., Abrahamsson S., McLafferty F. W. (1967) *Atlas of Mass Spectral Data*, Interscience Publishers, a Division of John Wiley and Sons, N. Y., London, Sydney, Toronto.

Поступила в редакцию

3.VII.1978

После доработки

28.VIII.1978

UNSATURATED POLYHYDROXY ACIDS HAVING PROSTAGLANDIN-LIKE ACTIVITY FROM *BRYONIA ALBA* L. I. THE MAJOR COMPONENTS

OF THE FRACTION

PANOSYAN A. G., AVETISYAN G. M., MNATZAKANYAN V. A., ASATRYAN T. A.,
VARTANYAN S. A., BOROYAN R. G., BATRAKOV S. G.

A. L. Mujoyan Institute of Fine Organic Chemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Erevan; Erevan State Medical Institute; M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The fraction of unsaturated polyhydroxy fatty acids revealing prostaglandin-like activity has been isolated from the roots of *Bryonia alba* L. On the basis of IR and PMR spectroscopy, mass spectrometry and ozonolysis experimental data, the major components of the fraction have been identified as 9,12,13-trihydroxy-*trans*-10,*cis*-15-octadecadienoic and 12,15,16-trihydroxy-*cis*-9,*trans*-13-octadecadienoic acids. Possible biogenesis pathways of the above trihydroxy acids have been discussed.