

Тритерпеноиды пихты и высокоэффективный регулятор роста растений на их основе

В. А. Ралдугин

ВИКТОР АЛЕКСЕЕВИЧ РАЛДУГИН — доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории терпеновых соединений Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Область научных интересов: структура и свойства терпеноидов.

630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 9, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, тел. (3832)34-47-32, E-mail raldugin@nioch.nsc.ru

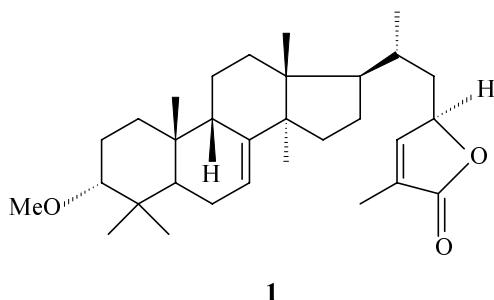
Общая информация о пихте

Пихты — лесообразующие хвойные деревья, распространенные преимущественно в горных районах северного полушария, где они образуют темнохвойные леса. В настоящее время в роде пихта (*Abies* Mill.) выделено 56 ботанических видов, семь представителей которых имеют природные ареалы на территории Российской Федерации, причем доминирующим среди них является пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb.) [1]. Последняя хорошо известна как источник получения целебной пихтовой живицы [2], концентрирующейся в коре дерева, а также пихтового эфирного масла, извлекаемого из пихтовой лапки перегретым водяным паром [3]. Пихтовая живица и пихтовое масло являются, по сути, природными смесями веществ одного класса — терпеноидов, причем основными компонентами живицы являются моно- и дитерпеноиды [4], а пихтового масла — монотерпеноиды.

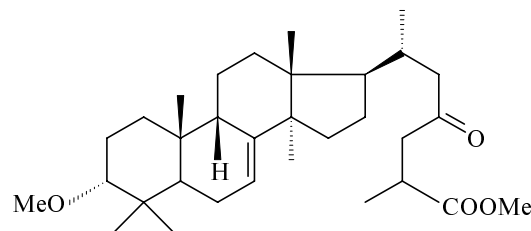
Особенностью пихт является наличие в них тритерпеноидов со структурно модифицированным ланостановым углеродным скелетом, что отличает эти древесные растения от елей, лиственниц и сосен, входящих в то же самое ботаническое семейство (*Pinaceae* Lindl.).

Тритерпеноиды пихты

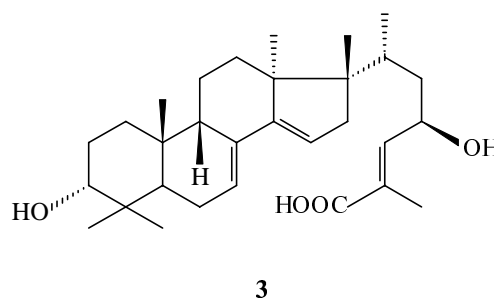
С 1938 г. известен тритерпеновый лактон с ланостановым углеродным скелетом — абислактон [5], химическое строение молекулы которого (формула 1) было установлено с помощью рентгеноструктурного анализа лишь в 1971 г. [6]. Японские химики, предложившие первоначальный вариант структуры абислактона [7], провели широкое тестирование этого вещества на различные виды биологической активности, но чего-либо интересного им обнаружить не удалось.



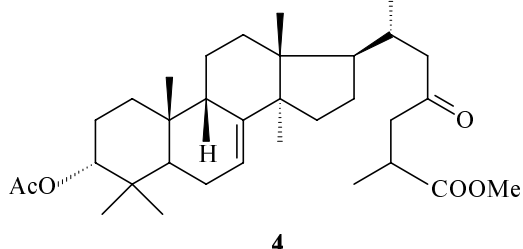
Первые обнадеживающие результаты были опубликованы в 1990 г. другой группой японских исследователей [8], но они касались не самого абислактона, а его химических производных с насыщенной боковой цепью. Было обнаружено, в частности, что дигидрокетоэфир 2 перспективен для дальнейшего углубленного тестирования на противоопухолевую активность, но эти исследования, по-видимому, не привели к более интересным результатам и какие-либо новые публикации по этому вопросу не обнаружены.



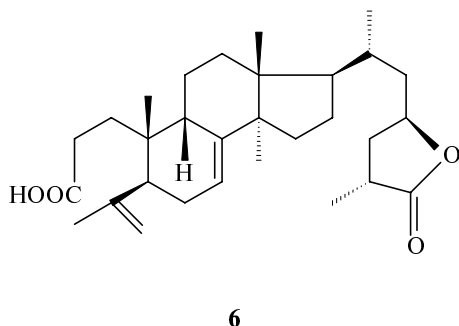
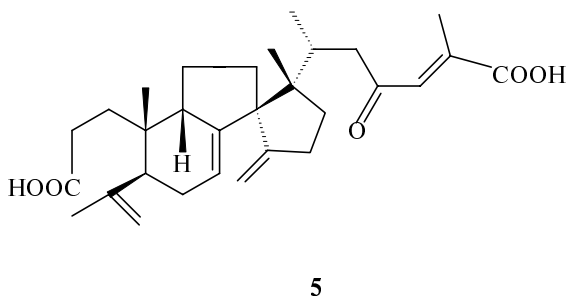
В 1985 г. была опубликована первая работа по тритерпеновым кислотам пихты [9], авторы которой сообщили о выделении из экстракта семян одного из японских видов пихт (*Abies mariesii* Mast.) новой кислоты с модифицированным углеродным скелетом ланостана. Химическое строение ее молекулы (формула 3) установлено с применением рентгеноструктурного анализа. Два года спустя подобные кислоты были выделены из семян другого вида японской пихты (*Abies firma*) [10], а после публикации еще одного сообщения по той же тематике [11] работы по тритерпеновым кислотам из семян пихт были, по-видимому, прекращены. В последующие годы в Японии основное внимание стали уделять тритерпеновым лактонам — аналогам упомянутого выше абислактона, которые концентрируются в пихтовой коре [12—18].



Небольшой цикл работ выполнен испанскими исследователями по тритерпеновым лактонам хвои [19] и древесины [20] марокканской пихты. Из метилированной кислой части экстракта хвои этого вида они выделили метиловый эфир **4**, подобный эфиру **2**. Как-либо данных о биологической активности эфира **4**, к сожалению, не приводится [21].



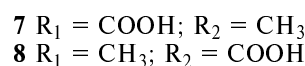
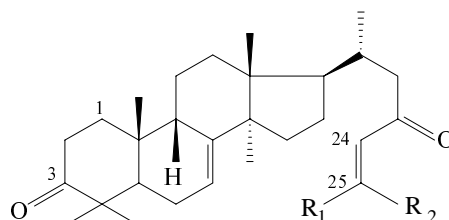
С 1986 г. были начаты исследования тритерпеноидов пихты сибирской, причем вначале из ее живицы были выделены два модифицированных 3,4-секоланоаноида, названные абисоновой (формула **5**) [22] и абисолидовой (формула **6**) [23] кислотами. Основными компонентами суммы кислот живицы являются давно известные дитерпеновые кислоты [4].



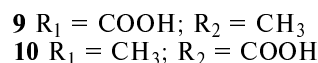
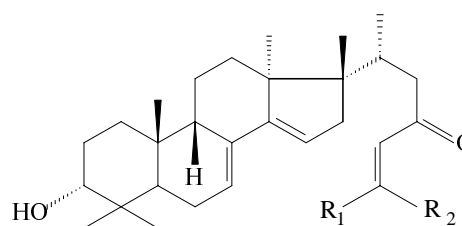
Несколько неожиданным оказалось, что эфирный экстракт пихтовой хвои содержит два основных типа соединений — монотерпеновые составляющие пихтового масла и тритерпеноиды. Содержание дитерпеновых кислот в кислой части этого экстракта крайне незначительно; преобладающими компонентами в сумме кислот экстракта являются тритерпеновые кислоты.

Химическое строение первых известных тритерпеновых кислот хвои пихты сибирской выражается формулами **7** и **8** [24, 25], причем *транс*-изомер **7** (фирмановая кислота) описан также японскими исследователями как компонент семян *Abies firma* Mast. [10]. Интересно, что индивидуальная кислота **7** легко выделяется в результате обычной адсорбционной хромато-

графии суммы кислот экстракта хвои, а ее *цис*-изомер **8** можно получить в результате хроматографического разделения только в виде метилового эфира [24]. Следует особо отметить, что тритерпеновые кислоты характерны только для пихты (*Abies*), их нет в других достаточно распространенных хвойных древесных породах, принадлежащих к тому же ботаническому семейству (сосна, ель, лиственница).

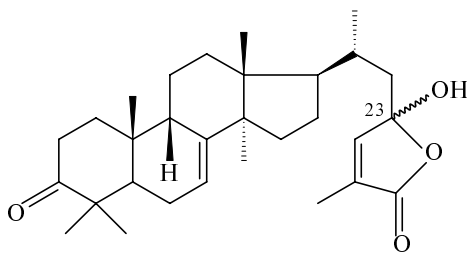


Основными компонентами смеси тритерпеновых кислот хвои пихты сибирской являются соединения **9** и **10** с модифицированным ланостановым углеродным скелетом [26]. Вообще же тритерпеновые кислоты хвои пихты сибирской представляют собой довольно сложную смесь подобных пар геометрических изомеров, различающихся между собой стереохимией боковой цепи молекулы, строением тетрациклического углеродного остова и заместителем при атоме С(3) (обычно кето- или гидроксильная группы) [27]. В качестве минорного компонента среди тритерпеновых кислот хвои пихты сибирской обнаружено одно соединение с метоксигруппой при этом атоме [28].

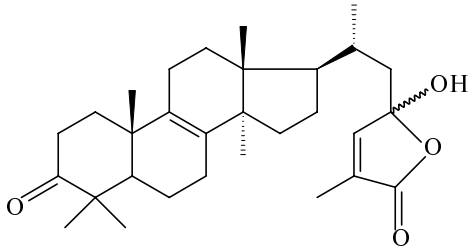


Цис-изомеры существуют, как типичные α-ацил-акриловые кислоты [29], преимущественно в циклической таутомерной (лактольной) форме (структура **11** и **12**), причем эти формы вполне стабильны, они являются квазирацемическими смесями эпимеров по С(23) и могут быть выделены в кристаллическом состоянии [30, 31].

Цис- и *транс*-изомеры метиловых эфиров рассматриваемых кислот **7**, **8** и **9**, **10** попарно взаимопревращаются уже под действием солнечного света [10, 24—25]. В этой связи оказалась важной обнаруженная способность молекул указанных и подобных им кислот и эфиров (содержащих, как правило, ненасыщен-

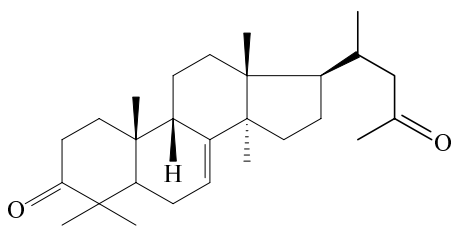


11

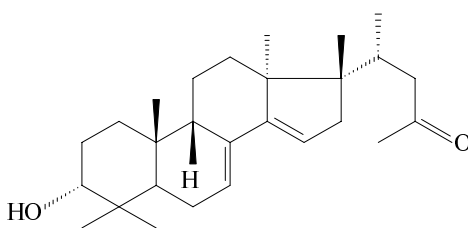


12

ную боковую цепь) подвергаться одинаковым образом фрагментации под действием щелочи [32]. При этом они расщепляются по связи $C_{(24)}-C_{(25)}$ с образованием соответствующего 25,26,27-тринор-кетона (структуры **13** и **14**). Таким образом, оба геометрических изомера дают один и тот же тринор-кетон, и в качественном отношении исходная смесь кислот упрощается вдвое. Благодаря этому подходу были найдены в виде подобных нор-кетонов новые составляющие природной смеси тритерпеновых кислот хвой пихты [33–34], что позволило оценить общее количество в хвое таких пар изомерных кислот и определить количественное соотношение структурных типов имеющих тритерпеноидов [35].

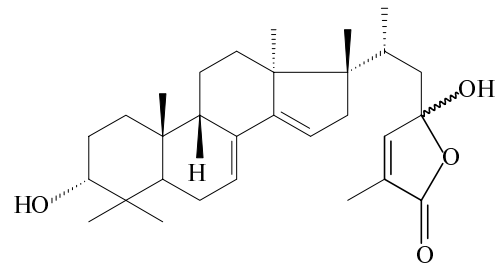


13

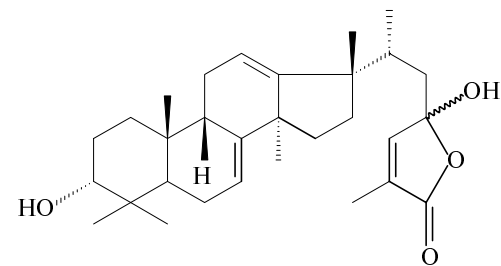


14

Необходимым методом для анализа тритерпеновых кислот пихты является высокоэффективная жидкостная хроматография на обращенно-фазовом сорбенте [36], которая позволяет интерпретировать все основные пики хроматограммы ВЭЖХ кислой части экстракта хвой пихты сибирской путем добавки метчиков известных компонентов. Авторы используют также микропрепаративную хроматографию на аналитическом хроматографе с наработкой и последующей идентификацией получаемых микрограммовых количеств веществ по данным спектроскопии ЯМР 1H и масс-спектрометрии. Идентифицированы ранее не описанные таутомеры по кислой части молекул — лактолы известных компонентов (структуры **15** и **16**).



15



16

Результаты этой работы могут быть использованы для сравнительного экспресс-анализа природных смесей тритерпеновых кислот хвой других видов пихт, а также для выявления изменчивости состава природных смесей кислот из пихты.

Практические аспекты

В начале этого раздела обзора особо следует отметить два важных обстоятельства — природный ареал пихты сибирской не выходит за пределы Российской Федерации, а само это древесное растение является одной из основных лесообразующих хвойных пород нашей страны [1, 37].

Химические компоненты, которые содержатся в экстрактах из различных частей пихты, находятся в виде сложной смеси родственных и изомерных веществ. Абиеслактон **1** — компонент коры многих видов пихт — вполне доступен, легко кристаллизуется и тем самым достаточно легко отделяется от других лактонов. Однако для этого вещества пока не найдено какой-либо конкретной области практического применения.

Другая важная группа метаболитов пихты — тритерпеновые кислоты хвой. Они могут быть выделены из кислой части экстракта в виде компактной группы, поскольку содержание близких к ним по полярности дитерпеновых кислот в хвое очень незначительно [26].

С помощью адсорбционной хроматографии на силикагеле из нее можно получить индивидуальную кислоту **7** [24] и таутомерную форму **11** ее *цис*-изомера [30]. Другие компоненты кислой части разделяются только на обращенно-фазовом сорбенте [36]. Поэтому все предварительные сравнительные испытания на биологическую активность проводили с использованием индивидуальных веществ **7**, **11** и природной суммы тритерпеновых кислот.

Для получения природной смеси тритерпеновых кислот из хвои (древесной зелени) пихты первоначально был разработан вполне технологичный способ ее выделения с использованием смеси этилацетата и петролейного эфира в качестве экстрагента с последующим выделением кислой части экстракта. Получаемый продукт в форме разбавленной водной эмульсии эффективно подавлял развитие вертициллезного вилта хлопчатника [38]. Позже были запатентованы эффективные способы получения этого продукта (природная сумма тритерпеновых кислот древесной зелени пихты) [39] и сухих натриевых солей этих кислот [40] с использованием на стадии экстракции одного *трет*-бутилметилового эфира. Этот достаточно доступный экстрагент обеспечивает полное и селективное извлечение суммы тритерпеновых кислот из хвои, а контроль качества целевого продукта легко осуществим методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на аналитическом микроколоночном хроматографе «Милихром» [39].

Обнаружены полезные свойства суммы тритерпеновых кислот (ТТК) пихты при воздействии на важные сельскохозяйственные культуры [41, 42]. Препарат ТТК пихты в виде водной эмульсии или сухих натриевых солей прошел все необходимые государственные испытания и с 1995 г. зарегистрирован в качестве нового регулятора роста растений [43]. Все последующие годы (1996—2003 гг.) он успешно проходил перерегистрацию. Препарат оказывает положительное комплексное воздействие на растения: увеличивает урожайность на 10—30%, снижает бактериальную и грибковую заболеваемость растений в 2—4 раза, повышает морозостойкость и засухоустойчивость растений, ускоряет созревание плодов.

До 2002 г. препарат на основе тритерпеновых кислот пихтовой древесной зелени имел товарное название СИЛК [43, 44], в 2002 г. он был переименован в НОВОСИЛ [45, 46]. Это было связано, в частности, с появлением двух новых российских патентов на способ получения суммы тритерпеновых кислот пихты [47, 48]. По патенту [47] смесь этих кислот экстрагируют *трет*-бутилметиловым эфиром из пихтовой древесной зелени после ее обработки в течение 13—15 ч острым водяным паром с целью выделения пихтового масла. В этом описании, однако, существенно завышен выход суммы тритерпеновых кислот из промежуточного эфирного экстракта и нет данных о влиянии длительного воздействия острого пара на проявление целевым продуктом биологической активности.

Во втором патенте [48] в качестве экстрагента используется изопропанол или ацетон. Цельный экстракт автор не разделяет на кислую и нейтральную части, как это описано в патентах [38, 39, 47], а всю сумму его компонентов просто называет смесью тритерпеновых кислот. Сравнить хроматограммы ВЭЖХ из патентных описаний [48] и [39] не представляется

возможным, поскольку на первой из них не приведена начальная часть хроматограммы с пиками растворимых в изопропаноле полярных компонентов экстракта.

Говоря о дальнейших перспективах существования формально схожих российских препаратов на основе пихтовой древесной зелени, нужно отметить, что к моменту написания настоящего обзора Список разрешенных на 2004 г. препаратов для применения в сельском хозяйстве еще не был опубликован.

Завершая эту часть обзора, еще раз отметим, что тритерпеновые кислоты имеются в пихтовой коре и содержащейся в ней живице [22, 23]. Их сумма может представлять интерес, в частности, для растениеводства [49] и иных целей [50].

Заключение

Каждая из лесобразующих хвойных пород Российской Федерации (лиственница, пихта, ель и сосна) имеет свой неповторимый химический состав, познание которого открывает новые возможности для эффективного практического использования этого возобновляемого биоресурса, в том числе в такой благодатной области сельского хозяйства, как растениеводство.

Успех на этом направлении обеспечивает тесное сотрудничество химиков, располагающих современной спектральной базой, биологов, умеющих вовремя увидеть и квалифицированно оценить отклик живого организма на воздействие на него вещества, нечуждого самой природе, а также производителей, готовых своевременно дать жизнь новому лесохимическому продукту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крылов Г.В., Марадюлин И.И., Михеев Н.И., Казакова Н.Ф. Пихта. М.: Агропромиздат, 1986, 240 с.
2. Фалалеев Е.Н. Пихтовые леса Сибири и их комплексное использование. М.: Лесная промышленность, 1964, 165 с.
3. Никифоров Г.В., Калинин А.М. Производство пихтового масла. М.: Лесная промышленность, 1983, 280 с.
4. Пентегова В.А., Дубовенко Ж.В., Ралдугин В.А., Шмидт Э.Н. Терпеноиды хвойных растений. Наука, Сибирское отделение, 1987, 97 с.
5. Takahashi T. J. Pharm. Soc. Japan, 1938, v. 58, p. 888—901.
6. Kutney J.P., Westcott N.D., Allen F.H. e.a. Tetrahedron Lett., 1971, p. 3463—3466.
7. Uyeo S., Okada J., Matsunaga S., Rowe J. Tetrahedron, 1968, v. 24, p. 2859—3880.
8. Takayashi J., Tanaka R., Matsunaga S. e.a. Cancer Letters, 1990, v. 53, p. 141—144.
9. Hasegawa S., Miura T., Hirose Y., Iitaka Y. Chem. Lett., 1985, № 10, p. 1589—1592.
10. Hasegawa S., Kaneko N., Hirose Y. Phytochemistry, 1987, v. 26, p. 1095—1099.
11. Hasegawa S., Miura T., Kaneko N. e.a. Tetrahedron, 1987, v. 43, p. 1775—1784.
12. Tanaka R., Inoshiri A., Yoneda A. e. a. Phytochemistry, 1990, v. 29, p. 3263—3265.
13. Tanaka R., Matsunaga S. Ibid., 1990, v. 29, p. 3267—3269.
14. Tanaka R., Matsunaga S. Ibid., 1991, v. 30, p. 1983—1987.

15. *Tanaka R., Matsunaga S.* J. Nat. Prod., 1991, v. 54, p. 1337–1344.
16. *Tanaka S., Aoki A., Wada S., Matsunaga S.* Ibid., 1999, v. 62, p. 198–200.
17. *Tanaka R., Aoki H., Mizota T. e.a.* Planta Medica, 2000, v. 66, p. 163–168.
18. *Wada S., Iida A., Tanaka R.* J. Nat. Prod., 2002, v. 65, p. 1657–1659.
19. *Barero A.F., Sánchez J.F., Alvarez-Manzaneda A.J. e.a.* Phytochemistry, 1991, v. 30, p. 593–597.
20. *Barero A.F., Sánchez J.F., Alvarez-Manzaneda A.J. e.a.* Ibid., 1994, v. 35, p. 1271–1274.
21. *Barero A.F., Sánchez J.F., Alvarez-Manzaneda A.J. e.a.* Ibid., 1992, v. 31, p. 615–620.
22. *Ралдугин В.А., Гатилов Ю.В., Багрянская И.Ю., Ярошенко Н.И.* Химия природ. соедин., 1986, № 5, с. 584–588.
23. *Ралдугин В.А., Гатилов Ю.А., Рыбалова Т.В., Раишес Я.В.* Там же, 1986, № 6, с. 688–696.
24. *Роцин В.И., Ралдугин В.А., Баранова Р.А., Пентегова В.А.* Там же, 1986, № 5, с. 648–649.
25. *Ралдугин В.А., Шевцов С.А.* Там же, 1988, № 3, с. 364–371.
26. *Ралдугин В.А., Шевцов С.А., Ярошенко Н.И., Гатилов Ю.В. и др.* Там же, 1987, № 6, с. 824–831.
27. *Ралдугин В.А., Шакиров М.М., Лейбюк Т.В., Шевцов С.А.* Там же, 1991, № 4, с. 511–517.
28. *Шевцов С.А., Ралдугин В.А.* Там же, 1989, № 2, с. 212–219.
29. *Valters R.E., Fritch W.* Ring-Chain Tautomerism, Plenum Press, 1985, 278 p.
30. *Ралдугин В.А., Шевцов С.А., Шакиров М.М. и др.* Химия природ. соедин., 1989, № 2, 207–212.
31. *Гришко В.В., Друганов А.Г., Шакиров М.М., Ралдугин В.А.* Изв. АН. Сер. хим., 1998, № 3, с. 519–521.
32. *Ралдугин В.А., Шевцов С.А., Лейбюк Т.В.* Химия природ. соедин., 1991, № 2, с. 206–209.
33. *Гришко В.В., Багрянская И.Ю., Гатилов Ю.А. и др.* Изв. АН. Сер. хим., 1996, № 3, с. 748–751.
34. *Багрянская И.Ю., Гатилов Ю.А., Гришко В.В., Ралдугин В.А.* Там же, 1997, № 7, с. 1314–1316.
35. *Гришко В.В., Шакиров М.М., Ралдугин В.А.* Там же, 1996, № 12, с. 2997–2999.
36. *Друганов А.Г., Ралдугин В.А., Шакиров М.М. и др.* Химия в интересах устойчивого развития, 2000, № 8, с. 699–704.
37. *Бобров Е.Г.* Лесообразующие хвойные СССР. Л.: Наука, 1978, 189 с.
38. *Чекуров В.М., Колотыгин А.И., Ралдугин В.А. и др.* Патент РФ № 2025976, 1991.
39. *Ралдугин В.А., Друганов А.Г., Климов В.П. и др.* Патент РФ № 2108803, 1997.
40. *Ралдугин В.А., Друганов А.Г., Климов В.П. и др.* Патент РФ № 2108107, 1997.
41. *Чекуров В.М., Сычев И.П., Сычев А.И., Ралдугин В.А.* Патент РФ № 2083110, 1994.
42. *Чекуров В.М., Зазимко М.И., Жалиева Л.Д. и др.* Патент РФ № 2147400, 1998.
43. *Защита и карантин растений*, 1995, № 5, с. 26–47.
44. *Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации (Приложение к журналу «Защита и карантин растений»)*. Москва, 2001, с. 251–257.
45. Там же, 2002, с. 283–285.
46. Там же, 2003, с. 314–317.
47. *ОАО «ЭЛХА»* Патент РФ № 2151139, 1999.
48. *Локтев В.Ф.* Патент РФ № 2179393, 2000.
49. *Ралдугин В.А., Шевцов С.А., Шукин Г.И. и др.* Патент РФ № 2061487, 1991.
50. *Кушир С.Р., Радбиль Б.А., Савиных В.И. и др.* Патент РФ № 2048815, 1992.