

ВИВЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДНИХ ГЛІКОЗИДІВ ЛИСТКІВ
ЕНДОСПЕРМАЛЬНОГО МУТАНТА КУКУРУДЗИ SUGARY-1

З листків ендоспермального мутанта кукурудзи sugary-1 виділено та ідентифіковано 4 флавонових глікозиди: монозиди апігенін-7-О-глюкозид, цинарозид (лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид); біозиди сколимозид (лютеолін-7-О-L-рамнопіранозил-О-β-D-глюкопіранозид), хризеріол-7-О-рутинозид.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кукурудза, мутація, флавоноїдні сполуки.

ВСТУП. Створення нових лікарських препаратів із рослинної сировини є пріоритетним напрямком фармацевтичної промисловості. Найбільший інтерес викликають джерела фенольних сполук. Кукурудза є оптимальним джерелом отримання біологічно активних речовин. У медичній практиці використовують кукурудзяну олію, крохмаль та кукурудзяні стовпчики з приймочками [7, 10]. Листя кукурудзи в Україні застосовують виключно у тваринництві [1].

Ендоспермальний мутант кукурудзи sugary-1 було отримано шляхом введення в генотип кукурудзи звичайної зубподібної гена, що впливає на структуру ендосперму зернівки, сприяє накопиченню цукрів, знижує вміст крохмалю і підвищує вміст декстринів до 32 % [5]. Широким масам споживачів ця кукурудза відома під назвою “цукрова кукурудза”. Ген sugary-1, притаманний цукровій кукурудзі, є типовим для спонтанних природних мутацій, а отримані рослини не містять генів інших організмів.

У попередніх дослідках було вивчено біологічну активність листків ендоспермального мутанта кукурудзи sugary-1 та встановлено гепатопротекторну, антиоксидантну та протизапальну дії [2, 4, 6]. Хімічний склад листків кукурудзи майже не вивчено, тому метою роботи було комплексне дослідження біологічно активних речовин ендоспермального мутанта кукурудзи sugary-1, зокрема глікозидів флавоноїдів [3, 8, 9].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для проведення експерименту використовували листки куку-

© М.Ф. Ткаченко, В.М. Ковальов, А.Г. Кононенко, 2011.

рудзи sugary-1, зібрані у фазу молочно-воскової стиглості зернівок. Листки подрібнювали до часток розміром 1-2 мм. Для видалення ліпофільних речовин сировину триразово обробляли хлороформом. Екстракцію сировини проводили 70 % етанолом. Отриманий водно-етаноловий екстракт концентрували при нагріванні під вакуумом до густого водного залишку, який фракціонували за розчинністю речовин у ряді розчинників: діетиловий ефір, етилацетат, н-бутанол.

Кожну фракцію аналізували за допомогою хроматографії на папері. Монозиди флавоноїдів ідентифікували в етилацетатній і бутанольній фракціях, біозиди – в бутанольній.

Кожну фракцію змішували з порошком поліаміду і наносили на колонку. Десорбцію проводили сумішшю етилацетат–етанол у різних співвідношеннях зі збільшенням концентрації етанолу (9:1, 8:2). Елюати збирали з колонки порціями по 50–100 мл. Кожну порцію аналізували за допомогою одно- і двомірної хроматографії на хроматографічному папері Filtrak у системах розчинників: 2, 15, 30 та 60 % оцтова кислота; етилацетат–мурашина кислота–вода (10:2:3); н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2 або 4:1:5); бензол–етилацетат–оцтова кислота (50:50:1 та 70:30:1). Ідентичні фракції поєднували, концентрували і кристалізували.

З листків кукурудзи виділили речовини фенольної природи, позначені як **Ф1–Ф4**.

Для встановлення будови глікозидів використовували кислотний, лужний і ферментативний гідроліз. У гідролізатах ідентифікували аглікони і цукри.

Кислотний гідроліз проводили у жорстких і м'яких умовах. Для виявлення якісного складу глікозидів виконували жорсткий кислотний гідроліз 5 % сульфатною кислотою при нагріванні на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 2–4 год. Для визначення порядку приєднання цукрів до аглікону проводили кислотний гідроліз у м'яких умовах 0,5 % хлористоводневою кислотою при нагріванні в колбі зі зворотним холодильником протягом 1,5–2 год з відбором проб через 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 та 120 хв і наступним хроматографуванням продуктів гідролізу [12, 13].

Лужний гідроліз проводили у 0,5 % водному розчині гідроксиду калію при нагріванні на водяній бані протягом 3 год. Проби для аналізу відбирали через 5, 10, 20, 50, 60 і 120 хв, підкисляли і хроматографували в системах розчинників: 15 і 30 % оцтова кислота.

Ферментативний гідроліз проводили естеразами виноградного равлика. Для цього до досліджуваного витягу додавали суміш естераз виноградного равлика і нагрівали при 35–40 °С протягом 12–24 год, періодично відбираючи проби для аналізу. Після досягнення повноти гідролізу суміш розводили етанолом і кип'ятили на водяній бані для денатурації протеїнів, які входять до складу ферментів. Аглікони екстрагували ефіром або етилацетатом, цукри виділяли й ідентифікували з водного розчину.

Шляхом ацетилювання визначали кількість гідроксигруп. Ацетилювання проводили зі свіжоперегнаним оцтовим ангідридом за присутності кислих або основних каталізаторів (концентрована сірчана кислота, піридин, ацетат натрію) [16]. Досліджувані сполуки розчиняли в оцтовому ангідриді, додавали концентровану сульфатну кислоту, через 3 хв додавали холодну воду і залишали на 10–12 год. Продукти, що виділилися, кристалізували з відповідних розчинників. Фізико-хімічні властивості ацетильних похідних використовували для ідентифікації окремих сполук [13, 14–16]. Температуру плавлення флавоноїдів і їх похідних визначали на блоці Кофлера (Franz Kystner nqch K:G:Dresden; N.K. 70/3314k). Нагрівання проводили зі швидкістю 4 °С/хв. Виміри робили в трьох повторностях.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Флавоноїдну природу досліджуваних речовин **Ф1–Ф4** підтверджували даними хроматографічної рухливості та ІЧ-спектрів, у яких виявляли смуги поглинання в ділянках 3400–3300 см⁻¹ (спир-

тові гідроксигрупи вуглеводів), 2900 см⁻¹ (фенольні гідроксигрупи), 1660 см⁻¹ (карбонільна група γ-пірону).

У продуктах гідролізу речовин **Ф1–Ф4** ідентифікували прості цукри: D-глюкозу в речовинах **Ф1, Ф2, Ф4**; D-глюкозу й рамнозу в речовинах **Ф3, Ф4**. Для ідентифікації вуглеводної частини використовували метод хроматографії на папері порівняно з достовірними зразками цукрів.

Після проведення кислотного гідролізу з гідролізатів виділяли аглікони: агліконом речовини **Ф1** був апігенін; речовин **Ф2** та **Ф3** – лютеолін; речовини **Ф4** – хризеріол.

За молекулярною масою, кількісним визначенням продуктів кислого та лужного гідролізу встановили, що речовини **Ф1** та **Ф2** віднесені до монозидів, а речовини **Ф3, Ф4** – до біозидів.

Відсутність батохромного зсуву з ацетатом натрію, що була встановлена за допомогою УФ-диференційної спектроскопії, свідчить про наявність заміщення в С-7 для речовин **Ф1–Ф4** [11, 12, 16]. Наявність гідроксигрупи в С-5 речовин **Ф1–Ф4** підтверджували якісними реакціями з розчином хлориду цирконілу. При додаванні розчину лимонної кислоти в метанолі інтенсивна жовта флуоресценція не зникала. Вільні гідроксили у С-3', С-4' речовин **Ф2** та **Ф3** визначали борно-ацетатним реактивом. В ІЧ-спектрі речовин **Ф1–Ф4** спостерігали 3 смуги поглинання в ділянці 1100–1010 см⁻¹, що підтверджує піранозну форму цукрів, а смуга при 890 см⁻¹ вказує на β-глікозидний зв'язок піранозидів.

На підставі отриманих результатів фізико-хімічних досліджень і порівняно з достовірними зразками ідентифікували виділені сполуки як флавонові глікозиди: монозиди – **Ф1** – апігенін-7-О-β-D-глюкопіранозид, **Ф2** – цинарозид або лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид; біозиди – **Ф3** – сколимосид або лютеолін-7-О-L-рамнопіранозил-β-D-глюкопіранозид, **Ф4** – хризеріол-7-О-L-рамнопіранозил-О-β-D-глюкопіранозид або 3'-метокси-лютеолін-7-О-L-рамнопіранозил-О-β-D-глюкопіранозид.

Фізико-хімічні властивості ідентифікованих сполук наведено в таблиці.

ВИСНОВКИ. З листків ендоспермального мутанта кукурудзи *sugar1* виділено та ідентифіковано 4 флавонових глікозиди: монозиди апігенін-7-О-β-D-глюкопіранозид, цинарозид (лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид); біозиди сколимосид (лютеолін-7-О-L-рамнопіранозил-

Таблиця – Фізико-хімічні властивості флавонових глікозидів листків ендоспермального мутанта кукурудзи sugary-1

| Сполука | Речовина | Формула | М.м. | Т. пл., °С | λ max, нм |
|---------|---|---|--------|------------|---------------|
| Ф1 | Апігенін-7-О-глюкозид | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 432,41 | 176–178 | 335, 265 |
| Ф2 | Цинарозид (лютеолін-7-О-β-D-глюкопіранозид) | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 448,41 | 320–322 | 350, 265, 255 |
| Ф3 | Сколимозид (лютеолін-7-О-L-рамнопіранозил-О-β-D-глюкопіранозид) | C ₂₇ H ₃₂ O ₁₇ | 628,59 | 257–259 | 256, 265, 343 |
| Ф4 | Хризериол-7-О-рутинозид | C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ | 608,60 | 173–175 | 253, 268, 350 |

О-β-D-глюкопіранозид), хризериол-7-О-L-рамнопіранозил-О-β-D-глюкопіранозид.

Враховуючи те, що листки кукурудзи sugary-1 мають різноманітні види фармаколо-

гічної активності, цей новий вид сировини є перспективним і потребує подальшого вивчення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болотских А. С. Овощи Украины / А. С. Болотских. – Х. : Орбита, 2001. – 1088 с.

2. Вивчення гепатопротекторної активності екстракту листків кукурудзи в умовах гострого тетрахлорметанового гепатиту / А. Г. Кононенко, Л. М. Малоштан, М. Ф. Ткаченко, В. М. Ковальов // Запорозький медичинський журнал. – 2009. – **11**, № 5. – С. 115–117.

3. Вивчення флавоноїдного складу листків кукурудзи su-1 / М. Ф. Ткаченко, В. М. Ковальов, А. Г. Кононенко, Л. М. Малоштан // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. – К., 2009. – Вип. 18, кн. 3. – С. 497–502.

4. Використання субстанції рослинного походження водного екстракту листків кукурудзи для розробки лікарського засобу гепатопротекторної дії : інформ. лист про нововведення в системі охорони здоров'я / Л. М. Малоштан, А. Г. Кононенко, В. М. Ковальов, М. Ф. Ткаченко. – К., 2009. – Вип. 31 з проблем «Фармація». – 4 с.

5. Класифікатор-довідник виду *Zea mays* L. / [В. В. Кириченко, І. А. Гур'єва, В. К. Рябчун, та ін.]. – Харків: ІР ім. В. Я. Юр'єва УААН, 2009. – 83 с.

6. Пат. 86502 Україна, МПК А 61 К 36 / 899, А 61 К 127 / 00, А 61 Р 7 / 10, А 61 Р 11 / 02, А 61 Р 17 / 08, А 61 Р 39 / 06, А 61 Р 43 / 00. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з антиоксидантною та протизапальною дією / Ковальов В. М., Малоштан Л. М., Субота Н. П., Кононенко А. Г., Ткаченко М. Ф. ; патентовласник Нац. фармац. ун-т. – № а 200708446 ; заявл. 23.07.07 ; опубл. 27.04.09, Бюл. № 8.

7. Пикунов Е. Лекарственные растения от А до Я / Е. Пикунов, Н. Рожкова. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2006. – 428 с.

8. Ткаченко М. Ф. Вивчення елементного складу листя ендоспермальних мутантів кукурудзи / М. Ф. Ткаченко // Перспективи створення в Україні лікарських препаратів різної спрямованості дії : мате-

ріали Всеукр. наук.-практ. семінару, 26 лист. 2004 р. – Х. : Вид-во НФаУ, 2004. – С. 267–270.

9. Ткаченко М. Ф. Вивчення жирнокислотного складу вегетативних та генеративних органів ендоспермальних мутантів кукурудзи / М. Ф. Ткаченко, В. М. Ковальов // Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок : наук.-практ. конф. – Тернопіль, 2004. – С. 127.

10. Формазюк В. И. Энциклопедия пищевых лекарственных растений: Культурные и дикорастущие растения в практической медицине / под ред. Н. П. Максютинной. – К. : А.С.К., 2003. – 792 с.

11. Casati P. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in *Zea mays* genotypes with varying flavonoid content / P. Casati, V. Walbot // Plant Physiol. – 2003. – **132**, № 9. – P. 1739–1754.

12. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications / ed. by O. M. Andersen, K.R. Markham. – N.-Y. : CRC Press, 2006. – 1212 p.

13. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry / A. Plazonic, F. Bucar, Z. Males [et al.] // Molecules. – 2009. – **14**, № 1. – P. 2466–2490.

14. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract / D. Dekanski, S. Janicijevic-Hudomal, V. Tadic [et al.] // O. Serb. Chem. Soc. – 2009. – **74**, № 4. – P. 367–377.

15. Suzuki R. A. New Flavone C-Glycoside from the Style of *Zea mays* L. with Glycation Inhibitory Activity / R. Suzuki, Y. Okada, T. Okuyama; Department of Natural Medicine and Phytochemistry, Meiji Pharmaceutical University // Chemical and pharmaceutical bulletin. – 2003. – **51**, № 10. – P. 1186–1188.

16. The Science of Flavonoids. ed. by E. Grotewold. – Springer Science + Business Media, 2006. – 274 p.

М.Ф. Ткаченко, В.Н. Ковалев, А.Г. Кононенко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ ЛИСТЬЕВ ЭНДОСПЕРМАЛЬНОГО МУТАНТА КУКУРУЗЫ SUGARY-1

Резюме

Из листьев эндоспермального мутанта кукурузы *sugary-1* выделены и идентифицированы 4 флавоновых гликозида: монозиды апигенин-7-О-глюкозид, цинарозид (лютеолин-7-О-β-D-глюкопиранозид); биозиды сколимосид (лютеолин-7-О-L-рамнопиранозил-О-β-D-глюкопиранозид), хризериол-7-О-рутинозид.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кукуруза, мутация, флавоноидные соединения.

M.F. Tkachenko, V.M. Kovaliov, A.H. Kononenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

STUDY OF FLAVONS GLYCOSIDES LEAVES OF ENDOSPERMAL MUTANT OF CORN SUGARY-1

Summary

4 flavons glycosides: monosides: apigenin-7-O-glucoside, cynaroside (luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside); biosides: scolimoside (luteolin – 7-O-L-rhamnoside- O-β-D – glucopyranoside), chrisoeriol-7-O-rutinoside were isolated and identified from leaves of endospermal mutant of corn *sugary-1*.

KEY WORDS: corn, mutation, flavonoids compounds.

Отримано 17.12.10

Адреса для листування: М.Ф. Ткаченко, Національний фармацевтичний університет, вул. Блюхера, 4, Харків, 61146, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ