

## ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИОННОЙ ИОНИЗАЦИИ

Новиков О.О., Писарев Д.И., Журавель М.А.

*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия (308015, г. Белгород, ул. Победы, 85), <http://www.bsu.edu.ru>*

В статье изложены данные о химическом изучении цветков клевера лугового с использованием метода матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации. Метод MALDI нас привлёк по причине того, что позволяет анализировать смеси веществ без их предварительного разделения. Применение метода матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI) позволило предварительно охарактеризовать состав смесей флавоноидов в цветках клевера лугового без предварительного их разделения на отдельные компоненты. Выделение суммы флавоноидов осуществляли с помощью препаративной тонкослойной хроматографии. В выделенных элюатах методом УФ-спектроскопии в сочетании с шифт-реактивами обнаружены флавоноиды. Дальнейшую идентификацию проводили с помощью метода MALDI. Использование данного метода в сочетании с тонкослойной хроматографией и УФ-спектрофотометрией удалось идентифицировать в цветках клевера лугового кемпферол-3-глюкозида, гликозидов кверцетина и изорамнетина, изофлавоноидов - генистеина, биоханина, формононетина. 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, лутеолин-7-гликозид, генистеин, биоханин, формононетин.

## STUDY OF FLAVONOIDS CLOVER USING MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION

Novikov O.O., Pisarev D.I., Zhuravel M.A.

*FGAOU VPO Belgorod State national research University, Belgorod, Russia (308015, Belgorod, street of Pobedy, 85) <http://www.bsu.edu.ru>*

The article presents data on the chemical study of red clover flowers using the method matrix-assisted laser desorption ionization. We drew the MALDI method for the reason that makes it possible to analyze mixtures of compounds without prior separation. Application of matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) made it possible to pre-characterize the composition of mixtures of flavonoids in the flowers of red clover without their separation into individual components. An amount of flavonoids impl-stvlyali by preparative thin-layer chromatography. In isolated eluates by UV spectroscopy in combination with the shift-reagent detected flavonoids. Further identification of the method was performed using MALDI. Using this method in conjunction with the tone kosloynoy chromatography and UV spectrophotometry were able to identify in the flowers of red clover kaempferol-3-glucoside, quercetin glycosides and izoramnetin, isoflavones - Geni-Stein, biochanin, formononetin. The presence of flavonoids and isoflavonoids in the flowers of clover meadow-angle opens up wide prospects for drugs gipoholesterine-Economic and estrogen action.

Key words: red clover blossoms, flavonoids, isoflavones, mass spectrometry, UV-spektrosokpiya, luteolin-7-glycoside, genistein, biohanin, formononetin.

**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 [5].

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 [3].

Для анализа флавоноидов в объектах растительного происхождения применяют разнообразные инструментальные методы, в особенности хроматографические. В меньшей степени используется масс-спектрометрия, а именно матрично-активированная лазерная десорбционная ионизация (MALDI), метод, использующийся в основном для анализа высокомолекулярных соединений [1; 3; 4].

Метод MALDI нас привлёк по причине того, что позволяет анализировать смеси веществ без их предварительного разделения.

В связи с этим нами поставлена цель настоящего исследования – установление возможности применения метода матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI) для определения флавоноидного состава цветков клевера лугового.

В качестве объекта исследования был взят образец цветков клевера лугового, являющегося представителем местной флоры, широко распространённым, легко культивируемым в качестве кормового [2].

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

Для выделения флавоноидов нами использована схема, согласно которой сырьё – цветки клевера экстрагировали пятикратно 96%-ным 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 жёлтый кристаллический осадок отделяли центрифугированием.

Осадок очищали методом препаративной тонкослойной хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинках Silufol. 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-жёлтого цвета (Ф-1) соответствующая гликозиду, в верхней части хроматограммы локализовалась узкая полоса тёмного цвета (Ф-2) агликона. Слой силикагеля у полученной полосы снимали с хроматограммы и элюировали спиртом этиловым 96%-ным.

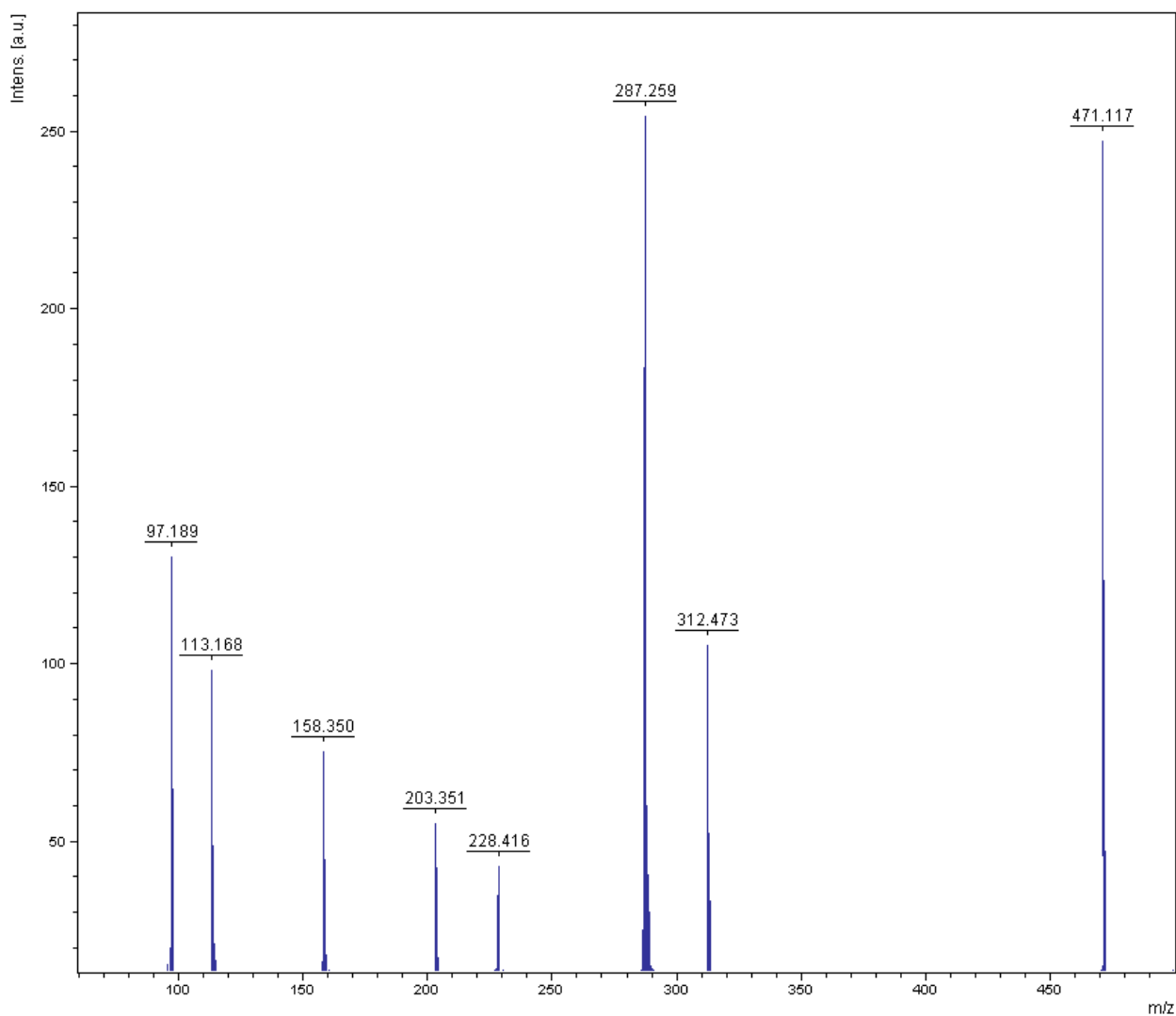
Элюат спектрофотометрировали на УФ-спектрофотометре СФ-56. УФ-спектр вещества Ф-1 в области 220–400 нм имел максимум поглощения 264 и 355 нм и два плеча 303 и 305 нм, что характерно для флавонолов.

Для установления расположения гидроксильных групп в структуре соединения использовали шифт-реактивы. При использовании шифт-пробы с алюминия хлоридом наблюдался батохромный сдвиг обеих полос поглощения – первой с 355 до 398 нм, второй с 264 до 273 нм, что свидетельствует о свободной гидроксильной группе в 5 положении.

Добавление нескольких капель соляной кислоты не привело к гипсохромному сдвигу, что говорит об отсутствии о-дигидроксигруппировки в кольце В. При добавлении ацетата натрия наблюдалась батохромия первой полосы поглощения, что свидетельствует о свободной гидроксильной группе в положении 7.

Регистрацию масс-спектров проводили на приборе масс-спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics производства Германии. Предварительно анализируемые пробы в количестве по 0,5 µl с помощью дозатора наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel TF», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали α-цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы Flex Control, обработку данных осуществляли в программе Flex Analis, в отражённом режиме при положительной полярности (reflective positive).

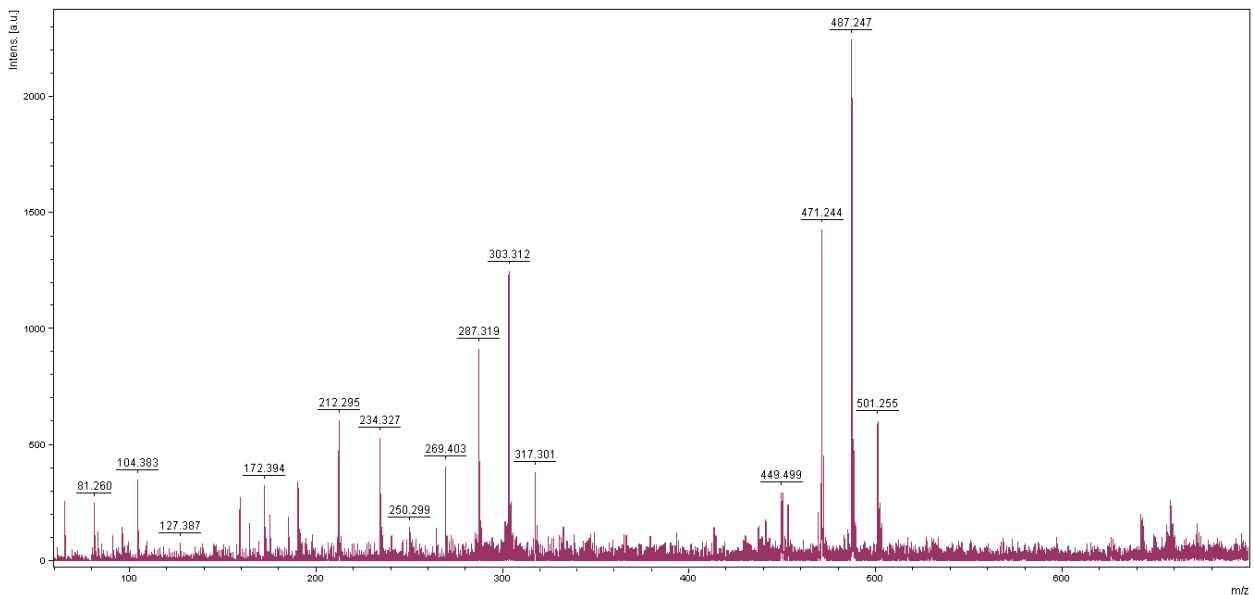
В масс-спектре изучаемого вещества наблюдался наиболее интенсивный пик иона  $m/z = 287,259$  – соответствующий кемпферолу, и менее выраженный пик иона  $m/z = 471,117$  – отвечающий гликозидной структуре (рис. 1).



**Рис. 1. Масс-спектр вещества Ф-1 из цветков клевера лугового.**

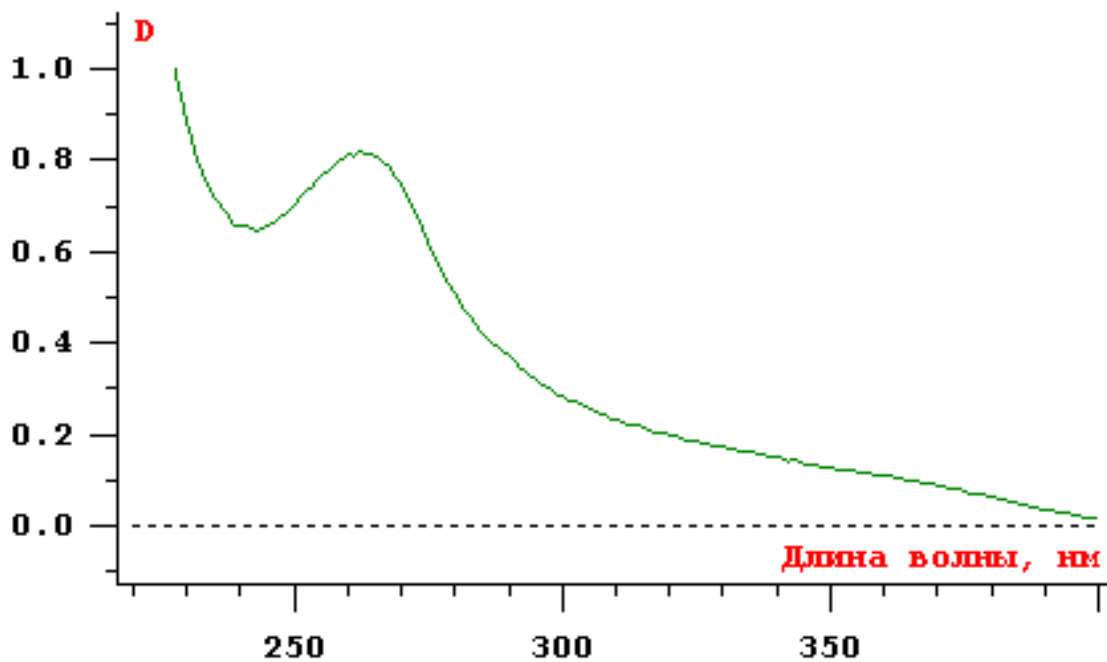
Приведённые выше данные позволили охарактеризовать вещество как кемпферол-3-глюкозид или трифолин.

Маточник после отделения осадка исследовали на наличие других флавоноидов методом масс-спектрометрии. Присутствие характеристических пиков молекулярных ионов с  $m/z = 303,312$  и  $487,247$  соответствует моногликозиду кверцетина в натриевой форме, а  $m/z = 317,301$  и  $501,255$  моногликозиду изорамнетина (рис. 2).



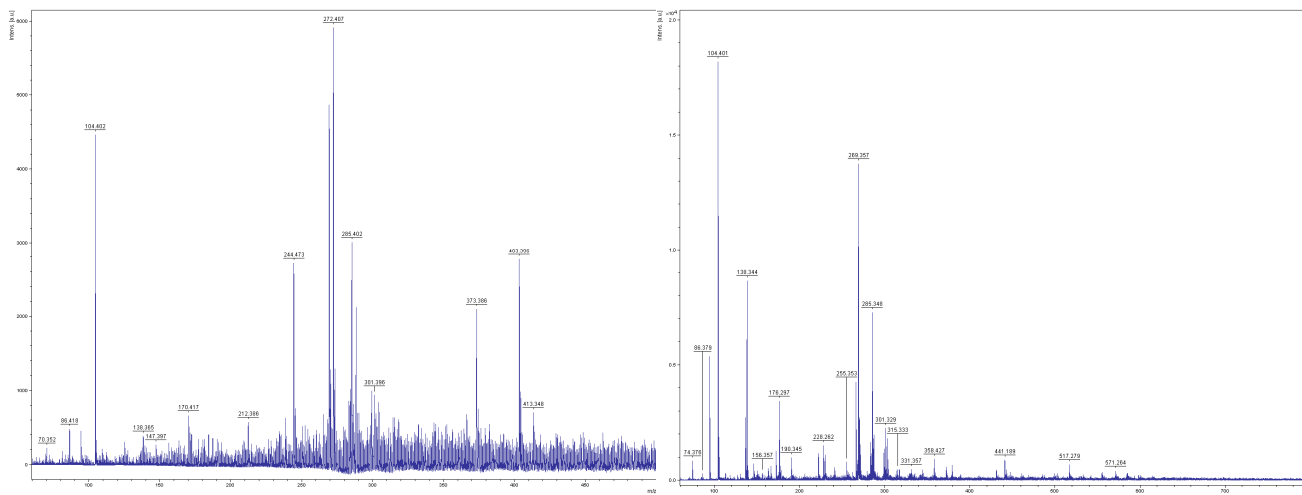
**Рис. 2. Масс-спектр этилацетатной фракции цветков клевера лугового.**

В хлороформной фракции обнаружены агликоны изофлавоноидов. Её предварительно упаривали досуха, растворяли в спирте этиловом и регистрировали УФ-спектры. В УФ-спектре в диапазоне 220–400 нм наблюдался один максимум поглощения при  $\lambda = 262$  нм, что характерно для изофлавоноидов группы генистеина (рис. 3).



**Рис. 3. УФ-спектр хлороформной фракции цветков клевера лугового.**

При масс-спектрометрическом исследовании полученной фракции наблюдалось присутствие трёх интенсивных пиков ионов  $m/z = 269,357$ ;  $285,348$  и  $272,407$  – соответствующих агликонам: формонетину, биоханину и генистеину (рис. 4).



**Рис. 4. Масс-спектр хлороформной фракции цветков клевера лугового.**

Таким образом, в ходе настоящего исследования установлено, что использование метода матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI) позволило предварительно охарактеризовать состав смесей флавоноидов в цветках клевера лугового без предварительного их разделения на отдельные компоненты.

### **Список литературы**

1. Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик / редкол.: Ю.Г. Бобков и др. XI изд. – М. : Медицина, 1987. – Вып. I: Общие методы анализа. – 334 с.
2. Дикорастущие полезные растения России : [справ.] / Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова, РАН, С.-Петербург. гос. хим.-фармац. акад. ; отв. ред.: А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб. : Изд-во СПХФА, 2001. – 662 с.
3. Органическая химия : учебник для студентов высш. учеб. заведений по спец. «Фармация»: в 2 кн. / под ред. Н.А. Тюкавиной. – М. : Дрофа, 2008. – Кн. 2: Спец. курс. – 591 с. (Высш. образование: соврем. учебник).
4. Отто М. Современные методы аналитической химии. – М. : Техносфера, 2006. – 543 с. (Мир химии).
5. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения : учеб. пособие / под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб. : СпецЛит: Изд-во СПХФА, 2002. – 405 с.

### **Рецензенты**

Дроздова И.Л., д.ф.н., профессор кафедры фармакогнозии и ботаники, декан фармацевтического факультета Курского государственного университета, г. Курск.  
 Бубенчикова В.Н., д.ф.н., профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, г. Курск.