

UDK: 547.54.05-54.058

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ И ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОЗИДОВ ИЗ ЭКСТРАКТА КОРНЯ "Rubia tinctorum L"

Мусакаева Сабина Ришатовна

стажер преподаватель

Гулистанский государственный университет,

Республика Узбекистан, г. Гулистан

E-mail: musakaevasabina1@gmail.com

Тел.: +998974942924

Махамадиева Кундизой Хонимкул кизи

стажер преподаватель

Гулистанский государственный университет,

Республика Узбекистан, г. Гулистан

Тел.: +998994604311

Аннотация В данной статье представлены результаты исследований экстракта корня растения «Rubia tinctorum L». Экстракт растения "Rubia tinctorum L" состоит из комплекса экстрактивных веществ, в котором содержится около 8% антраценовых продуктов. Экстракт представляет собой окрашенный порошок с кислым вкусом и гигроскопичным внешним видом. В ходе исследований для экстракта были подобраны органические растворители, методом ВЖХА и ИК спектроскопии изучен состав образца раствора, приготовленного растворением в растворителе, приготовленном отдельно для хроматографии от спиртового экстракта. Приведены экспериментальные данные по сравнению хроматограммы раствора пробы, взятой для анализа, с хроматограммой стандартного раствора гликозида.

Annotatsiya Ushbu maqolada "Rubia tinctorum L" o'simligi ildizining ekstraktini tadqiq qilishga doir tadqiqot natijalari keltirilmoqda. "Rubia tinctorum L" o'simligining ekstrakti ekstraktiv moddalar yig'indisidan iborat bo'lib, uning tarkibida 8 % ga yaqin antratsen unumlarini saqlaydi. Ekstrakt - rangli kukun, nordon ta'mli va gigroskopik ko'rinishga ega. Tadqiqot davomida ekstrakt uchun organik erituvchilar tanlandi, erituvchida eritib tayyorlangan, spirtli quyuq ekstraktidan xromatografiya uchun aloxida tayyorlangan eritma namunasining tarkibini YuSSX usulida tadqiq qilindi. Analiz uchun olingan namuna eritmasining xromatogrammani antratsenning standart eritmasi xromatogrammasiga taqqoslab o'rganishga doir tajriba ma'lumotlari keltirildi

Abstract: This article presents the results of research on the extract of the root of the plant "Rubia tinctorum L". "Rubia tinctorum L" plant extract consists of a collection of extractive substances, which contains about 8% of anthracene products. The extract is a colored powder, with a sour taste and hygroscopic appearance. During the research, organic solvents were selected for the extract, the composition of the solution sample prepared by dissolving in the solvent, prepared separately for chromatography from the alcohol extract was studied by the YuSSX method. Experimental data on the

comparison of the chromatogram of the sample solution taken for analysis with the chromatogram of the standard solution of anthracene were presented.

Ключевые слова: гликозиды, экстракт, хроматография, ИК спектроскопия конденсированное кольцо, спирт, биологически активное вещество.

Наш Солнечный край богат растительным миром, а добываемые из него биологически активные вещества широко используются в народной медицине, пищевой промышленности, фармацевтике и различных отраслях народного хозяйства. Известно, что химическая промышленность является «катализатором» современной промышленности, химические процессы являются основой любого производства, без этой отрасли не будет прогресса в экономике.

Состав растительных веществ, содержащих антрацен и его продукты, создание эффективных методов их экстракции, выделение ализариновых природных красителей и разработка новых эффективных методов их экстракции является важной и актуальной задачей биоорганической химии.

Учитывая это, в данной научно-исследовательской работе, направленной на изучение химического состава растительных веществ и изучение их свойств, был направлен хроматографический и ИК-спектроскопический анализ состава корневого экстракта растения «*Rubia tinctorum* L».

Сухой экстракт растения *Rubia tinctorum* L состоит из набора экстрактивных веществ. Содержит около 8% антраценовых продуктов. Экстракт представляет собой окрашенный порошок с кислым вкусом и гигроскопичным внешним видом. Сухой экстракт, приготовленный из подземных частей растения, применяют при подагре, против накопления солей в почках и как средство, расщепляющее камни, состоящие из фосфатных и оксалатных солей.

Препарат выпускают в виде таблеток.

Экстракт из подземной части растения *Rubia tinctorum* L использовали для эксперимента. В литературе сообщается, что в корне содержится 5-6% оксиметилантрахинонов и их производных [3].

Кроме того, корень содержит лимонную, яблочную и винную кислоты, сахара, оксил, пектин, фенольные вещества.

После экстракции направляли в ректификационную колонну с использованием вакуума и проводили ректификацию в спирте. Отходы, оставшиеся в колонне, удаляются в остаток.

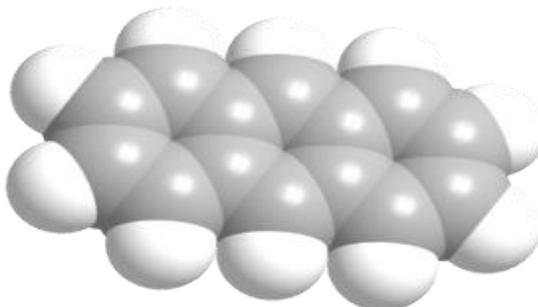
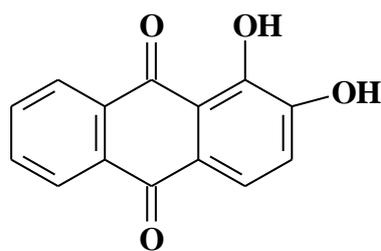
Массу спиртового экстракта оставляли в кристаллизаторе при температуре 50°C на 24 ч, через 24 ч фильтровали на ореховом фильтре, затем промывали этанолом и получали хроматограмму по ЮССХ.

Гликозидл представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, которое сжижается при 218°C и кипит при 340°C. Нерастворим в воде, растворим в ацетонитриле и ацетоне, растворим в бензоле при нагревании, в спирте 0,0908 г/100 мл, в гексане 0,164 г/100 мл.

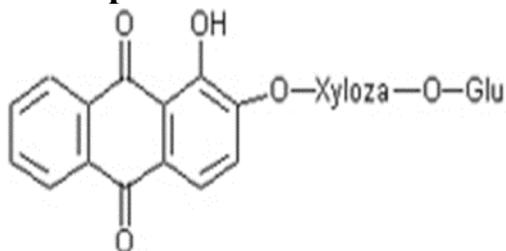
Молекулярная масса 178,23 г/моль, плотность 1,25 г/см³.

По своему химическому строению антрацен состоит из трех взаимно конденсированных бензольных колец, в которых 1,4,5,8-состояния являются α-

состоянием, 2, 3, 6, 7-состояния являются β -состоянием и 9, 10- состояния λ - состояние или мезо состояние.



Ализарин



Руберитриновая кислота

Гликозидовые продукты обладают свойством улетучиваться (возгонки) при нагревании. Поэтому исследования, связанные с поиском, требуют учета этой особенности.

Гликозиды и восстановленные формы продуктов антрацена — оптически активные вещества, сдвигающие плоскость поляризованного света вправо или влево.

Под действием щелочного раствора антраценовые гликозиды распадаются с образованием антрахинолятов, антрахинолаты имеют темно-красную окраску. Если к раствору этих антраксинлатов в воде добавить кислоту, исчезает красная окраска и образуется нерастворимый в воде желтый осадок.

В антрацене и его гомологах по мере удлинения кольца плотность двух р-электронов уменьшается по всему кольцу, и кольца приобретают меньший заряд, чтобы передать свой заряд секстету, что увеличивает нестабильность.

Экспериментальная часть

Объект исследования и химические реактивы. В работе использовались следующие вещества и их растворы: вода дистиллированная (бидистиллят), органические растворители (спирт изопропиловый, гексан, спирт этиловый), очищенные новым методом возгонки. В ходе исследований применяли дистилляцию, экстракцию, фильтрацию, а также методы высушивания и рН-метрии, хроматографии и спектроскопии [74-76].

Для проведения исследований использовали растворы следующих веществ: свежий экстрагированный (очищенный) этиловый спирт, хлороформ, бензол, ацетон, химически чистые органические растворители (к.т. и а.у.т.).

Брали высушенные корни растения «*Rubia tinctorum* L». Среда растворов контролировали рН-метром «рН/mV/TEMP Meter R-25».

Для тонкослойной хроматографии использовали пластины Silufol (Чехия), для очистки использовали роторный испаритель ИР-1М2. Для измерения

температуры разжижения полученного продукта использовали прибор ПТП ТУ 25-11-1144. Структуру и состав изучали методом ВЭЖХ.

Экстракцию проводили в аппарате Сокслета по методу Стаса-Отто, основанному на экстракции этанолом.

Выделенный экстракт обрабатывали 0,5 М раствором $Pb(CH_3COO)_2$, фильтровали, затем в фильтрат абсорбировали газообразный H_2S (осадки PbS), фильтровали при пониженном давлении, после чего спирт конденсировали. Этим методом была выделена рубэритриновая кислота (ализарин)гликозид. Процесс выделения гликозида контролировали с помощью тонкослойной хроматографии, а выделение рубэритриновая кислота (ализарин) гликозида подтверждали качественными реакциями.

Для анализа проб были приготовлены и откалиброваны растворы стандартного раствора гликозида с различной концентрацией: 0,05 мг/мл, 0,125 мг/мл и 0,25 мг/мл.

Используемые методы и приборы: весы аналитические ВЛР-200, мешалка магнитная ММ-5 ТУ 25-11834-80, центрифуга, режекторные фильтры разных размеров, прибор ПТП ТУ 25-11-1144 для измерения температуры псевдооживления веществ, ИР-1М2 роторный испаритель, хроматограф:

Использовали Prominence-i LC-2030C 3D Plus (Shimadzu) и аналитическую колонку (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм колонка для ВЭЖХ Brownlee™, Perkin Elmer). 20 мкл раствора пробы добавляли в колонку в градиентном потоке 1,0 мл/мин смеси подвижной фазы - изопропилового спирта и воды (80:20). Температуру в колонке доводили до 400°C и устанавливали оптимальную температуру.

Общий временной интервал 30 минут, был выполнен для каждой экстракции образца из подвижной фазы в условиях многоступенчатого градиента.

Экстракт из подземной части растения *Rubia tinctorum* L использовали для эксперимента. В литературе сообщается, что в корне содержится 5-6% оксиметилантрахинонов и их производных [3].

Гликозид представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, которое сжижается при 218°C и кипит при 340°C. Нерастворим в воде, растворим в ацетонитриле и ацетоне, растворим в бензоле при нагревании, в спирте 0,0908 г/100 мл, в гексане 0,164 г/100 мл.

Молекулярная масса 178,23 г/моль, плотность 1,25 г/см³.

По своему химическому строению антрацен состоит из трех взаимно конденсированных бензольных колец, в которых 1,4,5,8-состояния являются α -состоянием, 2, 3, 6, 7-состояния являются β -состоянием и 9, 10- состояния λ - состояние или мезо состояние.

Гликозидовые продукты обладают свойством улетучиваться (возгонки) при нагревании. Поэтому исследования, связанные с поиском, требуют учета этой особенности.

Гликозиды и восстановленные формы продуктов антрацена — оптически активные вещества, сдвигающие плоскость поляризованного света вправо или влево.

Под действием щелочного раствора антраценовые гликозиды распадаются

с образованием антрахинолятов, антрахинолаты имеют темно-красную окраску. Если к раствору этих антраксинлатов в воде добавить кислоту, исчезает красная окраска и образуется нерастворимый в воде желтый осадок.

В антрацене и его гомологах по мере удлинения кольца плотность двух р-электронов уменьшается по всему кольцу, и кольца приобретают меньший заряд, чтобы передать свой заряд секстету, что увеличивает нестабильность системы. Потому что, два электрона распределены по трем кольцам.

Анализ и результаты. В ходе исследований применяли дистилляцию, экстракцию, фильтрацию, а также методы высушивания и рН-метрии, хроматографии и спектроскопии [74-76].

Для проведения исследований использовали растворы следующих веществ: свежий экстрагированный (очищенный) этиловый спирт, хлороформ, бензол, ацетон, химически чистые органические растворители (к.т. и а.у.т.).

Брали высушенные корни растения «*Rubia tinctorum L.*». Среда растворов контролировали рН-метром «рН/mV/TEMP Meter R-25».

Для тонкослойной хроматографии использовали пластины Silufol (Чехия), для очистки использовали роторный испаритель ИР-1М2. Для измерения температуры разжижения полученного продукта использовали прибор ПТП ТУ 25-11-1144. Структуру и состав изучали методом ВЭЖХ.

Экстракцию проводили в аппарате Сокслета по методу Стаса-Отто, основанному на экстракции этанолом.

Выделенный экстракт обрабатывали 0,5 М раствором $Pb(CH_3COO)_2$, фильтровали, затем в фильтрат абсорбировали газообразный H_2S (осадки PbS), фильтровали при пониженном давлении, после чего спирт конденсировали. Этим методом был выделен рубэритриновая кислота (ализарин)гликозид. Процесс выделения гликозида контролировали с помощью тонкослойной хроматографии, а выделение рубэритриновая кислота (ализарин) гликозида подтверждали качественными реакциями.

Сначала были подобраны оптимальные условия для хроматографического определения антрацена в экстракте. Для этого была определена оптимальная чувствительность диодно-матричного абсорбционного детектора ФДА. Для того, чтобы иметь максимальную селективность, был выбран оптимальный диапазон длин волн, и это значение составляет 254 нм.

Также в качестве второго детектора использовался флуоресцентный детектор RF-20A XS, позволяющий добиться наилучшей чувствительности с помощью программы, подходящей для длин волн возбуждения и излучения. Это позволяет обнаруживать все ПАУ, включая антрацен.

Для анализа проб были приготовлены и откалиброваны стандартные (антрацен -100 мг, >96% ВЭЖХ, Sigma Aldrich) растворы антрацена с различными концентрациями: 0,05 мг/мл, 0,125 мг/мл и 0,25 мг/мл.

Для сравнения анализируемых результатов была проведена хроматограмма стандартного раствора антрацена.

Видно, что на хроматограмме экстракта наблюдаются некоторые величины, характерные для спектров антрахинона. Например, при 16869 он, как и антрахинон, показывает один пик, т. е. кольца антраценового ядра идентичны.

По результатам анализа темный экстракт сохраняет 59-60% влаги и 30-31% антрацена.

Вид под электронным микроскопом. Был рассмотрен полученный в ходе кристаллический экстракт *Rubia Tinctorum* L (1- рисунок).

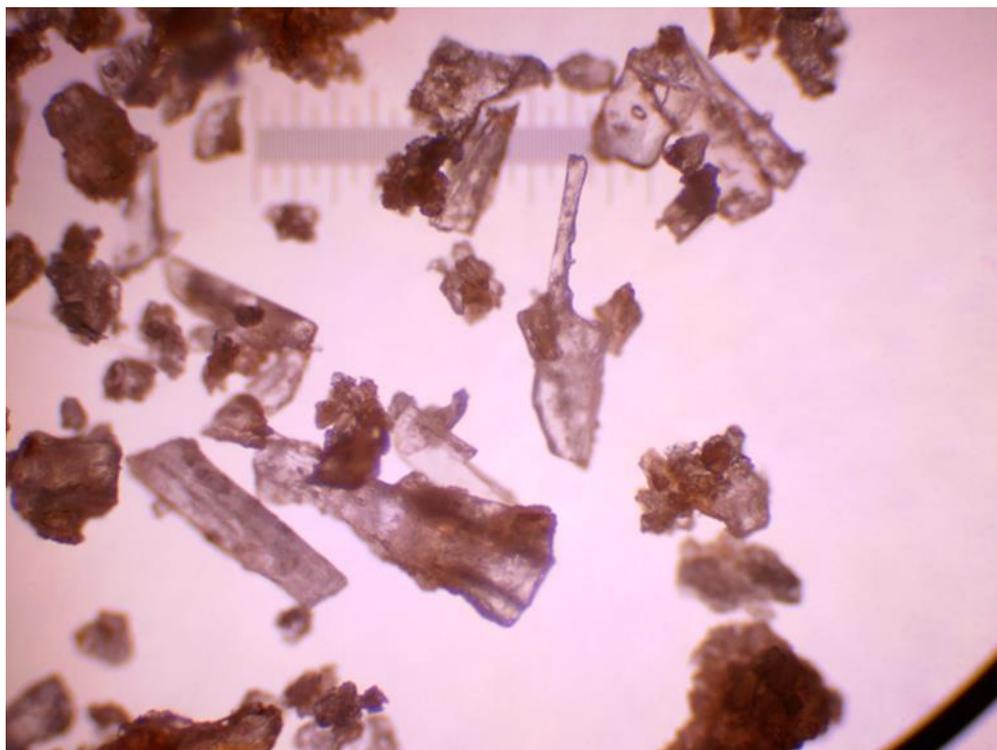


Рисунок 1. Вид под микроскопом кристаллического экстракта *Rubia Tinctorum* L.

Видно, что ИК-спектры экстракта показали некоторые величины, характерные для ИК –спектров Рубиатриновой кислоты (гликозида). Например, при 662,58 см он как и ализарин показывает один пик т.е кольцо ализаринового ядра идентичны. Из ИК-спектра, выделенного из экстракта растения *Rubia tinctoria* L, можно сделать вывод, что ОН- и NH-группы Руберитриновой кислоты (ализориновый) гликозид дают поглощение в области 3307,57 см⁻¹ (2, 3-рисунок).

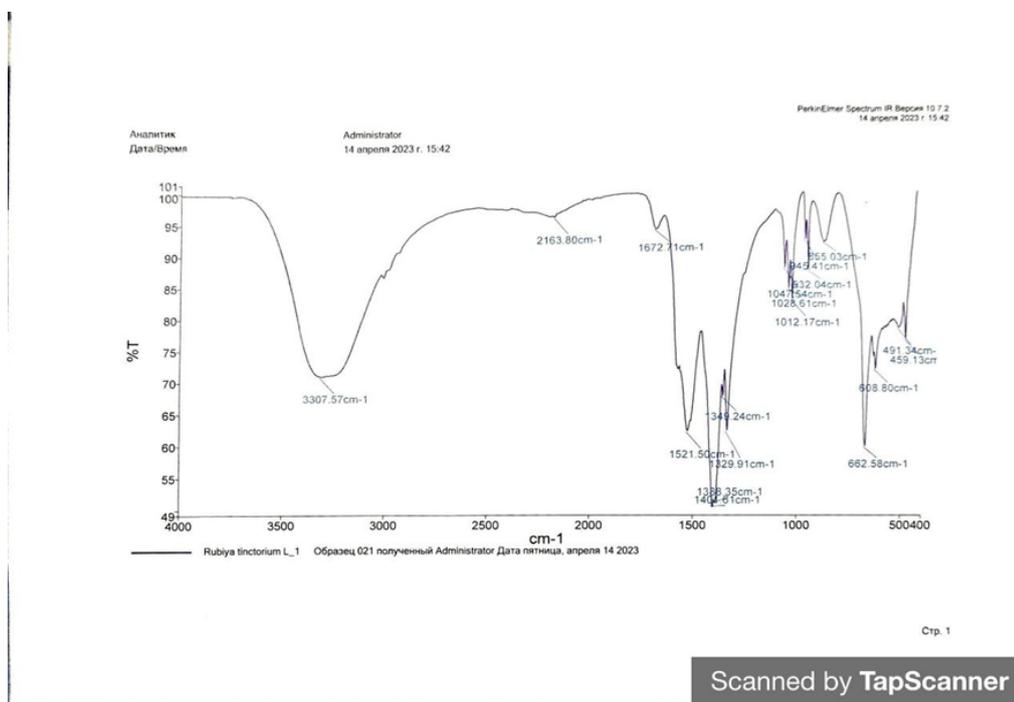


Рисунок 2. Спектр ИК Руберитриновой кислоты (ализаринового) гликозида, выделенных из экстракта растения "Rubia tinctoria L

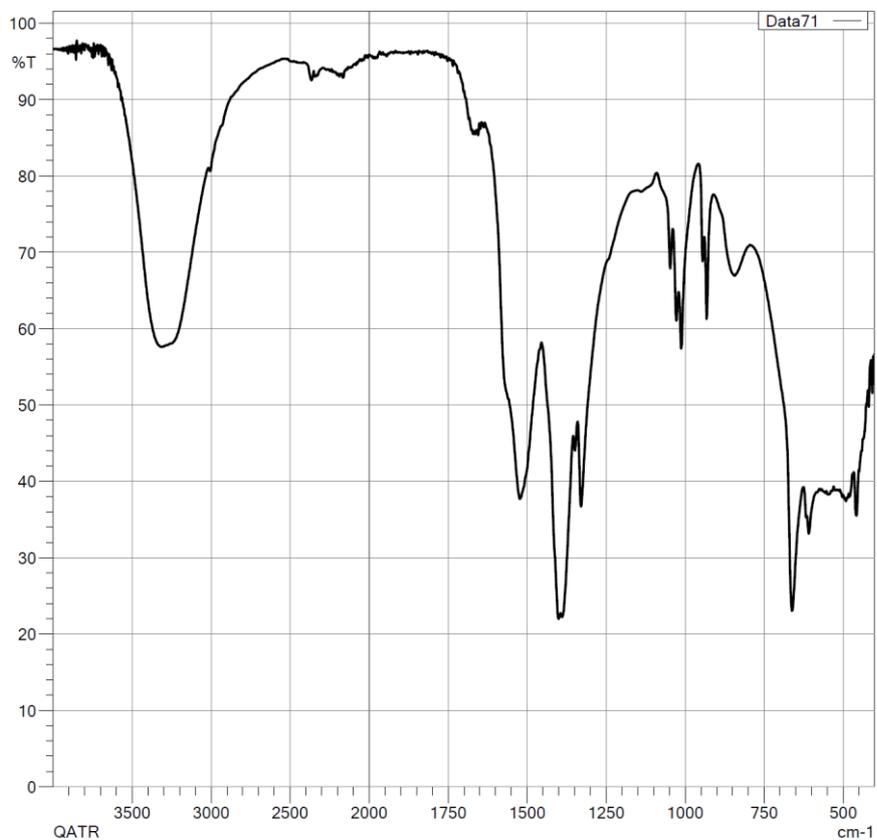


Рисунок 3. ИК спектр стандартного Руберитриновой кислоты (ализариновый) гликозида.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Методом ВЭЖХ были исследованы:

- ✓ Водно-спиртовые извлечения из корней марены красильной.
- ✓ Отвары корней марены красильной.

Исследуемые препараты разводили в 20 % буфере Б (80 % ацетонитрил в 0,1 % водном растворе трифторуксусной кислоты) в соотношении 1:50 (20 мкл препарата в 1 мл 20 % буфера Б). После чего вносили в объеме 20 мкл на колонку ReproSil-Pur C18 300 ODS-3, 4.0 × 250 mm (“Dr. A. Marsch Ammerbuch-Entringen”, Germany) интегрированную в ВЭЖХ-систему “Knauer SmartLine” (Germany) [77].

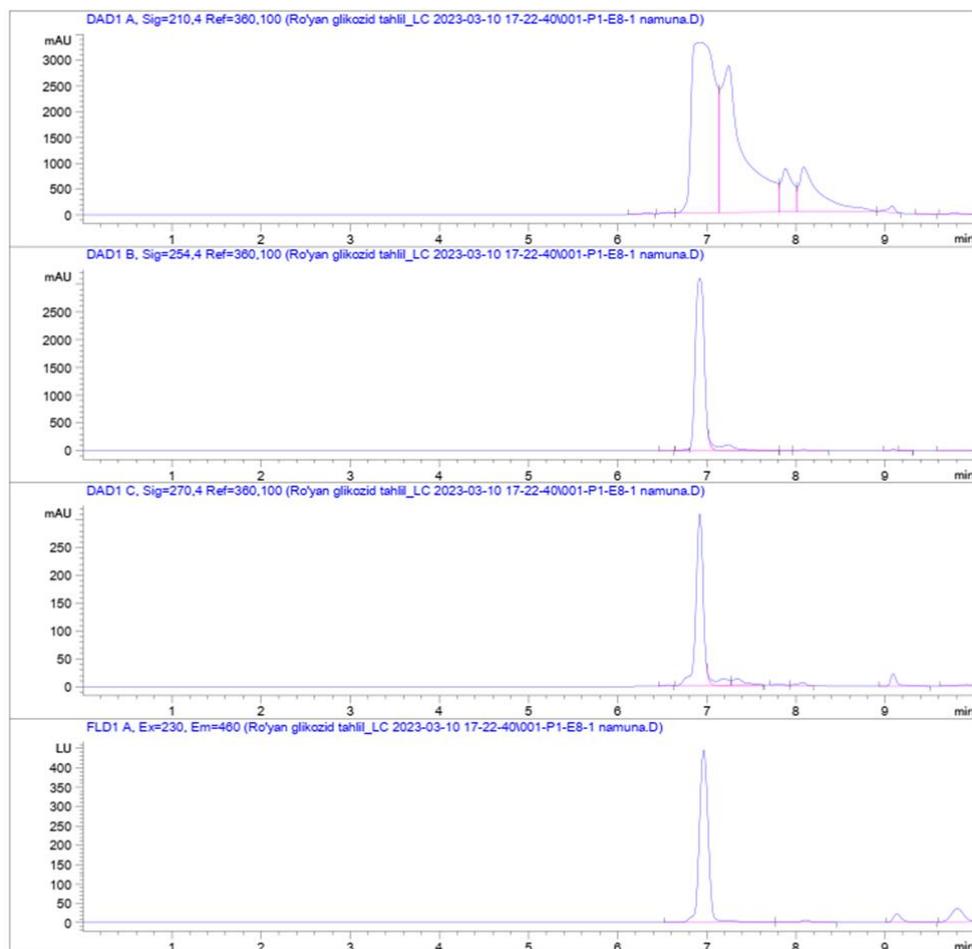


Рисунок 4. Спектр ВЭЖХ Руберитриновой кислоты гликозида , выделенных из экстракта растения «Rubia tinctoria L»

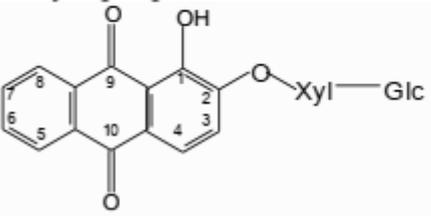
Видно, что на хроматограмме экстракта наблюдаются некоторые величины, характерные для спектров антрахинона. Например, при 16869 он, как и антрахинон, показывает один пик, т. е. кольца антраценового ядра идентичны.

По результатам анализа темный экстракт сохраняет 59-60% влаги и 30-31% антрацена (4 - рисунок).

Повторяемость анализа по спектру ВЭЖХ очищенного Руберитриновой кислоты гликозида
Руберитриновой кислоты гликозида

| № | Повторяемость анализа | g/ml | mAU | min | signal |
|---|-----------------------|-------|------|-----|--------|
| 1 | Форма-1 | 0,01 | 3000 | 7 | 210,4 |
| 2 | Форма-2 | 0,001 | 300 | 7 | 254,4 |
| 3 | Форма-3 | 0,001 | 450 | 7 | 230,0 |

Физико-химические константы выделенных соединений

| № | Название, химическая формула | Состав | M ⁺ | Т.пл. °С | λ _{max} (EtOH), нм |
|-----|---|---|---------------------------|----------|-----------------------------|
| 13. | Руберитриновая кислота  | C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃ | 557 [M + Na] ⁺ | 255-257 | 260, 331, 416 |

Анализ и результаты. В ходе исследований применяли дистилляцию, экстракцию, фильтрацию, а также методы высушивания и рН-метрии, хроматографии и спектроскопии [74-76].

Для проведения исследований использовали растворы следующих веществ: свежий экстрагированный (очищенный) этиловый спирт, хлороформ, бензол, ацетон, химически чистые органические растворители (к.т. и а.у.т.).

Брали высушенные корни растения «*Rubia tinctorum* L». Среду растворов контролировали рН-метром «рН/mV/TEMP Meter R-25».

Для тонкослойной хроматографии использовали пластины Silufol (Чехия), для очистки использовали роторный испаритель ИР-1М2. Для измерения температуры разжижения полученного продукта использовали прибор ПТП ТУ 25-11-1144. Структуру и состав изучали методом ВЭЖХ.

Экстракцию проводили в аппарате Сокслета по методу Стаса-Отто, основанному на экстракции этанолом.

Выделенный экстракт обрабатывали 0,5 М раствором Pb(CH₃COO)₂, фильтровали, затем в фильтрат абсорбировали газообразный H₂S (осадки PbS), фильтровали при пониженном давлении, после чего спирт конденсировали. Этим методом был выделен руберитриновая кислота (ализарин)гликозид. Процесс выделения гликозида контролировали с помощью тонкослойной хроматографии, а выделение руберитриновая кислота (ализарин) гликозида подтверждали качественными реакциями.

Из спектра ВЭЖХ известно, что раствор был приготовлен в трех различных вариантах, и хроматограмма ВЭЖХ каждой формы была получена отдельно. На рисунке мы можем наблюдать, что ализариновый гликозид обеспечивает абсорбцию между 6 мин 30 с и 6 мин 50 с в поле 2500 мАЕ. Такое же поглощение

наблюдалось в формах 2 и 3. Эти результаты показывают, что это ализариновый гликозид

ИК-спектры экстракта показали некоторые величины, характерные для ИК-спектров Рубиатриновой кислоты (гликозида). Например, при 662,58 см он как и ализарин показывает один пик т.е. кольцо ализаринового ядра идентичны. Из ИК-спектра, выделенного из экстракта растения *Rubia tinctoria* L, можно сделать вывод, что ОН- и NH-группы Руберитриновой кислоты (ализариновый) гликозид дают поглощение в области 3307,57 см⁻¹

Вывод

1. Во время изучения химического состава корня растения *Rubia tinctorum* L, установлено что вещества проявляющие красильные свойства, находятся в его корневой части.

2. Выделенные из корневой части гликозиды, были с помощью метода Стаса Ото.

3. Были определены и разделены гликозиды на фракции: рубиадин, руберитровая кислота и ализарин.

4. Выделенные гликозиды были определены и проанализированы с помощью спектральным и хроматографическим методами.

5. Изучена природа и физико-химические свойства выделенных антрацен-гликозидов.

Используемая литература:

1. Химия антрахинона Изд. "Химия" М. 1969. 194 С.
2. Н.О.Умирова, У.К.Абдурахманова Антрахиноннинг кимёвий хусусияларини ўрганиш. "Табиий бирикмалардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш истиқболлари" Республика илмий-амалий анжумани. Гулистон. 2018. 85-87 б.
3. Н.Н.Ворожцов Основы синтеза промежуточных продуктов и красителей, «Госхимиздат», 1955.
4. Жизнь растений. В 6т. Т.5, Ч. 2. Цветовые растения.-М. «Просвещение», 1981.- С.358.
5. Интродукция лекарственных растений в Узбекистане, д.т.н. дисс., Т., 2009, 82-86 страницы.
6. Ашурметов О. Тохтаев А., Доривор Б. Э. История, проблемы и перспективы интродукции растений // Интродукция растений: проблемы и истиқболлари: материалы республиканской научной конференции. - Хива: МИА, 2003.-5. 12-15.
7. Холматов Х.Х., У.А.Ахмедов - Фармакогнозия, Тошкент, 1995
8. S.R.Musakaeva, S.K.Rahmonov, U.K.Abduraxmanova Antratsenning tuzilishiga doir ba'zi ma'lumotlar / Fan va ishlab chiqarish integratsiyalashuvi sharoitida kimyo texnologiya, kimyo va oziq-ovqat sanoatidagi muammolar va ularni bartaraf etish yo'li / NamMTI 2022. 73-74 б.
12. Janoszka B, Warzecha L, Błaszczuk U, Bodzek D. Organic compounds formed in thermally treated high-protein food. Part I: polycyclic aromatic

hydrocarbons. *Acta Chromatogr.* -2004, V.14, -P.115—128.

13. Kumari R, Patel DK, Chaturvedi P, Ansari NG, Murthy RC. Solid phase micro extraction combined with gas chromatography—mass spectrometry for the trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate. *Anal Methods.* -2013. V.5(8), -P.1946—1954.

14. Kraus J.J., Munir I.Z., McEldoon J.P., Clark D.S., Dordick J.S. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons catalyzed by soybean peroxidase // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999. V. 80. P. 221–230.

15. Criquet S., Joner E., Leglize P., Leyval C. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.) // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22 (21). P. 1733–1737. DOI:[10.1023/A:1005604719909](https://doi.org/10.1023/A:1005604719909)

16. Дубровская Е.В., Позднякова Н.Н., Гринёв В.С., Муратова А.ЙУ., Голубев С.Н., Бондаренкова А.Д., Турковская О.В. Доминирующая форма катионной пероксидазы из корней “*Sorgo venichnogo*” // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. С. 359–371.

17. Садвакасова Г.Г., Кунаева П.М. Некоторые физико-химические и физиологические свойства пероксидазы растений // *Физиология и биохимия культурных растений.* 1987. Т. 19 (2). С. 107–119.

18. Венкатараман, К. Химия синтетических красителей. / К. Венкатараман. Т. 2. Пер. с англ. / Под ред. Н.С. Вульфсона. Л.: Химия, 1957. 860 с.

19. Горелик, М.В. Химия антрахинонов и их производных / М.В. Горелик. М.: Химия, 1983.-296 с.

20. The direct alkylamination of α -substituted anthraquinones promoted by metal ions / M. Matsuoka T. Takei, I. Nakamura et al. // *Bull. Chem. Soc. Japan.* 1981.-Vol. 54, №7.-P. 2225-2226.

21. Строение борных комплексов α -амино и α -окси-9,10-антрахинонов и их взаимодействие с аминами / М.В. Горелик, Н.Н. Шапетько, Л.В. Аринич и др. // *Журн. орг. химии.* 1986. - Т.22, вып.3. - С. 611-621.