

<https://doi.org/10.3176/biol.1967.2.04>

М. ТОХВЕР, Л. ХАЛЛОП, Э. МАРГНА, У. МАРГНА

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЛАВОНОИДОВ ПРОРОСТКОВ ГРЕЧИХИ

Несмотря на то, что флавоноидный комплекс гречихи (*Fagopyrum* spp.) уже неоднократно подвергался физико-химическим исследованиям, число и природа отдельных производных его по-прежнему окончательно не выяснены. Данные литературы по этому вопросу противоречивы, а выводы большей частью недостаточно экспериментально обоснованы. Это касается и проростков гречихи, хотя последние представляют собой почти классический объект для изучения различных вопросов биосинтеза и обмена флавоноидных соединений в растениях.

В общем более или менее определенно известно лишь то, что один из встречающихся пигментов — флавоноловый гликозид рутин (кверцетин-3-рутинозид). Р. Хэнсел и Л. Хэрхаммер (Hänsel, Hörhammer, 1954) нашли, что наряду с рутином в гречихе встречаются три флавоноловых гликозида, два из которых ими предположительно идентифицированы как гиперозид (кверцетин-3-галактозид) и кверцитрин (кверцетин-3-рамнозид). Э. Алгримм (Ahlgrimm, 1955), изучая содержание флавонолов в листьях гречихи в зависимости от их возраста, указывает на наличие, кроме рутина, ряда других флавоноловых гликозидов, число и природа которых остаются неопределенными. По данным более подробной работы Р. Басслера (Bassler, 1957) с применением хроматографического анализа на бумаге, качественный состав флавоноидов в различных органах гречихи не одинаков, причем в семядольных листочках проростков им найдены рутин и четыре сопутствующих пигмента. К такому же выводу приходили и некоторые другие авторы, но их мнения в отношении возможной химической структуры сопутствующих флавоноидов существенно расходятся. Одни (Harraschain, Mohr, 1963) предполагают, что все флавоноиды проростков гречихи представляют собой аналогично рутину производные типа флавонол-3-гликозидов. Дж. Тройер же (Troyer, 1955) считает, что из обнаруженных пяти производных гликозидом является лишь рутин, остальные четыре — либо флавоны, либо флавонолы, которые по свойствам более всего напоминают производные апигенина и некоторые замещенные производные кверцетина.

Следует отметить, что методы, которыми располагали Дж. Тройер и некоторые другие из вышеуказанных авторов, были недостаточны для подробной характеристики всех особенностей структуральной конфигурации флавоноидной молекулы и не позволили произвести точной и достоверной идентификации. Очевидно, поэтому в недавно опубликованных обзорах о распространении флавонов, флавонолов и их гликозидов

гречишу называют только в связи с рутином, а о возможном наличии в ней других сопутствующих флавоноидов даже не упоминается (Hattori, 1962; Gripenberg, 1962).

В связи с тем, что проростки гречиши — одни из лучших объектов не только для изучения особенностей метаболизма флавоноидных соединений, но и для выяснения на примере регулирования биосинтеза флавоноидов некоторых сторон фотоконтролирующего действия фитохромной ферментной системы, вопрос о качественном составе флавоноидного комплекса гречиши по-прежнему ждет решения. Хорошие перспективы для этого открылись благодаря предложенным в последние годы специфическим пробам спектрофотометрического анализа, позволяющим весьма точно определять расположение отдельных функциональных групп в молекуле флавоноидов при использовании только микроколичеств изучаемых веществ.

Целью настоящей работы и было более детальное изучение и возможная идентификация флавоноидных производных проростков гречиши с применением новейших методов спектрофотометрического и хроматографического анализов.

Материал и методика

Для исследований использовали 6-дневные проростки гречиши (*Fagopyrum esculentum* Moench) местного сорта 'Йыгеваская отборочная', выращенные из семян урожая 1964 года из репродукции Йыгеваской селекционной станции Эстонского научно-исследовательского института земледелия и мелиорации.

Проростки выращивались при искусственном освещении в специальной световой камере с температурой 22—25°C. Семена проращивались в стеклянных кристаллизаторах или эмалированных кюветах на двух-трех слоях прокипяченной в течение 15 часов фильтровальной бумаги, смоченных дистиллированной водой. Источником света служили люминесцентные лампы дневного света, расположенные на высоте 25 см от семян и обеспечивающие интенсивность освещения 31 500 эрг/см²·сек. Режим освещения: первые 48 часов — полная темнота, затем 16-часовые периоды освещения чередовались с 8 часами темноты. По истечении 6 дней корни удаляли, а гипокотили и семядольные листочки отдельно подвергали анализу.

Комплекс флавоноидов как из гипокотилей, так и из семядольных листочков, выделялся по ранее описанной одним из нас методической схеме с той лишь разницей, что материал подвергался экстракции в сыром виде (Маргна, 1964). При этом для предотвращения возможного спонтанного расщепления флавоноидных гликозидов в результате гидролитического влияния имеющихся в материале органических кислот в колбу для экстрагирования прибавляли небольшое количество углекислого кальция. Полученный в итоге очищенный алкогольный раствор смеси изучаемых флавоноидных соединений подвергали хроматографированию. Анализы проводились методом восходящей хроматографии на бумаге.

Для разделения использовали дважды промытую кислотой хроматографическую бумагу марки FN-11 (ГДР). Растворители: А, Б, В и Г — соответственно 15%-ная, 25%-ная, 40%-ная и 60%-ная уксусная кислота; Д — *m*-крезол : уксусная кислота : вода, 50 : 2 : 48 (верхняя фаза); Е — уксусноэтиловый эфир : уксусная кислота : вода, 5 : 2 : 5 (верхняя фаза); Ж — то же (нижняя фаза); З — уксусноэтиловый эфир : муравьиная кислота : вода, 10 : 2 : 3; И — *n*-бутанол : уксусная кислота : вода, 4 : 1 : 2,2; К — *n*-бутанол : 21%-ная уксусная кислота, 1 : 1 (верхняя фаза); Л — изобутанол : хлороформ : вода, 4 : 2 : 4 (верхняя фаза); М — изоамиловый спирт : петролейный эфир : уксусная кислота : вода, 3 : 1 : 3 : 3 (верхняя фаза); Н — то же (нижняя фаза). Расположение пятен флавоноидов на хроматограммах, а также их ориентировочную химическую природу устанавливали по флуоресценции в ультрафиолетовом свете до и после воздействия парами аммиака. Кроме этого, пятна ха-

рактизовали по цветным реакциям с 2% -ным водным раствором хлорного железа, с 0,2% -ным раствором железоаммониевых квасцов в воде, с 1% -ным этанольным раствором хлористого алюминия, с 2% -ным метанольным раствором хлористого циркония плюс 5% -ный водный раствор лимонной кислоты, с диазотированной сульфаниловой кислотой, с реактивами Уилсона и Бенедикта и с металлическим магнием в присутствии концентрированной соляной кислоты (реакция проводилась в алкогольном элюате отдельных пятен) (Harborne, 1959; Гейсман, 1960; Прохазка, 1962; Seikel, 1962, 1964). На основании 24—32 отдельных хроматограмм для всех флавоноидов были вычислены хроматографические константы R_f , R_M (Bate-Smith, Westall, 1950), а также величина R_{Rut} , представляющая собой расстояние пятна изучаемого флавоноида от линии старта, отнесенное к расстоянию пятна стандартного вещества рутина от той же линии (Маргна, 1966). Аутентным образцом рутин служил препарат чехословацкой фирмы «Chemapol».

Для гидролитического расщепления возможной гликозидной связи у изучаемых флавоноидов использовали алкогольные элюаты отдельных пятен. Элюаты выпаривали досуха и остаток обрабатывали 10% -ной серной кислотой в течение от 15 минут до 12 часов на кипящей водяной бане. Охлажденный гидролизат повторно извлекали уксусноэтиловым эфиром, объединенные извлечения выпаривали досуха, остаток растворяли в этаноле и подвергали хроматографическому изучению на агликоны. Аутентичными стандартами при этом служили коммерческие препараты кверцетина (производства фирмы «Chemapol») и апигенина.

Оставшийся после извлечения гидролизата водный раствор, обладающий сильной кислой реакцией, нейтрализовали (по конго-красному) осторожным прибавлением углекислого бария. Затем раствор освободили от посторонних примесей центрифугированием и последующим фильтрованием, фильтрат выпаривали досуха, остаток растворяли в теплой воде и подвергали хроматографическому анализу на сахара с применением для разделения смеси растворителей И. Метчиками служили образцы сахаров отечественного производства.

Для спектрофотометрического изучения свойств флавоноидов пятна отдельных производных на хроматограммах элюировали 95% -ным этанолом и с помощью кварцевого спектрофотометра СФ-4А измеряли спектры поглощения элюатов в ультрафиолетовом свете. Стандартами служили алкогольные элюаты из соответствующих областей бумаги на контрольных хроматограммах. Кроме того, определяли размеры смещений максимумов поглощения отдельных флавоноидов при прибавлении плавленного уксуснокислого натрия, 1% -ного этанольного раствора хлористого алюминия, насыщенного этанольного раствора борной кислоты с твердым уксуснокислым натрием, 0,2М этилата натрия (Jurd, Horowitz, 1957; Jurd, 1962; Harborne, 1964), а также 0,4% -ного этанольного раствора хлористого циркония и его же с 4% -ным раствором лимонной кислоты (Литвиненко, Максютин, 1965). Спектры измеряли в четырехугольных кварцевых кюветах толщиной 10 мм.

Вариационно-статистическая оценка данных при сравнении значений R_f , R_M и R_{Rut} изучаемых флавоноидов с соответствующими показателями известных стандартных веществ проводилась по критерию Стьюдента способом парных сравнений (Бейли, 1962).

Результаты исследований

На основании хроматографического анализа при всех использованных типах растворителей можно сказать, что флавоноидный комплекс из семядольных листочков проростков гречихи состоит из пяти индивидуальных соединений, которые, судя по их темно-коричневой флуоресценции в ультрафиолетовых лучах, относятся либо к флавоновым, либо к флавоноловым производным. Одно из обнаруженных производных, обозначенное нами как флавоноид № 5, на хроматограммах всегда занимает позицию, совпадающую с положением аутентичного рутина (табл. 1), дает

Таблица 1

Значения R_f , R_M и R_{Rut} флавоноида № 5 и R_f и R_M аутентичного рутина при разных системах растворителей

Растворитель	Рутин		Флавоноид № 5		
	R_f	R_M	R_f	R_M	R_{Rut}
А	0,57	-0,12	0,55	-0,09	0,97
Б	0,68	-0,32	0,63	-0,23	0,99
В	0,75	-0,48	0,78	-0,55	1,04
Г	0,80	-0,61	0,79	-0,58	0,99
Д	0,50	-0,01	0,49	0,01	0,98
Е	0,36	0,24	0,39	0,20	1,06
Ж	0,83	-0,69	0,87	-0,84	1,01
З	0,39	0,20	0,40	0,18	1,04
И	0,57	-0,12	0,59	-0,16	1,04
К	0,53	-0,05	0,56	-0,10	1,06
Л	0,43	0,12	0,42	0,15	0,97
М	0,25	0,48	0,27	0,44	1,07
Н	0,86	-0,79	0,86	-0,79	1,00

сходные с ним цветные реакции, легко расщепляется при гидролизе на кверцетин, рамнозу и глюкозу и обладает совпадающими с рутином спектральными свойствами, в силу чего несомненна его тождественность с указанным широкораспространенным флавонол-3-гликозидом. В гипокотиле установлено лишь одно производное типа флавоноидов, которое по хроматографическому поведению, а также всем другим свойствам не отличается от рутина. Кроме флавоноидов, как в гипокотиле, так и в семядольных листочках обнаружен ряд родственных им соединений из группы оксикоричных кислот, которые в настоящей работе подробнее не изучались.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают уже ранее высказанные предположения о наличии в гипокотиле гречихи только одного рутина, а в семядольных листочках проростков — пяти различных производных флавоноидного характера, одно из которых несомненно идентично с рутином (Troyer, 1955; Bassler, 1957; Harraschain, Mohr, 1963). Остальные четыре флавоноида семейства весьма четко разделяются на две группы, существенно отличающиеся по крайней мере по некоторым основным параметрам как друг от друга, так и от рутина. По результатам подробного хроматографического и спектрофотометрического анализов флавоноиды вышеуказанных групп обладают следующими физико-химическими характеристиками.

Флавоноиды № 1 и 3 (в основу нумерации положено взаимное расположение пятен при разделении комплекса в 15%-ной уксусной кислоте; нумерация начинается с наиболее близкого к стартовой линии пятна). Способность к продвижению на бумаге при хроматографическом разделении изучаемого комплекса у производного № 1 во всех растворителях значительно ниже других флавоноидов независимо от степени полярности или кислотности использованной смеси. В общем значения R_f для флавоноида № 1 колеблются в пределах 0,2—0,4 и только в растворителях Г и Н они больше 0,5 (табл. 2). Флавоноид № 3 хроматографически более подвижен, но аналогично флавоноиду № 1 и в противоположность рутину и флавоноиду № 5 также не проявляет сколько-нибудь существенной зависимости от полярности растворителей. В среднем значения R_f для флавоноида № 3 приблизительно на 0,15 единицы выше, чем у производного № 1, колеблясь в большинстве растворителей в пределах 0,35—0,60 (табл. 2).

В ультрафиолетовых лучах оба флавоноида обнаруживают темно-

Примечание. Гипотеза о том, что средние различия между отдельными хроматографическими константами рутина и флавоноида № 5 существенно отличаются от нуля, опровергается проверкой с помощью t -критерия. Соответствующие значения t для отдельных различий — $t_{Rf} = 0,84$; $t_{R_M} = 0,97$; $t_{R_{Rut}} = 1,70$ — значительно ниже критического значения $t = 2,18$ для 5%-ного уровня значимости при 12 степенях свободы, что подтверждает полную хроматографическую идентичность флавоноида № 5 с рутином.

Таблица 2

Значения R_f , R_M и R_{Rut} флавоноидов № 1 и 3 при разных системах растворителей

Растворитель	Флавоноид № 1			Флавоноид № 3		
	R_f	R_M	R_{Rut}	R_f	R_M	R_{Rut}
А	0,20	0,61	0,35	0,38	0,21	0,67
Б	0,34	0,30	0,50	0,53	-0,06	0,79
В	0,49	0,01	0,66	0,67	-0,31	0,89
Г	0,60	-0,17	0,75	0,75	-0,49	0,94
Д	0,18	0,67	0,35	0,32	0,32	0,64
Е	0,33	0,30	0,92	0,39	0,17	1,08
Ж	0,40	0,17	0,49	0,71	-0,39	0,84
З	0,32	0,33	0,82	0,42	0,11	1,14
И	0,41	0,15	0,73	0,61	-0,19	1,07
К	0,39	0,19	0,74	0,56	-0,11	1,08
Л	0,09	0,99	0,22	0,20	0,60	0,47
М	0,19	0,64	0,75	0,26	0,46	1,04
Н	0,59	-0,16	0,69	0,81	-0,63	0,94

коричневую флуоресценцию, которая под воздействием паров аммиака превращается в желтую. С ионами трехвалентного железа пятна флавоноидов № 1 и 3 дают темно-зеленое окрашивание, а в результате реакции диазотирования с сульфаниловой кислотой окрашиваются в бурый цвет. С остальными хромогенными реактивами получают типичные для флавоновых и флавоноловых производных окраски желтых оттенков. При этом окрашенный комплекс, полученный реактивом Бенедикта, проявляется в ультрафиолетовых лучах как у вещества № 1, так и № 3, темную флуоресценцию, в то время как соответствующие комплексы с алюминием флуоресцируют интенсивным ярко-желтым цветом. Оба производные при восстановлении с металлическим магнием и соляной кислотой дают розово-оранжевое окрашивание. Флавоноиды осаждаются из раствора прибавлением растворов как основного, так и нейтрального уксуснокислого свинца.

Длительная гидролитическая обработка 10%-ной серной кислотой не приводит к освобождению сахарных остатков. Однако под действием кислоты обнаруживается превращение флавоноида № 1 в флавоноид № 3 и наоборот. Так как вещество № 3 легче превращается в свой предполагаемый изомер, равновесие указанной изомеризации несколько смещено в сторону менее подвижного компонента — флавоноида № 1.

Ультрафиолетовые спектры поглощения обоих соединений по форме и расположению максимумов практически совпадают и отличаются друг от друга лишь незначительно (рис. 1 и 2). В этаноле у обоих флавоноидов длинноволновая (I) полоса поглощения имеет максимум при 351—352 мкм, в то время как коротковолновая (II) полоса поглощения характеризуется двумя весьма четко выраженными пиками соответственно при 256—258 и 269—270 мкм (табл. 3). Это указывает на наличие в молекуле обоих флавоноидов заместителей в 4'- и 3'-положениях. Прибавление плавленного уксуснокислого натрия вызывает во II полосе бато-

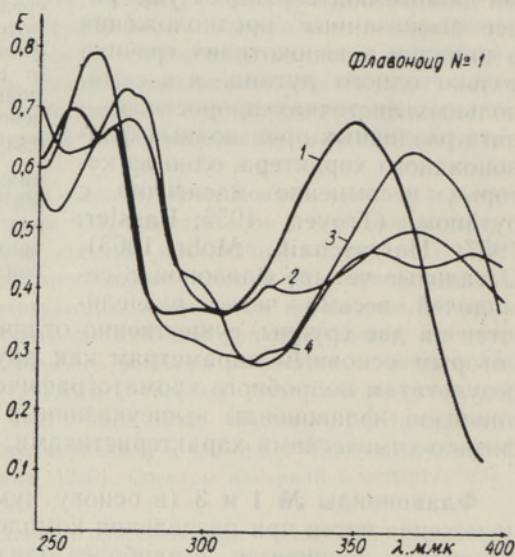


Рис. 1. Ультрафиолетовые спектры поглощения флавоноида № 1 (1 — 95%-ный этанол; 2 — то же + ацетат натрия; 3 — то же + ацетат натрия + борная кислота; 4 — то же + хлористый алюминий).

хромный сдвиг максимума на 15—18 мкм для более коротковолнового пика и на 9 мкм для более длинноволнового пика, а также более значительное батохромное смещение максимума на 19—20 мкм в I полосе поглощения, показывая, что гидроксильная группа в седьмом положении свободна. Батохромный сдвиг максимума на 19—20 мкм в длинноволновой полосе поглощения обнаруживается также после прибавления уксуснокислого натрия вместе с борной кислотой, что доказывает наличие в молекуле свободных ортогидроксильных группировок в положениях 3' и 4'. Этилат натрия вызывает сильное батохромное смещение (на 54—58 мкм) длинноволнового максимума поглощения без уменьшения его относительной интенсивности. Это служит косвенным доказательством флавоновой природы изучаемых производных: при уже доказанном наличии свободного 4'-гидроксила такого рода смещение с этилатом натрия может иметь место лишь в случае отсутствия гидроксильной группы в третьем положении или при защищенном 3-гидроксиле. Результаты гидролиза в данном случае практически исключают последнюю возможность.

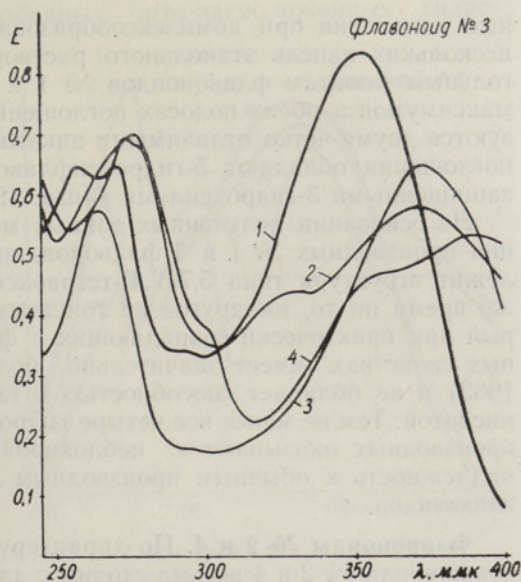


Рис. 2. Ультрафиолетовые спектры поглощения флавоноида № 3 (обозначения см. рис. 1).

Таблица 3

Максимумы поглощения флавоноидов № 1 и 3 и их комплексов с разными реактивами

Реактивы	λ_{\max} флавоноида № 1		λ_{\max} флавоноида № 3	
	I полоса	II полоса	I полоса	II полоса
95%-ный этанол	351	256, 269	352	258, 270
То же + плавленный ацетат натрия	370	274, 278	372	273, 279
То же + плавленный ацетат натрия + борная кислота	370	264	372	264
То же + хлористый алюминий	355, 388	274, ~ 297	360, 391	276, ~ 297
То же + этилат натрия	405	267	410	277
То же + хлористый цирконил	395		390	
То же + хлористый цирконил + лимонная кислота	355		350	

Проба с хлористым цирконилом приводит у обоих производных к изменениям спектров поглощения, характерным для флавоноидов со свободной 5-оксигруппой: образование цирконильного комплекса вызывает сильные батохромные смещения длинноволнового максимума на 44 мкм у флавоноида № 1 и 38 мкм у флавоноида № 3, которые в присутствии лимонной кислоты полностью устраняются. О наличии в молекуле обоих флавоноидов свободного 5-гидроксила свидетельствуют также спектраль-

ные изменения при комплексообразовании с алюминием. Прибавление нескольких капель этанольного раствора хлористого алюминия к алко-гольным элюатам флавоноидов № 1 и 3 вызывает значительные сдвиги максимумов в обеих полосах поглощения, где эти максимумы характеризуются двумя четко отличимыми пиками. Такими особенностями спектров поглощения обладают 5-гидроксифлавоны или 5-гидроксифлавонолы с защищенными 3-гидроксилами (Jurd, 1962).

На основании полученных данных можно сказать, что в основе строения производных № 1 и 3 флавоноидного комплекса проростков гречихи лежит структура типа 5,7,3',4'-тетраоксифлавона или лютеолина. В то же время ни то, ни другое не тождественно с самим лютеолином, который при практически совпадающих с флавоноидами № 1 и 3 спектральных свойствах имеет значительно более высокие значения R_f (Seikel, 1962) и не обладает способностью к такой изомеризации при обработке кислотой. Тем не менее все четыре гидроксильных группы молекулы обоих производных оказываются неблокированными, что исключает их принадлежность к обычным производным лютеолина типа ОН-замещенных гликозидов.

Флавоноиды № 2 и 4. По характеру хроматографического поведения флавоноиды № 2 и 4 весьма сходны с двумя предыдущими производными.

Таблица 4

Значения R_f , R_M и R_{Rut} флавоноидов № 2 и 4 при разных системах растворителей

Растворитель	Флавоноид № 2			Флавоноид № 4		
	R_f	R_M	R_{Rut}	R_f	R_M	R_{Rut}
А	0,30	0,37	0,53	0,50	0	0,88
Б	0,47	0,06	0,69	—	—	—
В	0,62	-0,22	0,83	—	—	—
Г	0,74	-0,45	0,92	0,83	-0,70	1,04
Д	0,24	0,51	0,47	0,43	0,12	0,85
Е	0,40	0,19	1,08	0,56	-0,10	1,54
Ж	0,56	-0,10	0,67	—	—	—
З	0,44	0,14	1,09	0,64	-0,24	1,67
И	0,60	-0,18	1,06	0,77	-0,54	1,37
К	0,60	-0,17	1,13	0,76	-0,50	1,45
Л	0,15	-0,76	0,35	0,32	0,33	0,75
М	0,30	0,38	1,04	0,42	0,14	1,70
Н	0,75	-0,48	0,87	0,91	-1,01	1,06

же подвижностью, как более подвижный в своей паре флавоноид № 3.

По флуоресценции, а также почти по всем цветным реакциям флавоноиды № 2 и 4 сравнительно мало отличаются от флавоноидов № 1 и 3. Тем не менее при прямом сравнении обеих групп легко обнаруживаются несколько различающиеся оттенки окраски образуемых продуктов. В частности, медный комплекс флавоноидов № 2 и 4, получаемый реактивом Бенедикта, имеет в ультрафиолетовых лучах светлую флуоресценцию при темной флуоресценции аналогичных комплексов с флавоноидами № 1 и 3; ионами трехвалентного железа получается коричневое, а не темно-зеленое окрашивание, как это характерно для производных лютеолиновой группы. Проба восстановления с магнием в соляной кислоте дает с флавоноидами № 2 и 4 оранжевое окрашивание. В отличие от производных № 1 и 3 флавоноиды этой группы осаждаются только раствором основного уксуснокислого свинца. Все это указывает на отсутствие в мо-

У них значения R_f также не зависят от степени полярности примененного растворителя и, как правило, производное № 4 хроматографически всегда значительно более подвижно, чем его аналог. Значения R_f флавоноидов № 2 и 4 во всех растворителях гораздо выше, чем значения R_f у соответствующих членов предыдущей пары лютеолиновых производных. При сопоставлении данных табл. 2 и 4 видно, что соответствующий интервал колеблется в среднем в пределах 0,1—0,2 единицы, причем флавоноид № 2 как менее подвижный компонент этой пары обладает приблизительно такой

лекуле флавоноидов № 2 и 4 свободных орто-расположенных гидроксильных групп.

При обработке кислотой флавоноиды № 2 и 4 ведут себя так же, как производные первой группы, т. е. обработка не приводит к освобождению сахаров, но обнаруживается изомеризация обоих флавоноидов друг в друга с некоторым преобладанием этого превращения в сторону менее подвижного флавоноида № 2.

Для ультрафиолетовых спектров поглощения флавоноидов № 2 и 4 характерно расположение максимумов в I полосе поглощения при 335—336 мк и во II — при 270—271 мк, что совпадает со спектральными данными для апигенина (Jurd, 1962). Прибавление уксуснокислого натрия вызывает батохромные смещения максимумов в длинноволновой полосе поглощения на 32 мк и в коротковолновой — на 8—9 мк, но то же в присутствии борной кислоты к существенным изменениям спектров не

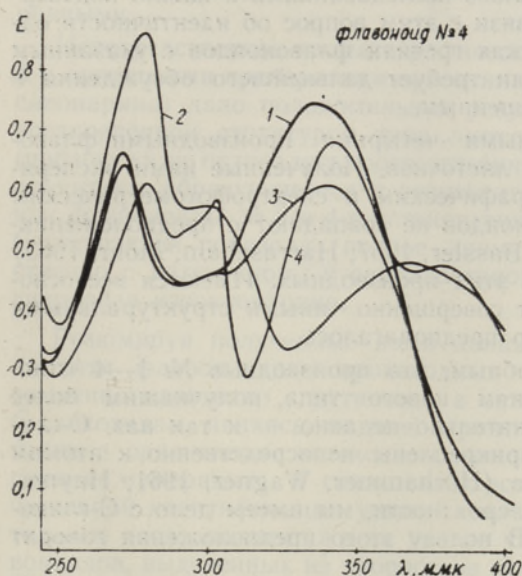


Рис. 4. Ультрафиолетовые спектры поглощения флавоноида № 4 (обозначения см. рис. 1).

(апигенина), которые, судя по их поведению при хроматографическом разделении на бумаге и изомеризации при обработке кислотой, должны обладать такими же структуральными особенностями, как флавоноиды № 1 и 3. Аналогично последним все имеющиеся гидроксильные группи-

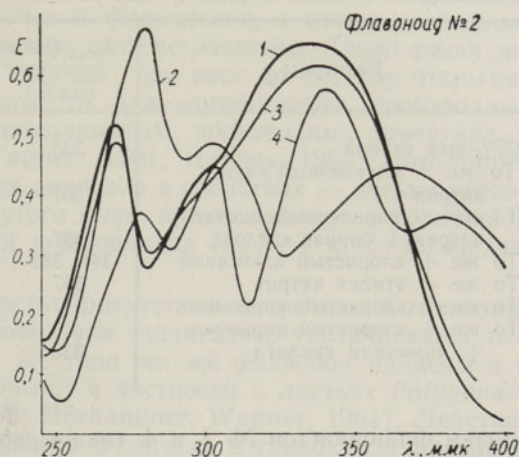


Рис. 3. Ультрафиолетовые спектры поглощения флавоноида № 2 (обозначения см. рис. 1).

приводит (рис. 3 и 4, табл. № 5). Это еще раз подтверждает, что в молекуле обоих флавоноидов отсутствуют свободные орто-гидроксильные группировки. Комплексообразование с алюминием вызывает у обоих флавоноидов значительные батохромные смещения максимумов как в длинноволновой, так и в коротковолновой областях поглощения, причем оба максимума приобретают типичную для 5-оксифлавонов форму с двумя пиками (рис. 3 и 4). Это достаточное доказательство наличия свободной 5-оксигруппы в молекуле флавоноидов № 2 и 4, хотя проба с хлористым цирконием оказалась отрицательной (табл. 5).

Полученные результаты показывают, что флавоноиды данной группы являются производными 5,7,4'-триоксифлавона

Максимумы поглощения флавоноидов № 2 и 4 и их комплексов с разными реактивами

Реактивы	λ_{max} флавоноида № 2		λ_{max} флавоноида № 4	
	I полоса	II полоса	I полоса	II полоса
95% - ный этанол	335	270	336	271
То же + плавленный ацетат натрия	367	279	368	279
То же + плавленный ацетат натрия + борная кислота	337	270	340	272
То же + хлористый алюминий	341, 382	279, 303	342, 380	280, 303
То же + этилат натрия	397	279	399	279
То же + хлористый цирконил	337		340	
То же + хлористый цирконил + лимонная кислота	335		336	

ровки флавоноидов № 2 и 4 также свободны от блокирующих заместителей, в их молекуле отсутствуют О-гликозидные связи, но тем не менее на основании хроматографического сравнения с аутентичным препаратом ни тот, ни другой не тождественные с апигенином.

Обсуждение и выводы

Наличие рутина в гипокотилях и семядольных листочках проростков гречихи уже неоднократно отмечалось исследованиями и нашло подтверждение в настоящей работе. В связи с этим вопрос об идентичности одного из встречающихся в проростках гречихи флавоноидов с указанным флавоноловым гликозидом вряд ли требует дальнейшего обсуждения и может считаться окончательно решенным.

Иначе обстоит дело с остальными четырьмя производными флавоноидного комплекса семядольных листочков. Полученные нами экспериментальные данные по хроматографическим и спектрофотометрическим свойствам вышеуказанных флавоноидов не совпадают с предположениями других авторов (Troyer, 1955; Bassler, 1957; Nagraschain, Mohr, 1963) о возможной химической природе этих производных. Имеются все основания думать, что они обладают совершенно иными структуральными особенностями, чем это до сих пор предполагалось.

Кажется наиболее правдоподобным, что производные № 1—4 относятся к флавоноидным соединениям нового типа, получившим более широкую известность лишь сравнительно недавно — к так наз. С-гликозидам, где сахарные остатки прикреплены непосредственно к атомам углерода флавоноидного скелета (Hörhammer, Wagner, 1961; Haynes, 1963). В данном случае, по всей вероятности, мы имеем дело с С-гликозидами апигенина и лютеолина. В пользу этого предположения говорит ряд обстоятельств.

Во-первых, флавоноиды № 1—4 даже при длительной обработке минеральными кислотами не гидролизуются. По данным литературы (Hörhammer, Wagner, 1961; Haynes, 1963), это — одно из наиболее характерных свойств С-гликозидных производных флавоноидов. Обусловлено оно чрезвычайной стабильностью С-гликозидных структур, намного превышающей прочность обычных гликозидных связей через гидроксильные группировки флавоноидной молекулы. Этим и можно объяснить отсутствие расщепления сахаров при гидролизе С-гликозидов.

Во-вторых, способность к взаимной изомеризации флавоноидов № 1 и 3 и флавоноидов № 2 и 4 под влиянием кислот. У свободных флавоноидных агликонов из числа флавонов и флавонолов, а также у обычных их О-гликозидов превращения такого типа не известны. Точно такая же изомеризация, однако, весьма типична для всех до сих пор открытых флавоновых С-гликозидов, в частности для апигениновых производных витексина и сапонаретина и лютеолиновых производных ориентина и гомо-ориентина (Hörhammer, Wagner, 1961; Haynes, 1963; Hörhammer и др., 1965). Такая поразительная аналогия в свойствах — весьма веское доказательство в пользу выдвинутого выше предположения о возможной принадлежности изученных нами флавоноидов № 1—4 к С-гликозидам апигенина и лютеолина.

Наконец, в-третьих, вероятность присутствия в гречихе С-гликозидных производных апигенина и лютеолина значительно увеличивается тем фактом, что производные того же типа тех же флавонов найдены и в других видах семейства гречишных, в частности в листьях *Polygonum orientale* (Hörhammer и др., 1958; Hörhammer, Wagner, 1961). Действительно, не исключено, что способность к синтезу С-гликозидов флавонов является одной из характерных химико-таксономических особенностей всего этого семейства.

Так как число известных в настоящее время флавоноидов с С-гликозильной структурой весьма ограничено, а наиболее распространены из них апигениновые производные витексин и сапонаретин и соответствующие им лютеолиновые аналоги ориентин и гомо-ориентин, возникает вопрос о возможной идентичности установленных нами флавоновых С-гликозидов проростков гречихи именно с указанными четырьмя производными.

Непосредственное хроматографическое сравнение флавоноидов № 1—4 с аутентичными препаратами ориентина и сапонаретин-4'-гликозида (изосапонарина) дало положительные результаты — флавоноиды № 1 и 3 с установленной структурой типа лютеолиновых С-гликозидов хроматографически не отличались соответственно от ориентина и его изомера гомо-ориентина, образующегося в результате обработки кислотой, в то время как флавоноиды № 2 и 4 с установленной структурой типа апигениновых С-гликозидов показали полное хроматографическое сходство соответственно с витексином и сапонаретином, образующимися в результате гидролиза изосапонарина.

Резюмируя полученные нами данные, можно прийти к выводу, что из пяти флавоноидных производных семядольных листочков одно несомненно идентично с рутином, а остальные относятся к флавоновым С-гликозидам, являясь, по всей вероятности, тождественными соответственно с ориентином, витексином, гомо-ориентином и сапонаретином (в порядке нумерации). В гипокотылях встречается только рутин. Для окончательной идентификации установленных С-гликозидов необходимы тщательные исследования уже на уровне чистых препаратов отдельных флавоноидов, выделенных из проростков гречихи в больших количествах, чем это возможно при помощи хроматографии на бумаге.

Следует отметить, что одновременное присутствие в тканях, с одной стороны, флавонолов и флавонов, а с другой стороны — их О- и С-гликозидов, заслуживает самого серьезного внимания и значительно повышает ценность проростков гречихи как объектов исследования не только для изучения биосинтеза флавоноидных соединений, но и для выяснения физиологической роли флавоноидов в растениях.

Авторы считают своим приятным долгом выразить глубокую благодарность сотруднику Харьковского н.-и. химико-фармацевтического института Василию Ивановичу Литвиненко за любезное предоставление аутентичных образцов ориентина и изосапонарина.

ЛИТЕРАТУРА

- Бейли Н., 1962. Статистические методы в биологии. М.
- Гейссман Т., 1960. Антоцианы, халконы, ауроны, флавоны и родственные им водорастворимые пигменты. В кн.: Биохимические методы анализа растений : 453—519. М.
- Литвиненко В. И., Максютин Н. П., 1965. Спектральное исследование флавоноидов. Обнаружение свободных фенольных оксигрупп в различных положениях. Химия природных соединений 1 (6) : 420—424.
- Маргна У., 1964. Качественный состав флавоноидного комплекса в листьях привоев сливы, привитой на различных подвоях. Изв. АН ЭССР, сер. биол. 13 (2) : 83—94.
- Маргна У., 1966. R_x — полезный критерий для идентификации неизвестных веществ при их хроматографическом разделении на бумаге. Изв. АН ЭССР, сер. биол. 15 (2) : 170—182.
- Прохазка Ж., 1962. Фенолы и ароматические кислоты. В кн.: Хроматография на бумаге : 301—333. М.
- Ahlgrimm E. D., 1955. Über den Gesamtflavonol- sowie den Rutingehalt verschiedenalter Blätter bei *Fagopyrum*arten. Naturwissenschaften 42 (16) : 465—466.
- Bassler R., 1957. Der Einfluss ökologischer und ontogenetischer Faktoren auf die Flavone von *Fagopyrum sagittatum* Gilib. Pharmazie 12 (11) : 758—772, (12) : 834—841.
- Bate-Smith E. C., Westall R. G., 1950. Chromatographic behaviour and chemical structure. I. Some naturally occurring phenolic substances. Biochim. biophys. acta 4 : 427—440.
- Gripenberg J., 1962. Flavones. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds : 406—440. Oxford—London—New York—Paris, Pergamon Press.
- Harborne J. B., 1959. The chromatography of the flavonoid pigments. J. Chromatogr. 2 (6) : 581—604.
- Harborne J. B., 1964. Ultraviolet spectroscopy of polyphenols. In: Methods in Polyphenol Chemistry : 13—36. Oxford—London—Edinburgh—New York—Paris—Frankfurt, Pergamon Press.
- Harraschain H., Mohr H., 1963. Der Einfluss sichtbarer Strahlung auf die Flavonoid-Synthese und Morphogenese der Buchweizenkeimlinge (*Fagopyrum esculentum* Moench.). II. Flavonolsynthese und Hypokotylwachstum. Z. Botanik 51 (3) : 277—299.
- Hattori S., 1962. Glycosides of flavones and flavonols. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds : 317—352. Oxford—London—New York—Paris, Pergamon Press.
- Haynes L. J., 1963. Naturally occurring C-glycosyl compounds. In: Advances in Carbohydrate Chemistry : 227—258. New York—London, Academic Press.
- Hänsel R., Hörhammer L., 1954. Phytochemisch-systematische Untersuchung über die Flavonglykoside einiger Polygonaceen. Arch. Pharm. 287/59 (4) : 189—198.
- Hörhammer L., Wagner H., 1961. New phenolic C-glycosides in plants. In: Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds : 185—193. Oxford—London—New York—Paris, Pergamon Press.
- Hörhammer L., Wagner H., Gloggengiesser F., 1958. Über einen neuen Glykosidtyp der Flavonreihe. 1. Mitteilung: Isolierung eines Luteolin- und Apigeninglykosids aus *Polygonum orientale* L., Arch. Pharm. 291/63 (3) : 126—137.
- Hörhammer L., Wagner H., Rosprim L., Mabry T., Rösler H., 1965. Über die Struktur neuer und bekannter Flavon-C-Glykoside I. Tetrahedron Letters (22) : 1707—1711.
- Jurd L., 1962. Spectral properties of flavonoid compounds. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds : 107—155. Oxford—London—New York—Paris, Pergamon Press.
- Jurd L., Horowitz R. M., 1957. Spectral studies on flavonols — the structure of azalein. J. Org. Chem. 22 : 1618—1622.

- Seikel M. K., 1962. Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds : 34—69. Oxford—London—New York—Paris, Pergamon Press.
- Seikel M. K., 1964. Isolation and identification of phenolic compounds in biological materials. In: Biochemistry of Phenolic Compounds : 33—76. London—New York, Academic Press.
- Troyer J. R., 1955. The distribution of rutin and other flavonoid substances in buckwheat seedlings. *Plant Physiol.* **30** (2) : 168—173.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
19/IX 1966

M. TOHVER, L. HALLOP, E. MARGNA, U. MARGNA

TATRAIDANDITE FLAVONOIDSE KOMPLEKSI KROMATOGRAAFILINE JA SPEKTROFOTOMEETRILINE ISELOOMUSTUS

Resüme

Üksikasjaliku paberchromatograafilise uurimisega 13 erinevas solvendisüsteemis tehti kindlaks, et tatraidandite hüpokotüülides esineb flavonoididest ainult rutiin, idulehtedes aga peale selle veel neli, ilmselt flavoonse põhiskeletiga derivaati.

Viimased jagunesid chromatograafilise käitumise, värvusreaktsioonide ja spektraalsete omaduste põhjal kahte selgesti eraldunud rühma, millest üks ühendite paar — derivaadid nr. 1 ja 3 — osutus 5,7,3',4'-tetrahüdroksüflavooni e. luteoliini derivaatideks ja teine paar — nr. 2 ja 4 — 5,7,4'-trihüdroksüflavooni e. apigeniini derivaatideks. Ükski tähendatud neljast ühendist ei allunud hüdrolyütilisele lagunemisele, kuid happe mõjul toimus derivaatides nr. 1 ja 3 ning nr. 2 ja 4 vastastikune isomerisatsioon teineteiseks. See näitas, et leitud apigeniin- ja luteoliinderivaatide keemiline ehitus erineb oluliselt tavaliste flavoonglükosiidide struktuurist, kus hüdrolyüs toimub kergesti ja sellist isomerisatsiooni ei esine. Samal ajal ei olnud ükski ühendeist nr. 1—4 identne ka luteoliini ega apigeniini enesega, ehkki spektrofotomeetriliste testide abil mitmesuguste komplekse moodustavate reaktiividega tehti kindlaks, et kõik hüdroksüülrühmad on nende derivaatide molekulides blokeerimata.

Saadud tulemuste põhjal tuldi järeldusele, et flavoonderivaatide nr. 1 ja 3 ning nr. 2 ja 4 puhul on tegemist vastavalt luteoliini ja apigeniini C-glükosiididega, kus suhkru radikaalid on kinnitunud vahetult flavonoidskeleti süsinikaatomite külge. Otsene chromatograafiline võrdlus autentsete C-glükosiidide preparaatidega näitas, et luteoliini derivaadid nr. 1 ja 3 on tõenäoliselt identsed vastavalt orientiini ja selle analoogi homo-orientiiniga, ning apigeniini derivaadid nr. 2 ja 4 — vastavalt viteksiini ja tema analoogi saponaretiiniga.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Ekspimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse
19. IX 1966

M. TOHVER, L. HALLOP, E. MARGNA, U. MARGNA

CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROPHOTOMETRIC CHARACTERIZATION OF FLAVONOIDS IN BUCKWHEAT SEEDLINGS

Summary

A detailed chromatographic and spectrophotometric study was carried out to elucidate the number and chemical nature of flavonoid derivatives occurring in hypocotyls and cotyledons of buckwheat seedlings.

Chromatographically it was shown that rutin is the only flavonoid compound present in hypocotyls whereas in cotyledons rutin and four other flavonoids occur. By their chromatographic behaviour, colour reactions and spectral properties the latter four derivatives can distinctly be divided into two separate pairs of compounds. The representatives of one of them, viz. the compounds Nos 1 and 3, proved to be the derivatives of 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone or luteolin, whereas for another pair of compounds, the basic structure

of 5, 7, 4'-trihydroxyflavone or apigenin was shown to be true. No one of these four compounds was hydrolyzable by acid treatment; however, a mutual isomerization between the compounds Nos 1 and 3 and Nos 2 and 4 correspondingly was observed. It may serve as an evidence for supposing that the apigenin and luteolin derivatives under consideration are substantially different from common flavone glycosides which are easily hydrolyzable and do not show such an isomerization in acid treatment. At the same time, no one of the compounds Nos 1—4 proved to be identical with the luteolin and apigenin themselves, although spectrophotometrically it was established that all the OH-groups present in their molecules are free from blocking radicals.

As a consequence of the results obtained, it was concluded that the flavone derivatives Nos 1 and 3 and Nos 2 and 4 are luteolin and apigenin C-glycosides correspondingly, in which the sugar moiety is attached directly to the C-atoms of flavone nucleus. A direct chromatographic comparison with authentic preparations of flavone C-glycosides showed that the luteolin derivatives Nos 1 and 3 are presumably identical with orientin and its analogue — homo-orientin, whereas the apigenin derivatives Nos 2 and 4 are identical with vitexin and saponaretin correspondingly.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Sept. 19, 1966