



УДК 615.322:582.736.31.012:547.814:543

ФЛАВОНОИДЫ АСТРАГАЛА КОРОТКОПЛОДНОГО ASTRAGALUS BRACHYCARPUS M. B. FL

В надземной части астрагала короткоплодного (*A. brachycarpus* M. B. Fl) хромато-спектрофотометрическими методами исследован качественный состав и количественное содержание флавоноидов.

Были идентифицированы изорамнетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин-3- α - β -D-глюкопиранозид и изорамнетин-3- β -D-галактопиранозид, кемпферол-3-глюкопиранозид (астрагалин) (M3); изорамнетин-3- α - β -D-глюкопиранозил-6- α - β -L-рамнопиранозид, кверцетин-3- α - β -D-глюкопиранозил-6- α - β -L-рамнопиранозид (рутин), кверцетин-3- α - β -D-галактопиранозил-6- β -L-рамнопиранозид, кемпферол-3- α - β -D-галактопиранозил-2- α - β -L-арабопиранозид. Структуру выделенных соединений доказывали с использованием УФ, ИК-спектроскопии, дифференциальной ИК-спектроскопии, изучением продуктов щелочного, кислотного и ферментативного гидролиза. Количественное содержание флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье составило 3,3%.

Ключевые слова: астрагал короткоплодный, флавоноиды, гидролиз, количественное определение, дифференциальная УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия.

Н.Н. ГУЖВА
Т.Т. ЛИХОТА
З.Н. БОГАТЫРЕВА

*Пятигорская
государственная
фармацевтическая
академия*

e-mail:
guzhvanikolai@rambler.ru

Растения рода Астрагал широко используются в народной медицине при заболеваниях почек, крови, как противовоспалительные средства, влияющие на иммунную систему. Так, в народной медицине из астрагалов 16 уже используются, однако в официальной медицине разрешены к применению только 2 астрагала – а. шерстистоцветковый (*A. dasyanthus* Pall.) для настоев и отваров и а. серпоплодный (*A. falcatus* Lam) – для получения субстанций [1,2].

Известно, что в последние годы повысился интерес к лекарственным препаратам растительного происхождения [3]. Препараты из лекарственных растений особенно ценны при лечении хронических заболеваний, когда больные нуждаются в длительном приеме лекарств. Их преимущество перед синтетическими лекарствами, как известно, состоит в том, что они редко вызывают побочные реакции организма, почти не токсичны, хорошо переносятся больными независимо от возраста, применяются с профилактической целью и для длительных курсов лечения [4].

Цель нашего исследования – определение качественного состава и количественного содержания флавоноидов в надземной части астрагала короткоплодного, для дальнейшего выявления наиболее перспективных видов данного рода по содержанию биологически активных веществ.

Материалы и методы. Астрагал короткоплодный (*Astragalus brachycarpus* M. B. Fl) семейства бобовых (Fabaceae) – многолетнее травянистое растение от 15 до 40 см высотой. Прижатое, серо-пушистое, листья из 10-15 пар, продолговато-эллиптических тупых листочков около 10 мм длины. Кисти негустые, сначала яйцевидно-продолговатые, позже рыхлые, вытягивающиеся, длиннее листьев, приподнимающиеся, редко прямые. Чашечка прижатая, черно-пушистая, зубцы шиловидные в 3-4 раза короче трубочки. Цветки грязно-фиолетово-пурпурные, 15-18 мм длины. Боб прямой, прижато-пушистый к основанию, слегка вздутый, 13-14 мм длины (с носиком), около 5 мм ширины. Произрастает в Предкавказье, Армении, обычно до среднего горного пояса на сухих травянистых и щебнистых местах. Географический тип: иберийский [5].

Исследование проводили в 2011 и 2012 годах. Надземную часть астрагала *A. brachycarpus* заготавливали в окрестностях города Пятигорска (гора Машук, юго-восточный склон) в июне месяце, в период цветения.

Сырье (1,0 кг) измельченное до 3-5 мм исчерпывающе экстрагировали 70% этанолом до отрицательной реакции на флавоноиды. Полученное извлечение сгущали до 1/3 объема, отогнав этанол под вакуумом и оставляли в холодильнике на 48 часов, выпавшую липофильную часть отфильтровывали и промывали на фильтре горячей водой и последовательно обрабатывали гексаном, хлороформом, этилацетатом, бутилацетатом, н-бутанолом. Выделенные извлечения концентрировали, а затем разделяли с использованием одно- и двухмерной хроматографии на бумаге



(БХ) (марки «М» и «С» Санкт-Петербургской фабрики №2 имени Володарского, FN-11 (Германия)) и тонкослойной хроматографии на пластинах (Silufol-254 (Kavalier), MerckKGaAKieselgel 60 F₂₅₄ и «Сорбфил» аналитические на полимерной и алюминийевой подложке ЗАО «Сорбполимер» (Краснодар, Россия)), в следующих системах растворителей: 1) 2 н 15% уксусная кислота; 2) БУВ (4:1:2); 3) хлороформ – уксусная кислота (3:2); 4) н-гексан – бензол – метанол (5:4:1) [6,7].

Хроматограммы просматривали в видимом и УФ свете до и после обработки концентрированным раствором аммиака и различными ионизирующими реактивами.

Для выделения и идентификации индивидуальных флавоноидов применяли разделение их на колонке с полиамидным сорбентом или препаративное разделение хроматографическое на бумаге в нескольких системах растворителей с последующей дробной кристаллизацией выделенных соединений. Полученную сумму фенольных соединений (по 25,0 г) растворяли в 30 мл безводного этанола и смешивали с 250,0 г полиамидного сорбента, который затем сушили при температуре 30-35°C до удаления запаха этанола. Сорбент с адсорбированной в нем суммой фенольных соединений из исследуемого астрагала короткоплодного наносили на подготовленную колонку полиамидного сорбента (L=140 см, d = 3 см), активированного 2% раствором хлороводородной кислоты. Элюировали последовательно водой и этанолом различной концентрации. Колонку просматривали в УФ-свете, наблюдали четкие зоны разделения соединений на сорбенте. Процесс элюирования контролировали хроматографией на бумаге. Собирали отдельные фракции. Отгоняли растворитель досуха, вещества перекристаллизовывали из метанола и этанола [7].

Вещества высушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре 40°C в вакууме 0,01 мм. рт. ст.

Структуру выделенных соединений доказывали с использованием данных УФ- и ИК- спектроскопии, результатов кислотного, щелочного и ферментативного гидролизом.

УФ-спектры измеряли на спектрофотометре СФ-56, «Specord-Vis» в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве растворителя использовали 95% этанол и метанол.

ИК-спектры измеряли в вазелиновом масле и в таблетках калия бромида на «UR-20», «Specord-Vis» (с призмами NaCl и NaF в области 800-3600 см⁻¹, концентрация вещества 0,5%). Удельное вращение гликозидов флавоноидов определяли на колориметре круговом «модель СМ» в кюветах с рабочей длиной 0,5 дм.

Щелочной гидролиз. 10 мг исследуемого вещества растворяли в 10 мл 40% раствора гидроксида калия и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2х часов. Реакционную смесь подкисляли 20% хлористоводородной кислотой до рН 4-6, а продукты гидролиза извлекали этиловым эфиром 3 раза порциями по 10 мл. Эфирные извлечения промывали водой и высушивали безводным сульфатом натрия. Эфир упаривали досуха, остаток растворяли в 0,5 мл этанола и хроматографировали в 15% уксусной кислоте в присутствии «свидетелей».

Для установления состава изучаемых веществ был проведен количественный кислотный гидролиз: навеску вещества растворяли в 50% метаноле, содержащем 5% серной кислоты и гидролизовали на кипящей водяной бане в течение 2х часов. Полноту гидролиза контролировали хроматографированием реакционной смеси в системе «1». По окончании гидролиза смесь разбавляли водой и пропускали через слой полиамидного сорбента. Вымывание углеводного остатка проводили водой, а агликаны количественно десорбировали 95% этанолом. Этанол отгоняли, остаток высушивали до постоянной массы при температуре 100-110°C и взвешивали.

Исследование углеводного состава. Углеводы, образующиеся в результате гидролиза флавоноидных гликозидов, анализировали методом хроматографии на бумаге в системе растворителей: А) н-бутанол– пиридин –вода (6 : 4 : 3), Б) н-бутанол–ацетон–вода(2 : 7 : 1), В) н-бутанол–бензол–пиридин–вода (5 : 1 : 3 : 3), Г) н-бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 2), Д) этилацетат–уксусная кислота–вода (9 : 2 : 2),.

Детектирование углеводных компонентов проводили бутанольным раствором анилинфталата с последующим прогреванием хроматограмм в сушильном шкафу при 105°C до проявления пятен. Идентификацию проводили с использованием аутентичных образцов углеводов.

Ферментативный гидролиз. Энзиматический гидролиз исследуемых монозидов проводили ферментным препаратом из гриба *Aspergillus oryzae* и эмульсином. Для этого 3 мг вещества растворяли в 1 мл 10% этанола при нагревании; к охлажденному до 30°C раствору добавляли 3 мл раствора фермента и оставляли в термостате при температуре 36°C на 24 часа. После гидролиза фермент осаждали добавлением 95% спирта и кипячением в течении 30 минут раствора, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали до 1 мл и исследовали хроматографией на бумаге.

В результате исследования было установлено отщепление углеводных компонентов у всех изучаемых гликозидов. На основании изучения полученных хроматограмм сахарный компонент гликозидов М1 и М3 идентифицировали с D-глюкозой, а агликон у М1 представлен изорафнетинном.



Количественное определение. Содержание флавоноидов в сырье определяли методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии [6]. Определение основано на способности флавоноидов образовывать окрашенный комплекс со спиртовым раствором хлорида алюминия, который вызывает bathochromic сдвиг длинноволновой полосы поглощения и при этом дает основной максимум поглощения при $\lambda=412$ нм. Аналогичный максимум поглощения при $\lambda=410$ нм отмечен для комплекса раствора рутина, используемого нами в качестве стандартного образца. Применение в качестве раствора сравнения испытуемого экстракта без комплексообразователя позволяет исключить влияние сопутствующих веществ. Содержание флавоноидов составляет 3,3% (среднее из 6 определений). Статистическую обработку полученных результатов проводили по ГФ [8]

Обсуждение результатов. В результате разделения на колонке были получены вещества, относящиеся к агликонам, монозидам и биозидам флавоноидов.

Одним из этапов наших исследований стали агликоны (табл. 1), которые нами названы А1, А2 и А3. Изучаемые вещества дают положительную цианидиновую реакцию, которая характеризует их флавоноидную природу, а переход оранжево-красного окрашивания (пигмента) в слой октанола свидетельствует о принадлежности исследуемого вещества к агликонам.

Таблица 1

Качественный анализ агликонов цветными реакциями на бумаге

Соединение	Система		Окраска пятен						
	A	B	В видимом свете	В УФ-свете	NH ₃ в УФ-свете	AlCl ₃ 5% этанольный раствор в УФ-свете	КОН метанольный раствор в УФ-свете	FeCl ₃ этанольный раствор в УФ-свете	ZrO(NO ₃) ₂ 2% метанольный раствор в УФ-свете
	R _f	R _f							
A1	0,04	0,64	Бледно-желтая	желтая	Желто-зеленая	Ярко-желтая	Желтая	Темно-зеленая	желтая
A2	0,47	0,53	Бледно-желтая	Желто-зеленая	Желтая	Желто-зеленая	Ярко-желтая	Темно-зеленая	желтая
A3	0,08	0,82	Бледно-желтая	Желто-зеленая	Желтая	Желто-зеленая	Ярко-желтая	Темно-зеленая	желтая

Агликоновый характер веществ подтвердился также величиной молекулярных масс и элементным составом.

Темно-зеленое окрашивание с хлоридом железа (III), и желтое с раствором хлорокиси циркония, сохраняющееся после добавления раствора лимонной кислоты, обнаруживает оксигруппу в 3 положении у всех веществ.

Растворы вещества А1 в отличие от других веществ восстанавливают аммиачный раствор нитрата серебра, вероятно, за счет о-диоксигруппировки, которая обнаруживается также по образованию осадка с ацетатом свинца.

В ИК-спектрах отмечены максимумы полос при 3500-3200 см⁻¹ (ОН-группа), 1670 – 1650 см⁻¹ (C=O гамма-пирона), 1520 см⁻¹ (СН-ароматических циклов), 840 см⁻¹(пара замещение в бензольном кольце).

В веществе А2 отмечен максимум полос поглощения при частоте 2945, что определяет наличие метоксильной группы.

Помимо качественных реакций на отдельные оксигруппы, положение фенольных гидроксильных обнаруживали по данным УФ-спектроскопии, применяя ионизирующие и комплексообразующие диагностирующие реагенты. В УФ-спектрах соединений соотношение интенсивностей I и II полос поглощения является характерным для флавоноидов (табл. 2).

Таблица 2

Спектральные характеристики в УФ-области агликонов

Соединение	Полосы Поглощения	2•10 ⁻⁵ мол. р-р в этаноле	Положение максимума поглощения, нм													
			ZrOCl ₂	ZrOCl ₂ + лим.к-та	CH ₃ COONa	CH ₃ COONa + H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ +HCl	C ₂ H ₅ ONa							
A1	I	372 264	460 90	430 60	384 +12	390 +18	458 +86	430 +58	333 -39							
	II	256	275 20	255 0	374 +18	259 +3	272 +16	271 +15	270 +14							
A2	I	371 265	460 90	420 50	380 +9	372 +1	430 +59	428 +57	420 +49							
	II	254	268 13	274 +20	254 0	267 +13	267 +13	270 +16								
A3	I	368	457 90	415 48	380 +12	365 -3	425 +57	425 +57	408 +40							
	II	267	280 15	280 15	273 +6	267 0	274 +7	274 +6	276 +9							



Батохромный сдвиг максимума 1 полосы в веществах А1, А2, А3 на 90 нм под воздействием хлорокиси циркония и на 40-60 нм при добавлении хлорокиси циркония и лимонной кислоты указывает на оксигруппу в 3 положении.

7 оксигруппа обнаруживалась в веществах А1, А2, А3 по батохромному сдвигу максимума 1 полосы в веществах А1, А2, А3 на 15-40 нм под ионизирующим воздействием натрия ацетата; оксигруппа в 4' положении обнаруживалась во всех исследуемых веществах по батохромному сдвигу на 33-49 нм под влиянием этилата натрия. В веществе А1 выявлена 3', 4' диоксигруппировка по сдвигу длинноволновой полосы на 18 нм под влиянием борной кислоты и ацетата натрия. Это же подтверждается и результатами исследования комплексов изучаемых веществ с алюминия хлоридом, алюминия хлоридом в присутствии хлористоводородной кислоты. Известно, что алюминия хлорид с флавонами и флавонолами, содержащими гидроксильные группы в 3 и 5 положениях, образует в кислой среде устойчивый комплекс и малостойкий с веществами, содержащий о-диоксигруппу.

Следовательно, в веществе А1 имеются свободные оксигруппы в 3,5,7,3',4' положениях, А2, А3 – в 3,5,7,4' положениях.

Учитывая данные ИК-спектров (табл. 3), нами было проведено дезметилирование указанных веществ йодистоводородной кислотой в среде жидкого фенола и уксусного ангидрида. При исследовании в УФ-области продуктов дезметилирования с применением диагностирующих реагентов было установлено наличие дополнительных оксигрупп в положении 3'.

Таблица 3

Соединение	Полосы поглощения в ИК-области агликонов			
	Полосы поглощения в ИК области, ν см ⁻¹			
	C=O	-OH	C=C ароматического кольца	ОСН ₃
А1	1665	3300, 3380	1615, 1565, 1515	-
А2	1658	3455	1605, 1565, 1505	2895
А3	1660	3340	1615, 1570, 1510	-

Положение свободных оксигрупп подтверждено также получением при щелочной деструкции фенола, идентифицированного с флороглюцином, свидетельствующего о флороглюциновой структуре кольца А и фенолкарбоновых кислот: п-оксibenзойной А3; протокатеховой А1, ванилиновой А2.

Выход агликона вещества А1 равен 65,51% (среднее из 6 определений), выход агликона вещества А2 равен 69,48% (среднее из 6 определений).

Сопоставляя результаты собственных исследований: значения R_f в различных системах, качественные реакции, физико-химические свойства, температура плавления веществ, продуктов щелочного расщепления, а также результаты УФ- и ИК-спектроскопии с литературными данными, касающимися кверцетина, изорамнетина, кемпферола, можно предположить, что выделенное вещество А1 это 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавоны (кверцетин), А2 – 3,5,7,4'-тетраокси-3'-метоксифлавоны (изорамнетин), А3 – 3,5,7,4'-тетраоксифлавоны (кемпферол).

Следующим этапом нашей работы явилось изучение монозидов.

Изучаемые вещества дают положительную цианидиновую реакцию по Брианту, что свидетельствует об их флавоноидной природе, а факт неперехода красно-оранжевого пигмента в слой октанола свидетельствует о принадлежности исследуемого вещества к гликозидам, что находит подтверждение в реакции восстановления жидкости Фелинга после предварительного их гидролиза. Со спиртовым раствором хлорного железа изучаемые гликозиды образуют темно-зеленое окрашивание (табл. 4); отрицательная реакция с 2% метанольным раствором хлорокиси циркония и лимонной кислоты подтверждает наличие свободной оксигруппы в 5 положении.

Таблица 4

Соединение	Система		Окраска пятен					
	А	В	В видимом свете	В УФ-свете	NH ₃ в УФ-свете	AlCl ₃ 5% этанольный раствор в УФ-свете	KOH метанольный раствор в УФ-свете	FeCl ₃ этанольный раствор в УФ-свете
	R _f	R _f						
М1	0,55	0,62	Темно-желтая	Желтая	Желто-зеленая	Желтая	Желто-оранжевая	Темно-зеленая
М2	0,52	0,65	Темно-желтая	желтая	Желто-зеленая	Желтая	Желто-оранжевая	-
М3	0,43	0,72	Бледно-желтая	Коричневая	Желтая	Желто-зеленая	Оранжевая	-



Реакция Вильсона – одна из специфических на флавоноиды – давала положительный результат. Исследуемые вещества не восстанавливают аммиачного раствора нитрата серебра, что указывает на отсутствие о-диоксигруппировки в В-кольце.

При хроматографировании на бумаге с достоверными образцами гликозидов в различных системах растворителей, полное совпадение по окраске пятен до и после проявления, а также значением R_f наблюдалось у вещества М1 с изорамнетин-3-β-D-глюкопиранозидом, у вещества М2 с изорамнетин-3-β-D-галактопиранозидом и вещества М3 с кемпферол-3-β-D-глюкопиранозидом.

При спектральном исследовании в УФ-области (табл. 5) с применением комплексообразующих и ионизирующих реактивов обнаружили свободные оксигруппы в 5,7,4' – положениях (М1 и М2,); и в 5,4' – положении (вещество М3). Батохромия циркониевых комплексов на 40-46 нм по сравнению со значительно большей батохромией – 90 нм, наблюдающейся в их агликонах, указывает, что углеводный компонент находится у С-3. При подкислении циркониевых комплексов лимонной кислотой наблюдалось восстановление исходного спектра веществ.

Таблица 5

Спектральные характеристики в УФ-области монозидов

Соединение	Полосы поглощения	2•10 ⁻⁵ мол. р-р в этаноле	Положение максимума поглощения, нм											
			ZrOCl ₂	ZrOCl ₂ + Лим.к-та	CH ₃ COONa	CH ₃ COONa + H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ + HCl	C ₂ H ₅ ONa					
М1	I	351	400/45	355/0	-	-	365	+8	-	-	-	-	-	
	II	253	255/0	255/0	-	-	254	-	-	-	-	-	-	
М2	I	348	416/40	380/4	-	-	363	+6	-	-	-	-	-	
	II	252	270/7	270/7	-	-	250	-	-	-	-	-	-	
М3	I	349	402/46	355/-1	383	+34	349	0	397	+48	387	+38	401	+52
	II	267	256/1	255/0	275	+8	267	0	275	+8	275	+8	275	+8

В результате проведенного кислотного и ферментативного гидролиза получены продукты, которые выделены препаративно и на основании физико-химических свойств, а также хроматографического сравнения с известными образцами идентифицированы как D-глюкоза и 3,5,7,4'-тетраокси-3'-метоксифлаван (изорамнетин); D-галактоза и изорамнетин, D-глюкоза и 3,5,7,4'-тетраоксифлаван (кемпферол). Количественный кислотный гидролиз дает основание полагать, что исходные вещества являются монозидами. Легкое отщепление углеводного компонента в результате кислотного гидролиза указывает на то, что данный компонент не ацилирован и находится в 3 положении. Подтверждением этому служат отрицательные результаты, полученные при щелочном гидролизе. Факт отщепления ферментом гриба *Aspergillusoryzae* D-глюкозы в веществах М1 и М3; D-галактозы в веществе М2 дает основание предположить наличие β-гликозидной связи в изучаемых соединениях (табл. 6).

Таблица 6

Результаты хроматографического исследования углеводного компонента монозидов

Система растворителей	Значение Rf					
	Исследуемых сахаров			«свидетелей»		
	М1	М2	М3	арабиноза	галактоза	глюкоза
А	0,19	0,17	0,19	0,24	0,17	0,19
Б	0,15	0,13	0,16	0,21	0,13	0,16
В	0,12	0,11	0,12	0,21	0,11	0,12
Г	0,16	0,14	0,16	0,22	0,14	0,16
Д	0,48-0,50	0,47	0,50	0,55	0,47	0,50
Окраска пятен после проявления анилинфталатом	Темно-коричневая	Темно-коричневая	Темно-коричневая	красноватая	Темно-коричневая	Темно-коричневая

Спектральные исследования в ИК-области методом дифференциального анализа (спектрограммы) показали наличие полосы, характерной для карбонила гамма-пиранового кольца (1660), сопряженных двойных связей (1595, 1578), фенольных гидроксильных групп (3300, 3340, 3270). Наличие полосы при 890 см является определяющим фактором β-конфигурации гликозидной связи в пиранозиде. Полосы при 1052, 1074 и 1098 см указывают, что углеводный компонент в исследуемых гликозидах находится в пиранозной форме (табл. 7). [7]



Таблица 7

Полосы поглощения в ИК-области монозидов

Соединение	Полосы поглощения в ИК области, ν см ⁻¹				
	C=O	-OH	C=C ароматического кольца	OCH ₃	Сахарного компонента
M1	1665	3385, 3100	1610, 1560	2985	1090, 1050, 1025, 890
M2	1660	3390, 3120	1610, 1565	2985	1085, 1055, 1030, 925, 890
M3	1660	3425, 3180	1610, 1575, 1510, 1455	-	1095, 1055, 1030, 902, 885

Итак, на основании данных химического и спектрального исследования, вещества можно охарактеризовать как изорамнетин-3-о-β-D-глюкопиранозид (M1) и изорамнетин-3-β-D-галактопиранозид (M2), кемпферол-3-о-β-D-глюкопиранозид (астрагалин) (M3).

Другие выделенные вещества представляют собой желтые микрокристаллические порошки, хорошо растворимые в 70% этаноле, метаноле, практически нерастворимы в эфире, хлороформе, бензоле, петролейном эфире, дают положительные качественные реакции на флавоноиды. При цианидиновой реакции заметно наличие пигмента только в водном слое, что характеризует полученные вещества как гликозиды. Жидкость Фелинга выделенные вещества восстанавливают после предварительного кислотного гидролиза. С 1% спиртовым раствором хлорного железа изучаемые гликозиды образуют темно-зеленое окрашивание; а с раствором основного ацетата свинца – желтый осадок. Вещества В2 и В3 окисляются на холоду аммиачным раствором нитрата серебра. С растворами щелочей образуют желто-оранжевое окрашивание, переходящее при стоянии в оранжево-красное. С 2% метанольным раствором хлорокиси циркония образует желтое окрашивание, исчезающее под действием метанольного раствора лимонной кислоты, что указывает на свободную оксигруппу в 5 положении.

Одномерной и двумерной хроматографией на бумаге в различных системах растворителей доказана индивидуальность выделенных соединений. На хроматограммах в УФ-свете все гликозиды обнаруживаются в виде темных пятен, цвет которых изменяется при действии хлорокиси циркония с последующей обработкой влажных хроматограмм парами аммиака и становится оранжевым; (В2, В3); желто-зеленым (В4). Значения R_f в различных системах растворителей (табл. 8) характеризуют изучаемые вещества как биозиды.

Таблица 8

Результаты хроматографического исследования биозидов

Система растворителей	Значение R_f исследуемых биозидов				
	В1	В2	Рутин	В3	В4
А	0,53	0,51	0,52	0,72	0,85
Б	0,75	0,74	0,74	0,80	0,84
В	0,54	0,47	0,47	0,39	0,27
Е	0,79	0,81	0,81	0,69	0,60
Ж	0,60	0,65	0,65	0,67	0,90
Д	0,57	0,55	0,55	0,70	0,82
Окраска пятен в УФ-свете	Темная				
	Оранжево-желтая		желто-зеленая		

При спектральном исследовании в УФ-области обнаружены свободные оксигруппы в 5,7,4' положении (В1 и В4), 5,7,3',4' положениях (В2 и В3). Батохромное смещение максимума 1й полосы под влиянием хлорокиси циркония на 40-54 нм, которое устранялось при добавлении избытка раствора лимонной кислоты, свидетельствует о наличии углеводного заместителя у С-3 (табл. 9). Устойчивость изучаемых гликозидов к щелочному гидролизу также подтверждает ранее высказанное. Для идентификации составных компонентов выделенных веществ был проведен кислотный ступенчатый гидролиз 0,05н раствором хлороводородной кислоты в 50% этаноле. При этом агликоны в виде следов появляются уже на 3й минуте, одновременно образуются новые вещества, которые занимали на хроматограмме промежуточное положение. К концу 1 часа наблюдается значительное количество этих продуктов. Эти данные позволили сделать предположение о том, что образующиеся вещества являются моногликозидами изучаемых соединений. Для идентификации этих веществ мы выделяли их препаративно хроматографией на бумаге. При хроматографическом исследовании в присутствии «свидетелей» была установлена идентичность промежуточных веществ В1, В2 – изорамнетин-3-о-D-глюкопиранозиду и кверцетин-3-о-D-глюкопиранозу; промежуточных веществ В3 и В4 – кверцетин-3-о-D-галактопиранозиду и кемпферол-3-о-D-галактопиранозиду соответственно.



Таблица 9

Спектральные характеристики в УФ-области биозидов

Соединение	Полосы поглощения	2•10 ⁻⁵ мол. р-р в этаноле	Поглощение 2•10 ⁻⁵ мол. раствора в этаноле, нм													
			ZrOCl ₂		ZrOCl ₂ + лимонная к-та		CH ₃ COONa		CH ₃ COONa +H ₃ BO ₃		AlCl ₃		AlCl ₃ +HCl		C ₂ H ₅ ONa	
B1	I	356	410	54	360	4	373	17	360	4	401	45	395	39	415	59
	II	323	255	2	258	5	271	18	255	2	268	15	267	14	273	20
B2	I	358	403	45	359	1	383	25	279	21	420	6	395	37	-	-
	II	257	260	3	261	4	268	11	255	-2	275	18	270	13	255	-2
B3	I	360	405	45	365	5	385	25	387	27	425	65	400	40	-	-
	II	255	270	15	267	12	270	15	257	2	273	18	271	16	270	15
B4	I	355	395	4	356	1	370	15	355	0	393	3	355	0	370	15
	II	258	255	0	257	-1	272	14	260	2	268	8	270	12	268	10

Спектральные исследования в УФ-области показывают, что гликозилирование у промежуточных веществ гидролиза находится у С-3 (табл. 9).

Для определения строения биозидного заместителя в исследуемых гликозидах их подвергали также ферментативному расщеплению стереоспецифическим ферментным препаратом рамнодиастазы, отщепляющим биозы с 1-6 порядком связи между остатками моносахаридов. Хроматографией на бумаге установлено, что гликозиды расщепляются до биозы и агликонов. Агликоны на основании физико-химических свойств, спектральных и хроматографических исследований охарактеризованы как изорамнетин, кверцетин и кемпферол.

Для установления места присоединения углеводной части к агликону в гликозиде, а также определения порядка связи сахаров в биозе часто проводят окислительную деструкцию ароматической части гликозида перекисью водорода с последующим аминолизом. Применяв этот прием к изучаемым гликозидам, нами было установлено хроматографией на бумаге отщепление биоз и образование агликонов. Агликон вещества B4 хроматографическим и спектральным исследованием охарактеризовали как кемпферол. Окраска биоз на хроматограммах после проявления их специальным хромогенными реактивами показывает, что монозы в биозидах B1, B2, B3 связаны друг с другом в порядке 1-6; в биозиде B4 можно предположить в порядке 1-2.

Таблица 10

Биозиды и их физико-химические параметры

№ п/п	Название вещества	Брутто формула	Т.пл(С°)	УФ-спектры λ max (нм)	Кислотный гидролиз	
					Агликон	Сахарная часть
1	B1	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₁ •H ₂ O	180-182	266,354	Изорамнетин	D-глюкоза L-рамноза
2	B2	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₆	190-192	256,264, 355	Кверцетин	D-глюкоза L-рамноза
3	B3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	193-194	255,360	Кверцетин	D-галактоза L-рамноза
4	B4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	184-186	255,358	Кемпферол	D-галактоза L-арабиноза

Исследование биозидов методами дифференциальной ИК-спектроскопии с исключением вклада моногликозидов из спектров исследуемых соединений показало, что оба сахара имеют пиранозную форму и β-конфигурацию. В-конфигурация гликозидной связи между сахарами и агликонами исследуемых биозидов подтверждается также расщеплением изучаемых гликозидов ферментным препаратом *Aspergillusoryzae* и эмульсином.

Таким образом, исследуемые биозиды охарактеризованы как изорамнетин-3-о-β-D-глюкопиранозил-6-о-β-L-рамнопиранозид(B1), кверцетин – 3 – о – β – D – глюकोпиранозил-6-о-β-L-рамнопиранозид(B2), кверцетин-3-о-β-D-галактопиранозил-6-β-L-рамнопиранозид(B3), кемпферол – 3 – о – β – D – галактопиранозил – 2 – о – β – L -арабопиранозид(B4) (табл. 10).



Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 1998. – 154 с.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование (Hydrangeaceae – Haloragaceae). Род *Astragalus* L. Л., – 1987.- С. 109-125.
3. Сравнительное исследование химического состава видов рода хвощ флоры Сибири /Н.Э. Коломиец, Г.И. Калинкина//Химия растительного сырья. – 2010. – №1. – С.149-154.
4. Выделение флавоноидов из шелухи гречихи посевной – *Fagopyrumsagittatum*Gilib. (Polygonaceae)/Мягчилов А.В., Соколова Л.И.// Химия растительного сырья. – 2011. – №2. – С.123-126.
5. Гроссгейм. А.А. *Astragalus*L. // Флора Кавказа. Т. 5. М.; Л.: Изд-во АН СССР – 1952. – С. 245-335.
6. Содержание и состав флавоноидов и фенолкарбоновых кислот *Alfrediacernua* (Asteraceae) /Н.В. Кувачева [и др.]// Растительные ресурсы, – 2011. – вып 4. – С. 105-112.
7. Биологически активные вещества астрагала эспарцетного, произрастающего в Предкавказье /Гужва Н.Н.// Химия растительного сырья. – 2009. – №3. – С.123-132.
8. Государственная фармакопея СССР XI изд. Вып. 1: Общие методы анализа, – М., – 1987.- 336 с.

FLAVONOIDS OF ASTRAGAL SHORTYFRUITED (*ASTRAGALUS BRACHYCARPUS* M. B. FI)

In the upground part of astragal shortyfruited (*A. brachycarpus*) by the chromato-spectrophotometric methods was researched qualitative composition and quantitative content of flavonoids.

There are isoramnetin, quercetin, cempferol, isoramnetin-3- α - β -D-glucopyranoside and isoramnetin-3- β -D-galactopyranoside, cempferol-3-glucopyranoside (astragaline); isoramnetin-3- α - β -D-glucopyranosil-6- α - β -L-ramnopyranoside, quercetin-3- α - β -D-glucopyranosil-6- α - β -L-ramnopyranoside, quercetin-3- α - β -D-galactopyranosil-6- β -L-ramnopyranoside, cempferol-3- α - β -D-galactopyranosil-2- α - β -L-arabopyranoside was identified. Try to proving the structure of received compounds with use UV, IR-spectroscopy, differential IR-spectroscopy researching by the products alkaline melting and acidic hydrolysis. Quantitative determination of flavonoids in count on the absolutely dry raw was compiled 3,3%.

Keywords: astragal shortyfruited, flavonoids, hydrolysis, quantitative determination, differential UV-spectroscopy.

N.N. GUZHVA

T.T. LIHOTA

Z.N. BOGATIREVA

*Pyatigorsk State
Pharmaceutical Academy*

e-mail:

guzhvanikolai@rambler.ru