

УДК 615.072.615.074.615.322

ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА ЦВЕТКОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

**О. О. Новиков Д. И. Писарев
В. Н. Сорокопудов
М. А. Журавель
Н. Н. Нетребенко Н. В. Автина**

*Белгородский
государственный
университет,
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы, 854*

E-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

В статье изложены данные о химическом изучении цветков клевера лугового, как перспективного источника биологически активных полифенолов - флавоноидов и изофлавоноидов. Изофлавоноиды – природные полифенолы, обладающие гипохолестеринемической и эстрогенной активностью. При химическом изучении методами масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии в цветках клевера лугового обнаружены лютеолин-7-гликозид, генистеин, биоханин, формонетин. Наличие флавоноидов и изофлавоноидов в цветках клевера лугового открывает широкую перспективу для получения лекарственных препаратов гипохолестеринемического и эстрогенного действия.

Ключевые слова: цветки клевера лугового, флавоноиды, изофлавоноиды, масс-спектрометрия, УФ-спектроскопия, лютеолин-7-гликозид, генистеин, биоханин, формонетин.

Введение

В настоящее время интерес, проявляемый к изучению флавоноидов специалистами разных направлений, существенно возрос. Причина этого заключается в их значительной биологической роли в живых системах и разнонаправленном фармакологическом действии. Для флавоноидов достоверно установлены такие фармакологические эффекты, как иммуностимулирующий, противоопухолевый, кардио-, гепато- и геропротекторный, антитромбоцитный, противоаллергический, противовирусный, гипохолестеринемический, капилляроукрепляющий, эстрогенный.

Доминирующее действие флавоноидов – антирадикальное, связанное с наличием в их структуре фенольных гидроксильных групп, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях радикального типа. В этих реакциях флавоноиды выступают в роли восстановителей – доноров электронов по отношению к какому-либо радикальному агенту, переходя в свою окисленную форму – флавоксильный радикал [1].

Среди высших растений существенным многообразием разных групп флавоноидов отличается семейство бобовые. Особенностью данного семейства является накопление изофлавоноидов. Изофлавоноидам по сравнению с другими типами флавоноидов свойственен более широкий диапазон фармакологического действия на организм. В первую очередь следует выделить гипохолестеринемический и эстрогенный эффекты. Интересным является тот факт, что изофлавоны, относящиеся к группе фитоэстрогенов, способны конкурентно блокировать эстрогенные рецепторы и снижать риск гормонозависимых форм рака, таких как рак простаты и рак груди [2].

В качестве объекта исследования были взяты образцы цветков клевера лугового, являющегося представителем местной флоры, широко распространенным, легко культивируемым в качестве кормового.

В связи с этим нами поставлена цель настоящего исследования – химическое изучение цветков клевера лугового как источника ценных биологически активных флавоноидов для создания на их основе эффективных препаратов.

Для реализации поставленной цели основной задачей исследования явилось изучение флавоноидного состава выбранного объекта.

Для определения структуры выделенных веществ нами использован подход, заключающийся в сочетании двух методов: УФ-спектрофотометрии и масс-спектрометрии, что позволяет с предельной точностью экспрессно идентифицировать выделенное соединение.

Используя УФ-спектрофотометрию можно добиться выявления определенных диагностических признаков в структуре исследуемого соединения, в частности расположение гидроксильных групп и их гликозидирование. Привлечение масс-спектрометрии информирует о молярной массе вещества, а совпадение характера фрагментации неизвестного вещества и соединения предполагаемой структуры позволяет надёжно охарактеризовать строение соединения в целом.

Для выделения флавоноидов нами использована схема, согласно которой сырье – цветки клевера экстрагировали пятикратно 96% спиртом этиловым в аппарате Сокслета.

Полученную сумму сгущали на ротационном вакуум-испарителе ИР-1. Остаток разбавляли водой и отстаивали в холодильнике в течение суток. Выпавший осадок липофильных веществ отделяли под вакуумом и фильтрат оставляли в холодильнике для просветления. Отстоявшуюся жидкость фракционировали хлороформом и этилацетатом.

Полученные фракции упаривали под вакуумом, таким образом, получены хлороформная фракция X-1 и этилацетатная – Э-1.

Фракцию Э-1 переосаждали хлороформом и отстаивали в холодильнике. Выпавший желтый кристаллический осадок отделяли центрифугированием.

Полученный осадок очищали методом препаративной тонкослойной хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинках Силуфол. Элюирование осуществляли в системе этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода в соотношениях (10:1:1:2,6). В результате в центральной части хроматограммы наблюдалась широкая полоса ярко-желтого цвета (Ф-1) соответствующая гликозиду, в верхней части хроматограммы локализовалась узкая полоса темного цвета (Ф-2) агликона. Полученные полосы снимали с хроматограммы и элюировали спиртом этиловым 96%-ным.

Элюаты спектрофотометрировали на УФ-спектрофотометре СФ-56. УФ-спектр фракции Ф-1 в области 220 – 400 нм имел максимума поглощения 264 и 355 нм и два плеча 303 и 305 нм, что характерно для флавонолов, результаты представлены на рис. 1.

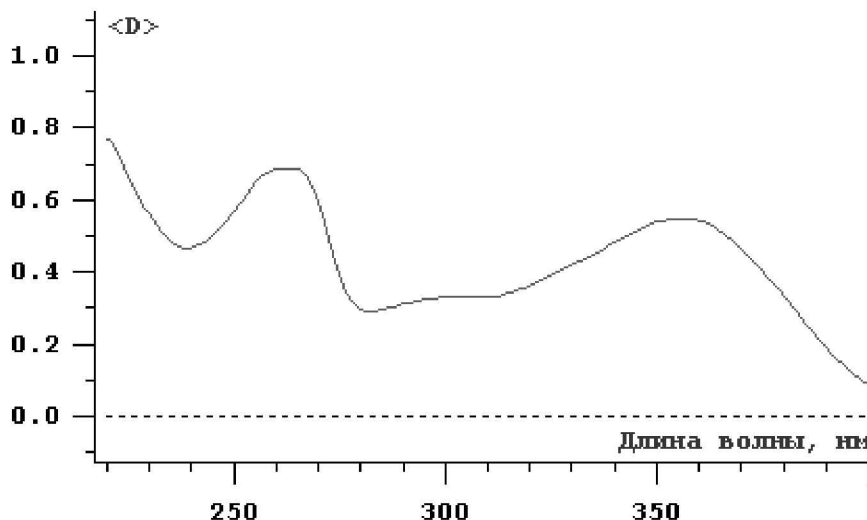


Рис. 1. УФ-спектр фракции Ф-1

Полученное вещество давало положительную цианидиновую реакцию по Синоду и отрицательную по Брианту, что свидетельствует о гликозидной природе вещества.

Для установления расположения гидроксильных групп в структуре соединения использовали шифт-реактивы. После добавления шифт-реактива в исходном спектре происходит сдвиг полос поглощения и по характеру этих изменений делается вывод о наличии в соединении определенных структурных фрагментов. Наиболее используемый шифт-реактив – алюминия хлорид, образующий комплекс с флавоноидами. При использовании шифт-пробы с алюминия хлоридом наблюдался батохромный сдвиг обеих полос поглощения – первой с 355 нм до 398 нм, второй с 264 нм до 273 нм, что

свидетельствует о свободной гидроксильной группе в 5 положении. При добавлении нескольких капель соляной кислоты не привело к гипсохромному сдвигу, что говорит об отсутствии о-дигидроксигруппировки в кольце В (рис. 2).

При добавлении ацетата натрия наблюдалась батохромия первой полосы поглощения, что свидетельствует о свободной гидроксильной группе в положении 7.

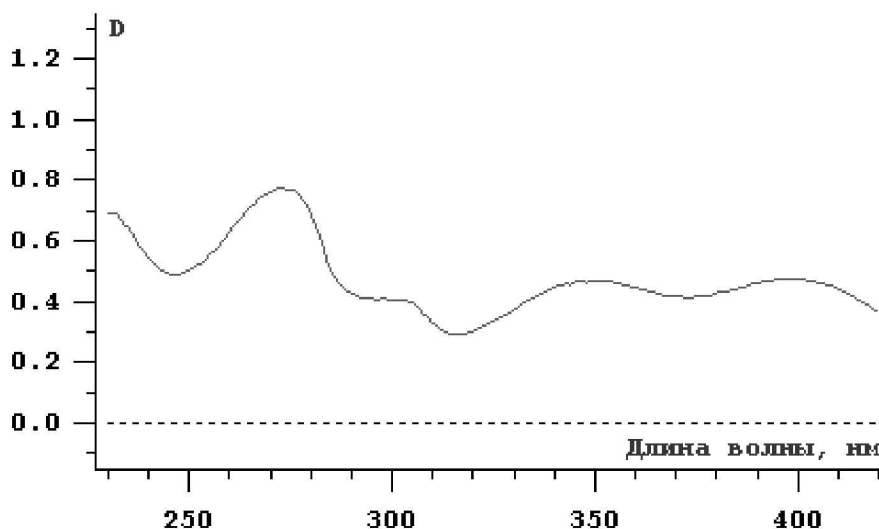


Рис. 2. УФ-спектр фракции Ф-1 с использованием шифт-реактива алюминия хлорида

Масс-спектр изучаемого вещества регистрировали на аппарате Autoflex II, с использованием в качестве матрицы – α-цианокоричной кислоты. В масс-спектре изучаемого вещества наблюдался наиболее интенсивный пик иона m/z иона = 287.306 соответствующий кемпферолу и менее выраженный пик иона m/z = 471, отвечающий гликозидной структуре в виде натриевой формы. Приведенные нами выше данные позволили охарактеризовать вещество как кемпферол-3-гликозид. Присутствие других менее интенсивных характеристических пиков ионов m/z = 303.293 указывает на присутствие в минорных количествах агликона кверцетина, а m/z = 487.239 его гликозидной форме в виде натриевой формы (рис. 3).

Фракцию X-1 использовали для обнаружения агликонов изофлавоноидов. Её упаривали досуха, растворяли в спирте этиловом и регистрировали УФ-спектры. В УФ-спектре в диапазоне 220–400 нм, наблюдался один максимум при 262 нм, что характерно для изофлавоноидов группы генистеина (рис. 4).

При масс-спектрометрическом исследовании наблюдалось присутствие трёх интенсивных пиков ионов m/z = 269, 285 и 272 соответствующих агликонам – биоханину, формонетину и генистеину (рис. 5).

В результате исследования с использованием методов - УФ-спектрофотометрии и масс-спектрометрии - в цветках клевера были идентифицированы флавоноиды: кемпферол-3-гликозид, кверцетин и изорамнетин и изофлавоноиды: генистеин, биоханин, формонетин.

Наличие флавоноидов и изофлавоноидов в цветках клевера лугового открывает широкую перспективу для получения лекарственных препаратов гипохолестеринемического и эстрогенного действия. Полученные результаты можно рекомендовать для дальнейших химических и фармакологических испытаний данного растения.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 г.г., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.

Список литературы

1. Органическая химия: учеб. Для вузов: В 2 кн. Кн 2: Специальный курс / Н.А. Тюкавкина, С.Э. Зурабян, В.Л. Белобородов и др.: под ред. Н.А. Тюкавкиной. – М.: Дрофа, 2008. – 592 с.



2. Природные и модифицированные изофлавоноиды / Отв. ред. М.Ю. Корнилов. – Изд-во Ростовского ун-та, 1985. – 184 с.

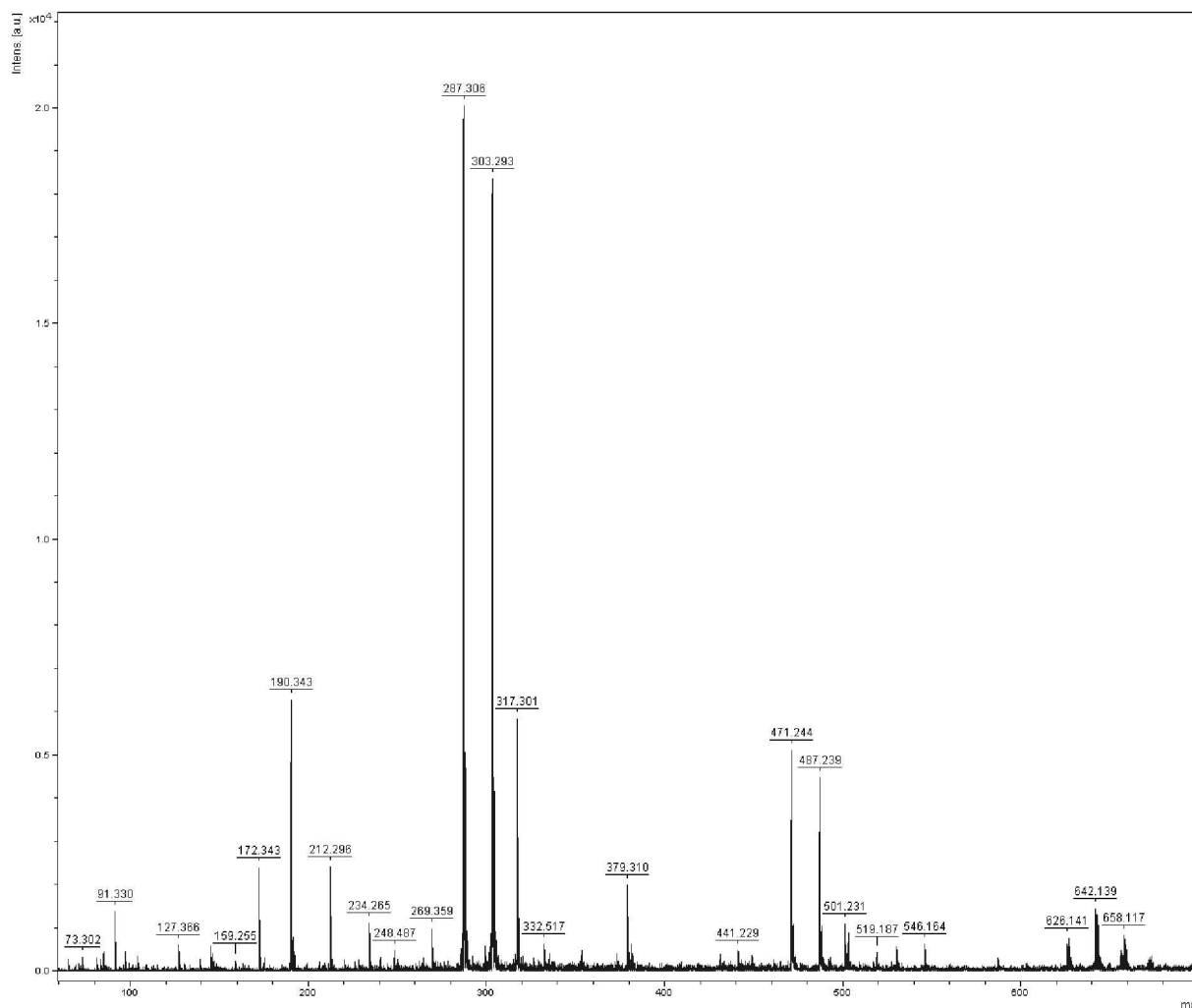


Рис. 3. Масс-спектр вещества Φ_1

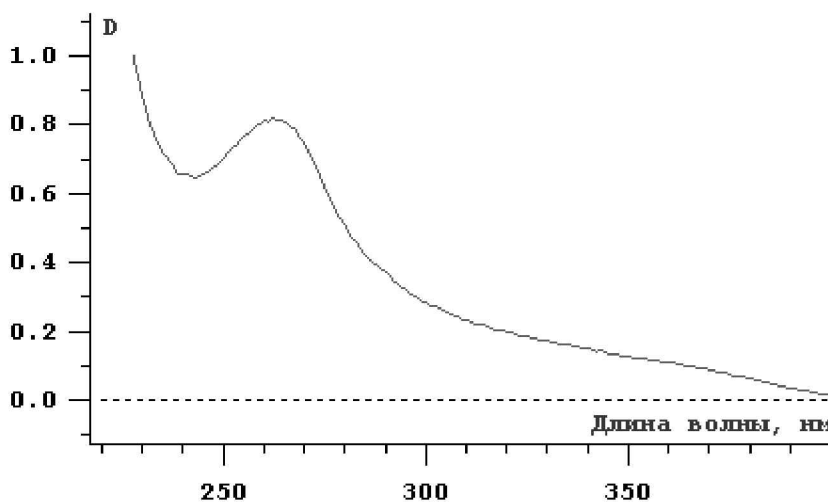


Рис. 4. УФ-спектр фракции X_1

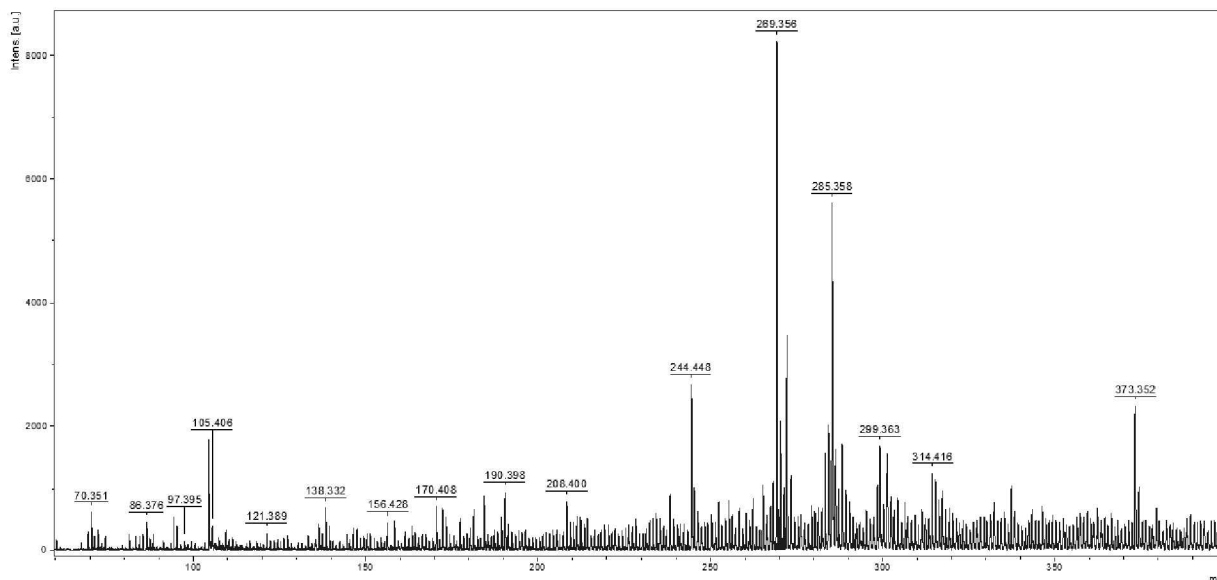


Рис. 5. Масс-спектр фракции X₁

STUDY OF FLAVONOID COMPOSITION OF FLOWERS OF MEADOW CLOVER

O. O. Novikov D. I. Pisarev
V. N. Sorokopudov
M. A. Zhuravel N. N. Netrobenko
N. V. Avtina

*Belgorod State University,
 Pobedy St., 85, Belgorod,
 308015, Russia*

E-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

The article presents the data on the chemical study of meadow clover flowers as a promising source of biologically active polyphenol-flavonoids and isoflavonoids. Isoflavonoids is natural polyphenols, having hypocholesterol and estrogenic activity. Luteolin-7-glycoside, genistein, biohanin, formononetin are found in the meadow clover flowers by means of the chemical study along with such methods as mass spectrometry, thin layer chromatography and ultraviolet spectrophotometry. The availability of flavonoids and isoflavonoids in meadow clover flower offers the challenge for making up drugs of hypocholesterol and estrogen action.

Key words: meadow clover flowers, flavonoids, isoflavonoids, mass spectrometry, UV-spectroscopy, Luteolin-7-glucoside, genistein, biohanin, formononetin.