

**АКАДЕМИЯ НАУК БССР**  
**ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ**  
**ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ**  
**им. В. Ф. КУПРЕВИЧА**

---

На правах рукописи

**ЛЕМЕШЕВ Николай Никитович**

УДК 581.19:633.367

**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И СОДЕРЖАНИЯ**  
**ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**  
**НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛЮПИНА**

03.00.04 — биологическая химия

**А в т о р е ф е р а т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Минск — 1985

Работа выполнена на кафедре химии Витебского государственного педагогического института им. С. М. Кирова.

Научный руководитель: доктор биологических наук  
**А. П. Волынец.**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки БССР **А. В. Мироненко.**

Кандидат биологических наук **Д. К. Шапиро.**

Ведущее учреждение: Институт экспериментальной биологии АН Эстонской ССР.

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 198\_\_ г.

в «\_\_\_» час. на заседании специализированного совета Д 006.04.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при ордена Трудового Красного Знамени Институте экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича АН БССР (220733, Минск, ул. Академическая, 27).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа АН БССР.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 198\_\_ г.

Ученый секретарь  
специализированного совета **Н. А. ЛАМАН.**

Институт экспериментальной  
ботаники АН БССР, 1985.

Актуальность проблемы. В "Основных направлениях экономического и социального развития СССР на 1981-1985 годы и на период до 1990 года" и решениях июльского (1978 г.), майского (1982 г.) Пленумов ЦК КПСС поставлены большие задачи перед учёными и работниками сельского хозяйства в области растениеводства и животноводства. Необходимо всемерно увеличивать продуктивность культурных растений и повышать качество сельскохозяйственной продукции. Что же касается животноводства, то важными задачами в этом направлении является создание прочной кормовой базы, сокращение потерь полезных веществ при уборке и хранении и повышение качества кормов. Особенно большое снижение питательной ценности кормов имеет место при приготовлении силоса.

Важными кормовыми и сидеральными растениями, возделываемыми главным образом ради получения кормового белка или повышения плодородия почвы, являются культурные виды люпина /Кузнецова, 1946; Шаратов, 1949; Алексеев, 1959, 1968; Майсурян, Атабекова, 1974; Мироненко, 1975; Бузмаков, 1977; Антоний, Пылов, 1980/. Кормовая ценность люпина, как известно, определяется не только содержанием пластических и минеральных веществ (белки, углеводы, жиры, макро- и микроэлементы и др.), но составом и содержанием так называемых вторичных веществ /Неринг, Люддеке, 1974/. Среди них особое место принадлежит флавоноидам, одной из самых многочисленных и распространённых групп вторичных веществ /Гейсман, 1960/, обладающим широким спектром биологического действия /Барабой, 1976/. В первую очередь для них характерна Р-витаминная активность /Барабой, 1976 и др./ и для некоторых представителей - эстрогенное действие /Bradbury, White, 1951; Cheng et al., 1955; Шамшурин, 1963/. Попадая с кормами в организм животных, флавоноиды в значительной степени оказывают влияние на их суточные привесы, лактацию и репродуктивную способность /Rankin, 1963; Clark, 1964, 1965; Шамрай, Федуров, 1968; Головин, 1973; Палфий и др., 1975; Несвячена и др., 1980/.

С другой стороны, биологически активные флавоноиды, попадая тем или другим путём в почву (через корневые выделения или с растительными остатками), могут прямо или косвенно воздействовать на её биологическую активность. По современным представлениям /Райс, 1978; Гродзинский и др., 1979/, почвоутомление связано главным образом с накоплением в почве разнообразных токсических метаболитов фенольной природы.

Биологическая активность флавоноидов будет определяться составом и содержанием отдельных компонентов флавоноидного комплекса

растений и характером изменения его при воздействии различных факторов. В случае с люпином такими факторами будут экологические условия и хозяйственная деятельность человека.

Можно предположить, что вместе с превращением биомассы будет изменяться и флавоноидный комплекс растений. Однако прямые данные на этот счёт практически отсутствуют. Отмечается только, что сушка /Вечер с соавт., 1978/ и гомогенизация /Волинец, 1973 и др./ растений приводит к изменению состава и содержания флавоноидов. Характер и степень превращения флавоноидного комплекса растений при подсушивании (подвяливание), брожении (силосование) и разложении (гниение) биомассы в почве не изучен, хотя указанные процессы имеют широкое распространение при использовании растительного материала.

Цель и задачи исследования. Настоящая работа посвящена изучению изменения флавоноидного комплекса люпина под влиянием экологических условий и хозяйственной деятельности человека. Конкретные задачи сводились к следующему:

1. Провести идентификацию флавоноидных соединений некоторых видов люпина.
2. Изучить состав и содержание флавоноидных соединений в онтогенезе некоторых видов люпина.
3. Выяснить характер и степень изменения флавоноидного комплекса люпина в процессах подвяливания, силосования и разложения биомассы в почве.
4. Разработать химический способ стимулирования роста растений жёлтого люпина.

Научная новизна работы. На основании комплекса физико-химических и хроматографических методов у узколистного люпина идентифицированы свободные флавоноидные агликоны и гликозиды: кверцетин, кемпферол, изораинетин, апигенин, диосметин, гениостеин, 3',4'-метилендиоксиоробол, апигенин-7-глюкозид, диосметин-7-глюкозид, генистин, генистеин-7-глюкозилглюкозид, 3',4'-метилендиоксиоробол-7-глюкозид и предположительно апигенин-7-глюкозилглюкозид и диосметин-7-глюкозилглюкозид. У многолетнего люпина обнаружены свободные флавоноидные агликоны и гликозиды: лютеолин, апигенин, диосметин, гениостеин, 3',4'-метилендиоксиоробол, лютеолин-7-глюкозид, лютеолин-4'-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, акацетин-7-глюкозид, генистин, генистеин-7-глюкозилглюкозид, 3',4'-метилендиоксиоробол-7-глюкозид и предположительно изомеры лютеолин-7-глюкозида и апи-

генин-7-глюкозида. Диосметин и лютеолин-4-глюкозид выделены и идентифицированы впервые.

Изучены закономерности накопления флавоноидных гликозидов в листьях и надземной массе жёлтого люпина в течение суток и в онтогенезе, в листовых пластинках и подземных органах узколистного и многолетнего алкалоидного люпинов в онтогенезе.

Впервые экспериментально установлено, что при подвяливании скошенной надземной массы жёлтого люпина происходит накопление флавоноидных агликонов и гликозидов, при силосовании жёлтого люпина наблюдается снижение содержания флавоноидных гликозидов и увеличение уровня агликонов, при разложении запаханного в почву многолетнего и узколистного люпинов имеет место полное превращение флавоноидов до фенолкарбоновых кислот.

Доказана возможность стимулирования накопления биомассы растениями жёлтого люпина и повышения её сахаристости с помощью 3-хлорфталевого ангидрида без существенного изменения содержания белковых веществ, алкалоидов и флавоноидных соединений (авторское свидетельство СССР № 1001906, 1982).

Научная и практическая ценность. Полученные экспериментальные результаты расширяют наши знания о химическом составе разных видов люпина, степени превращения флавоноидного комплекса при совместном воздействии экологических факторов на растения и позволяют обосновать рациональное использование зелёной массы и силоса жёлтого люпина на корм скоту в зависимости от времени скашивания, степени подвяливания и компонентного состава силосуемой массы. Основные сведения по этим вопросам изложены в двух информационных листках БелНИИМТИ (1981, 1982). Разработан способ стимулирования роста и повышения сахаристости надземной массы жёлтого люпина с помощью 3-хлорфталевого ангидрида, заключающийся в обработке растений в период 6-8 листьев водными растворами данного вещества. Он повышает урожайность зелёной массы на 12% и содержание воднорастворимых сахаров на 20%.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на II конференции Белорусского биохимического общества (Минск, 1974); на III Всесоюзном биохимическом съезде (Рига, 1974); на III Международном симпозиуме по регуляторам роста растений (НРБ, Варна, 1981); на координационном совещании по проблемам физиологии и биохимии растений Белоруссии и Прибалтийских республик (Минск, 1983); на заседаниях Витебского отделения Всесоюзного биохимического общества (Витебск, 1976, 1982, 1984).

Публикации. Полученные результаты освещены в II статьях и тезисах докладов, двух информационных листках и заявке на авторское свидетельство.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава I), посвящённого характеристике и распространению флавоноидных соединений высших растений, изменению содержания их в онтогенезе, в течение суток, в процессах использования биомассы растений (подвяливание, сушка, силосование и разложение в почве) и характеристике люпина как объекта исследований; описания объектов и методов исследований (глава II), изложения результатов и их обсуждения (главы III-V), выводов, списка литературы (232 источников, из них 60 на иностранных языках) и приложения (12 таблиц). Работа изложена на 173 страницах машинописного текста, включает 47 таблиц и 20 рисунков.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили люпин жёлтый (*Lucinus luteus* L.) сортов Быстрорастущий 4 и Академический I, люпин мно.летний (*L. polyphyllus* Lindley) культивируемой алкалоидной формы, люпин узколистный (*L. angustifolius* L.) сорта Беняконский 484 и почва из-под растений названных видов. Одновременно и независимо от нас работа по идентификации флавоноидов многолетнего и узколистного люпинов других сортов проводилась Н.А.Ламаном в Институте экспериментальной ботаники АН БССР (данные не опубликованы). Растения люпина выращивали на учебно-опытном поле Витебского пединститута (пос. Улановичи Витебского р-на). Среднюю пробу надземной массы и отдельных органов люпина отбирали для анализов во всех случаях в количествах, достаточных для определения флавоноидных гликозидов и агликонов. Исходные растения, идущие на силосование, и сам силос брали на экспериментальной базе "Тулво" Витебского р-на (1973, 1975 гг.) и в колхозе им. В.И.Ленина Шумилинского р-на (1973, 1977 гг.).

Качественное определение флавоноидов в растениях проводили методом систематического анализа с последовательным выделением свободных и конъюгированных соединений /Малтаков и др., 1971; Волынец, Маштаков, 1973/.

Флавоноиды из почвы выделяли последовательно нейтральным 96%-ным и 70%-ным этанолом методом настаивания. Объединённые экстракты центрифугировали, упаривали под вакуумом и сухой остаток растворяли в 0,6 мл 70%-ного этанола.

Фенолкарбоновые кислоты из почвы выделяли по методике, описанной в работе /Wang et al., 1967 /, с некоторыми изменениями, которые сводились к разделению фенолкарбоновых кислот на бумаге в смеси растворителей изопропанол-аммиак-вода в отношении 12:1:1 и 5%-ная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

Препаративное выделение флавоноидов проводили с помощью хроматографии на полиамидном сорбенте по методике, описанной в работе /Токавкина и др., 1973/. Отдельные флавоноидные соединения выделяли методом препаративной хроматографии на бумаге.

Идентификацию флавоноидных соединений и фенолкарбоновых кислот проводили при помощи комплекса физико-химических и хроматографических методов, подробно описанных в работах /Банджкова, 1965; Максютина, Литвиненко, 1968; Волинец, Маштаков, 1973; Запромёттов, 1974 и др./. При идентификации отдельных флавоноидов определяли температуру плавления в капилляре, анализировали элементный состав микрометодом Коршун-Климовой /Климова, 1975/, снимали ИК-спектры на приборе UR -20 в таблетках из KBr и масс-спектры на приборе "Вариан" MAT-3II.

Гидролиз флавоноидных гликозидов проводили 2N HCl или 20%-ной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в запаянной ампуле на кипящей водяной бане в течение 2-4 ч. Биозиды гидролизовали ступенчато 2%-ной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в течение 15-20 мин /Борисов, Сербин, 1972/.

Щелочное расщепление флавоноидных агликонов проводили по методике, описанной в работе /Литвиненко и др., 1967/. Продукты расщепления хроматографировали восходящим способом в смеси растворителей изобутанол-уксусная кислота-вода в отношении 4:1:5 или в смеси н-бутанол-бензол-уксусная кислота-вода в отношении 2:10:2:1 для обнаружения флороглюцина и фенолкарбоновых кислот.

Сахарные остатки гликозидов изучали методом нисходящей хроматографии на бумаге в системе растворителей н-бутанол-пиридин-вода в соотношении 6:4:3.

Определение содержания флавоноидных соединений и фенолкарбоновых кислот проводили спектрофотометрическим методом /Маштаков и др., 1971/. Количество вещества рассчитывали по калибровочным кривым, построенным для индивидуальных соединений, и выражали в мкг/г или мг/г сухой массы. В случае отсутствия подлинного образца использовали близкие по структуре вещества.

Анализ состава и содержания сахаров в растениях осуществляли методом хроматографии на бумаге /Завадская и др., 1962; Павлинова, 1962/ в растворителе н-бутанол-пиридин-вода (6:4:3), пропус-

как его дважды нисходящим способом.

Определение суммарного содержания алкалоидов проводили электронефелометрическим методом /Мироненко и др., 1967/, используя колориметр-нефелометр фотоэлектрический (ФЖ-56М) со светофильтром №8. Количество алкалоидов рассчитывали по калибровочному графику, построенному по сумме алкалоидов, выделенных из семян алкалоидного желтого люпина.

Определение общего и остаточного азота проводили в сухом растительном материале по методу Кьельдаля с последующим колориметрированием минерализата с реактивом Неслера в модификации Б.Н.Кочергина (1971). Белковый азот находили по разнице между общим и остаточным азотом.

Биохимические анализы выполняли в 3-5-кратной повторности.

Достоверность результатов устанавливали с помощью статистических методов /Рокицкий, 1973/.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Выделение и идентификация флавоноидных соединений некоторых видов люпина

При разделении экстрактов листьев многолетнего алкалоидного люпина обнаружили основных 5 свободных и 9 конъюгированных компонентов (рис. I А), а при разделении экстрактов листьев узколистного люпина - по 7 свободных и конъюгированных веществ (рис. I Б).

Вещества свободной фракции отличались хорошей подвижностью в соответствующих растворителях, образовывали переходный в октаэдр цветной комплекс с  $Mg + HCl$  или не образовывали окрашенный продукт с  $\alpha$ -нафтолом и концентрированной серной кислотой, имели желтую, коричневую или темную окраску пятен в УФ-свете, давали цветные реакции с  $NaOH$ ,  $AlCl_3$ , ДЖ и др., что позволило их отнести к флавоноидным агликонам.

Вещества фракции конъюгатов по овоюжности цветных реакций, флуоресценции в УФ-свете и высокой подвижности в водных системах растворителей были отнесены к флавоноидным гликозидам.

На основании цветных реакций, окраски пятен в УФ-свете и изучения УФ-спектров флавоноидные агликоны 1, 3 и 5 свободной фракции листьев многолетнего люпина предварительно были отнесены к флавонам, а агликоны 2 и 4 - к изофлавонам.

Спектральные исследования в УФ-области веществ 1-5 с  $AlCl_3$ , плавленым ацетатом натрия, кристаллической борной кислотой и  $NaOH$  показали, что у всех изучаемых веществ имеются свободные



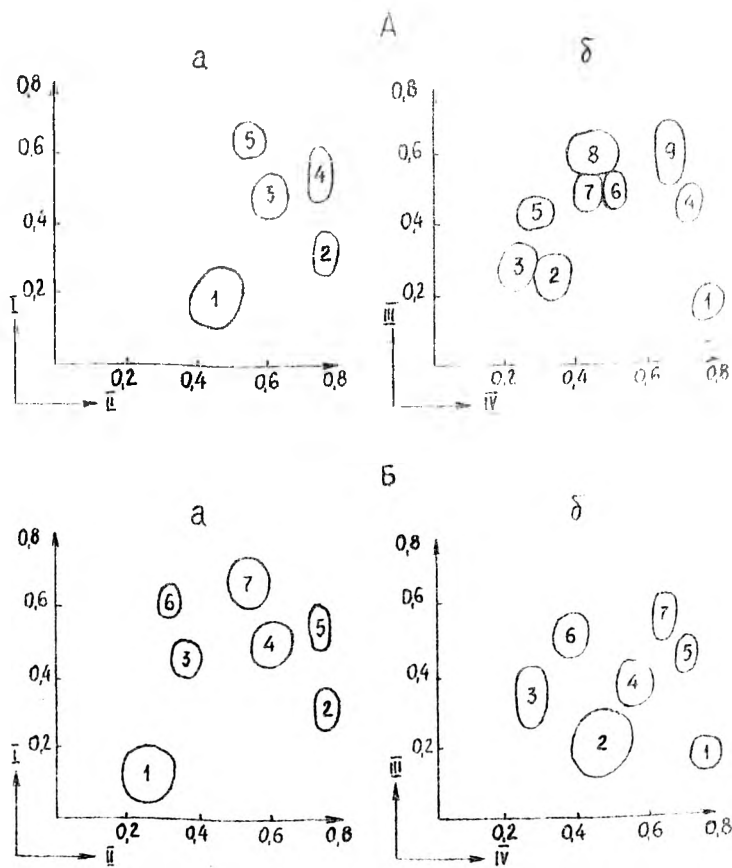


Рис. 1 Схемы двумерных хроматограмм флавоноидных соединений листьев многолетнего вяза (А) и уязколистного (Б) липинов  
 а - свободные агликоны, б - гликозиды. I - хлороформ-укс. к-та (3:2), II - 50%-ная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , III - изобутанол-укс.к-та - вода (4:1:5), IV - 20%-ная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

оксигруппы в положениях 5 и 7. Наряду с этим у веществ 3 и 4 присутствует гидроксильная группа в положении 4', а у вещества I-3', 4'-диоксигруппировка. Для подтверждения структуры выделенных агликонов осуществляли их щелочное расщепление.

Дополнительная информация о структуре вещества I получена при изучении его масс- и ИК-спектров. В масс-спектре этого вещества имеется пик молекулярного иона  $M^+285$ , а в ИК-спектре обнаруживаются полосы поглощения фенольных гидроксильных групп ( $3380-2860\text{ см}^{-1}$ ), карбонильной группы ( $1658\text{ см}^{-1}$ ), ароматической системы ( $1620, 1515\text{ см}^{-1}$ ) и Сп-групп бензольных колец ( $860, 840, 810\text{ см}^{-1}$ ).

На основании проведенных исследований вещества I-5 свободной фракции листьев многолетнего липина отнесены соответственно к лютеолину, 3',4'-метилендиоксиороболу, апигенину, генистеину и диосметину.

Изучение структуры гликозидов I-9 листьев многолетнего липина описанными методами, изучения продуктов кислотного гидролиза и сравнения результатов исследования с литературными данными позволило отнести их соответственно к генистеин-7-глюкозилглюкозиду, изомеру лютеолин-7-глюкозида (предположительно), лютеолин-7-глюкозиду, 3',4'-метилендиоксиоробол-7-глюкозиду, лютеолин-4'-глюкозиду, изомеру апигенин-7-глюкозида (предположительно), апигенин-7-глюкозиду, акацетин-7-глюкозиду и генистеин-7-глюкозиду (генистину). Изучение флавоноидных соединений подземных органов (корни с корневищами) многолетнего липина по той же схеме, что и листьев, показало, что они представлены свободными агликонами и гликозидами: генистеином, 3',4'-метилендиоксиороболом, генистином, генистеин-7-глюкозилглюкозидом и 3',4'-метилендиоксиоробол-7-глюкозидом.

В листьях уксалистного липина обнаружены соответственно свободные флавоноидные агликоны: кверцетин, 3',4'-метилендиоксиоробол, кемпферол, апигенин, генистеин, изорамнетин, диосметин (см. рис. I Б, а) и гликозиды: генистеин-7-глюкозилглюкозид, диосметин-7-глюкозилглюкозид (предположительно), диосметин-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозилглюкозид (предположительно), 3',4'-метилендиоксиоробол-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозид и гениотин (см. рис. I Б, б).

В корнях данного вида липина присутствуют свободные агликоны 3',4'-метилендиоксиоробол, апигенин, генистеин и гликозиды: 3',4'-метилендиоксиоробол-7-глюкозид и генистин.

Изоляционно-химическими и хроматографическими методами установлено, что флавоноидный комплекс желтого липина сортов Быстрорастущий 4

и Академический I идентичен флавоноидному комплексу ранее изученных сортов Белорусский кормовой и Боровлянский /Малтаков с соавт., 1971; Лапан, Волынец, 1974 и др./.

Динамика накопления флавоноидных соединений в растениях некоторых видов люпина

Сезонная динамика флавоноидов. Результаты многолетних исследований показали, что у всех изученных видов люпина происходит изменение содержания флавоноидных гликозидов в процессе роста и развития растений.

Изучение динамики флавоноидных гликозидов в надземной массе жёлтого люпина показало (табл. I), что общее содержание их изменяется относительно слабо от фазы бутонизации до конца цветения. Тем не менее оно несколько выше в начале и конце этого периода у сорта Академический I. Для сорта Быстрорастущий 4 характерно повышение суммарного содержания флавоноидных гликозидов только в фазе бутонизации.

В листьях жёлтого люпина, как показали 4-летние исследования, отмечено более существенное изменение содержания флавоноидных гликозидов по фазам вегетации растений (от  $44,7 \pm 0,59$  до  $59,9 \pm 0,73$  мкг в возрасте 4–8 листьев и от  $27,5 \pm 0,41$  до  $41,5 \pm 0,55$  мкг в фазе зеленой спелости семян). Наиболее высокое накопление флавоноидных гликозидов было характерно листьям нижней части растений. Динамика накопления индивидуальных флавоноидов была сходна с изменением суммарного содержания этих веществ.

2-летнее изучение содержания флавоноидных гликозидов показало, что для листовых пластинок узколистного люпина была характерна та же динамика накопления флавоноидных гликозидов, что и для листьев жёлтого люпина, но более низкое содержание ( $18,1 \pm 0,32$  –  $30,9 \pm 0,40$  мкг/г).

В корнях узколистного люпина основной максимум содержания изофлавоновых гликозидов приходился на начальный период роста ( $14,6 \pm 0,19$  –  $23,0 \pm 0,31$  мкг/г), а дополнительный максимум – на фазу зелёной спелости семян ( $6,7 \pm 0,13$  –  $13,1 \pm 0,15$  мкг/г). В эти же периоды обнаружено наиболее высокое содержание каждого отдельного компонента.

В результате исследований флавоноидного комплекса листовых пластинок 1-, 2- и 3-летних растений многолетнего люпина установлено, что максимальное содержание флавоноидных гликозидов наблюдается у 2-летних растений и приходится на фазу цветения

Изменение содержания флавоноидных гликозидов (мг/г сухой массы) в надземной массе разных сортов жёлтого люпина в онтогенезе (средние данные за 1977 и 1980 гг.)

Фаза развития	! флавоны	! флавонолы	! Изофлавоны	! Сумма
Быстрорастущий 4				
Бутионизация	4,1	13,1	6,4	23,6
Начало цветения	3,9	11,0	6,1	21,0
Массовое цветение	4,9	11,1	4,7	20,7
Конец цветения	4,3	10,2	6,0	20,5
Зелёные плоды	3,9	6,5	8,0	18,4
Академический I				
Бутионизация	3,0	13,8	6,6	23,4
Начало цветения	4,6	11,7	6,2	22,5
Массовое цветение	4,4	10,6	6,2	21,2
Конец цветения	6,2	11,6	6,8	24,6
Зелёные плоды	5,1	5,9	8,5	19,5

(70,2±0,81 мг/г), а у 3-летних растений – на фазу бутонизации (57,5±0,75 мг/г). В подземных органах 2- и 3-летних растений многолетнего люпина содержание изофлавоновых гликозидов повышалось от фазы бутонизации до фазы зелёной спелости семян соответственно до 25,3±0,35 и до 25,8±0,37 мг/г.

Суточная динамика флавоноидов жёлтого люпина. Изучение содержания флавоноидных гликозидов в отдельных органах жёлтого люпина сорта Быстрорастущий 4 в возрасте 8 листьев в течение суток показало, что более резкие суточные колебания в содержании флавоноидов отмечались в листовых пластинках и значительно более слабые – в черешках и стеблях.

Высокое суммарное содержание флавоноидных гликозидов в листовых пластинках и стеблях люпина наблюдалось в 12 ч дня соответственно 33,7±0,54 и 11,1±0,26 мг/г).

Во второй половине дня уровень флавоноидных гликозидов в этих органах снижался и опять повышался в листовых пластинках ночью (32,0±0,52 мг/г), а в стеблях – в утренние часы (10,2±0,20 мг/г).

Суточная динамика флавоноловных гликозидов отличалась от динамики флавоновых и изофлавоновых гликозидов. В листовых пластин-

ках максимальное количество флавонолов было в 12 ч ( $25,5 \pm 0,36$  мг/г), минимальное – в 21 ч 30 мин ( $16,7 \pm 0,28$  мг/г). Суточное содержание флавоновых и изофлавоновых гликозидов изменялось слабо.

Изменение флавоноидного комплекса некоторых видов люпина в связи с их хозяйственным использованием

Изменение содержания флавоноидов жёлтого люпина в процессе подвяливания. Исследовали изменение состава и содержания флавоноидных гликозидов и агликонов в отдельных органах и надземной массе скошенных растений люпина (сорта Быстрорастущий 4 и Академический I) в процессе подвяливания. Опыты проводили в полевых условиях в течение трёх лет: 1973 г. (средняя проба отдельных органов со всего растения), 1975 и 1977 гг. (средняя проба с верхней части растений), 1977 г. (средняя проба с надземной массы).

Установлено, что подвяливание люпина приводит к повышению суммарного содержания флавоноидных гликозидов в листовых пластинках на 36%, черешках на 12% и стеблях на 3% через 12 ч после скашивания (табл. 2). В дальнейшем как групповое, так и количество отдельных флавоноидных гликозидов в разных органах люпина мало отличалось от изменения суммарного содержания флавоноидов в течение суток. Исследования состава и содержания флавоноидных гликозидов в отдельных органах люпина в последующие годы, проведенные по несколько другой схеме, как отмечалось выше, дали аналогичные результаты. Не выявлены и сортовые различия в изменении флавоноидных соединений в течение суток. Что же касается агликонов, то максимальное содержание большинства их обнаружено через 6 ч после скашивания. Суммарное содержание агликонов повышалось в течение 12 ч подвяливания (от  $1,56 \pm 0,06$  до  $78,25 \pm 1,52$  мкг/г). В надземной массе изученных сортов люпина через 12 ч подвяливания содержание флавоноидных гликозидов возрастало на 45–49%.

Изменение флавоноидного комплекса жёлтого люпина при силосовании. Анализировали состав и содержание флавоноидных гликозидов и агликонов во время закладки и использования силоса. Для анализа отбирали среднюю пробу как отдельных органов (листья, стебли, створки бобов), так и общей надземной массы.

Результаты изучения флавоноидного комплекса в силосованном люпине сорта Академический I, заложенного в фазе зелёных бобов совместно с ячменной соломой, подсолнечником и зелёным овсом, показали (табл. 3), что суммарное содержание флавоноидных гликозидов в полевых снижалось от 38,0 до 4,6 мг/г (сохранность 11,5%) и над-

Влияние подвяливания на содержание флавоноидных гликозидов в отдельных органах лопина сорта Быстрорастущий 4 (1973 г.)

Группа веществ	Содержание, мг/г сухой массы			
	продолжительность подвяливания, ч			
	0	6	12	24
<u>Листовые пластинки</u>				
Флавоны	4,8 $\pm$ 0,05	4,9 $\pm$ 0,05	5,2 $\pm$ 0,09	5,1 $\pm$ 0,07
Флавонолы	15,9 $\pm$ 0,23	17,6 $\pm$ 0,27	22,2 $\pm$ 0,30	20,8 $\pm$ 0,29
Изофлавоны	7,0 $\pm$ 0,10	8,9 $\pm$ 0,13	10,3 $\pm$ 0,15	10,3 $\pm$ 0,11
Сумма	27,7	31,4	37,7	36,2
% от контроля	100	113	136	130
<u>Черешки</u>				
Флавоны	3,6 $\pm$ 0,06	4,4 $\pm$ 0,09	4,3 $\pm$ 0,08	4,2 $\pm$ 0,07
Флавонолы	5,4 $\pm$ 0,11	4,8 $\pm$ 0,08	4,9 $\pm$ 0,09	4,9 $\pm$ 0,10
Изофлавоны	6,4 $\pm$ 0,11	8,2 $\pm$ 0,12	8,1 $\pm$ 0,09	8,0 $\pm$ 0,09
Сумма	15,4	17,4	17,3	17,1
% от контроля	100	112	112	111
<u>Стебли</u>				
Флавоны	3,8 $\pm$ 0,11	3,8 $\pm$ 0,07	3,8 $\pm$ 0,09	3,4 $\pm$ 0,05
Флавонолы	0,8 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,03	1,0 $\pm$ 0,04	1,0 $\pm$ 0,04
Изофлавоны	5,1 $\pm$ 0,09	5,1 $\pm$ 0,10	5,2 $\pm$ 0,11	5,0 $\pm$ 0,07
Сумма	9,7	9,8	10,0	9,4
% от контроля	100	101	103	96

земной массе — от 21,3 до 2,0 мг/г (сохранность 9,3%).

Как в свежих, так и силосованных листьях и надземной массе флавоны были представлены только гликозидом рой<sup>+</sup>олином, содержание которого составляло в силосованных листьях 3,8 мг/г (сохранность 39,1%) и надземной массе 0,8 мг/г (сохранность 16,3%). Из изофлавоновых гликозидов в силосе сохранялся только генистеин-8-С-моноглюкозид. Содержание его составляло во время закладки силоса в листьях 2,4 $\pm$ 0,04 мг/г и надземной массе 4,3 $\pm$ 0,06 мг/г, затем оно снижалось соответственно до 0,8 (сохранность 33,3%) и 1,2 мг/г (сохранность 27,9%). Флавоноловые гликозиды в листьях и надземной массе силоса не обнаружены. Количество свободных флавоноидных агликонов в листьях и надземной массе силоса возрастало соответственно до 2,7 и 2,4 мг/г. Среди агликонов максимальным было содержание флавонов, представленных одним апигенином. Среди флавонолов обнаружены кверцетин, кемпферол и изорамензин. Изофлавоны были

представлены только генистеином.

Таблица 3

Содержание флавоноидов (мг/г сухой массы) в листьях и надземной массе силосованного люпина сорта Академический I (1977 г.)

Группа веществ	Время анализа			
	10.08		4.12	
	листья	надземная масса	листья	надземная масса
	<u>Гликозиды</u>			
Флавоны	9,7 $\pm$ 0,11	4,9 $\pm$ 0,07	3,8 $\pm$ 0,07	0,8 $\pm$ 0,02
Флавонолы	23,3 $\pm$ 0,31	8,4 $\pm$ 0,15	-	-
Изофлавоны	5,0 $\pm$ 0,09	8,0 $\pm$ 0,11	0,8 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,02
Сумма	38,0	21,3	4,6	2,0
	<u>Агликоны</u>			
Флавоны	-	-	1,9 $\pm$ 0,05	1,6 $\pm$ 0,02
Флавонолы	-	-	0,4 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,01
Изофлавоны	-	-	0,4 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,01
Сумма			2,7	2,4

В процессе силосования содержание флавоноидов в стеблях и плодах изменялось аналогичным образом.

В силосованных органах люпина сорта Быстрорастущий 4, заложеного в фазе начала цветения в чистом виде (1973 г.), в фазе зеленых бобов в смеси с зеленой рожью (1973 г.) и в фазе зеленых бобов в смеси с ячменной соломой (1975 г.), выявлены те же закономерности в изменении флавоноидного комплекса, что и у сорта Академический I. Добавление ячменной соломы к биомассе люпина, заложеного на силос, опосредствовало некоторому повышению уровня флавоноидов в листьях последнего.

Интересным представлялось изучение содержания флавоноидов в процессе пригтовления и хранения силоса. Было установлено, что снижение уровня гликозидов и накопление агликонов происходит только в первое время после закладки силоса (осень). При хранении силоса (зима-весна) содержание флавоноидов практически не изменяется.

Изменение флавоноидного комплекса люпина в процессе разложения биомассы в почве. Перед запахиванием зеленой массы изучали флавоноидный комплекс в различных органах многолетнего и узколиственного люпинов, а также в ризосфере этих видов. Почву прикорневой зоны

анализировали дополнительно на содержание фенолкарбоновых кислот как возможных продуктов метаболизма флавоноидов (Тоузур, 1968 и др.). В осенний период исследовали растительные остатки и почву из-под люпина на присутствие флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Весной следующего года в почве из-под люпина определяли содержание фенолкарбоновых кислот. Контролем служила почва с участков чистого пара.

Опыты показали, что в ризосфере многолетнего люпина при запаховании вегетативной массы присутствовал только генистин (331,2 мкг на 100 г воздушно-сухой почвы). Осенью (сентябрь) флавоноиды не обнаруживались ни в растительных остатках, ни в почве.

Содержание фенолкарбоновых кислот в ризосфере этого вида люпина во время запахования составляло 153% по сравнению с контролем (табл. 4). В начале осени в почве после разложения растительной массы их содержание снижалось до 136%. Как показали дальнейшие исследования (май), содержание фенолкарбонных кислот в почве из-под многолетнего люпина продолжало падать (до 123%). Максимальное накопление фенолкарбоновых кислот в почве наблюдалось осенью и составляло в чистом паре и почве из-под люпина соответственно 677 и 924 мкг на 100 г воздушно-сухой почвы.

Таблица 4

Содержание фенолкарбоновых кислот в почве из-под многолетнего люпина, мкг на 100 г воздушно-сухой почвы

Кислота	! Во время запахования! После разложения растительной массы			
	! люпина !		! тельной массы	
	! контроль !	! опыт !	! контроль !	! опыт !
	! 22.06.1977 г. !		! 16.09.1977 г. !	
Сиреневая	68±2,0	76±2,0*	54±1,5	61±2,0*
Ванилиновая	130±3,5	197±5,0*	100±1,8	131±2,4*
п-Оксибензойная	176±4,5	335±9,3*	270±9,4	414±12,5*
Феруловая	33±1,4	36±1,2	81±3,0	80±2,6
транс-п-Кумаровая	38±1,5	46±1,4*	120±4,2	170±4,2*
цис-п-Кумаровая	19±0,6	22±0,8*	52±1,7	68±2,5 <sup>2</sup>
Сумма	454	712	677	924
% от контроля	100	153	100	136

\* Достоверно при  $P \leq 0,05$ .

Во время запахования уколостного люпина сорта Беляковский 484 (фаза бутонизации, 7.07.1977 г.) в ризосфере был обнаружен только генистин в следовых количествах. В осенний период флаво-



ноиды отсутствовали в почве и растительных остатках. Содержание фенолкарбоновых кислот в почве из-под узколистного липина во время запахивания составляло всего лишь 104% от контроля, в осенний период — 103%, а весной (май) — 108%. Максимальное их количество в почве обнаружено осенью (744 мкг/100 г).

В ризосфере жёлтого липина сорта Быстрорастущий 4 в фазе цветения обнаружены гликозиды генистеина (35,17 мкг/100 г), а в период созревания семян — дополнительно ройфолин и изофлавоновый гликозид 3',4'-метилendioксиоробол-7-глюкозид (216,25 мкг/100 г). Содержание фенолкарбоновых кислот в ризосфере жёлтого липина по мере вегетации слабо возрастало и составляло осенью 583 мкг/100г (108% от контроля).

Сопоставление содержания фенольных соединений в ризосфере и почве из-под липинов (на основании наших данных) с действием их на рост и развитие проростков культурных растений, содержание микроорганизмов в почве, активность почвенных ферментов, поступление минеральных веществ в растения (на основании литературных данных) позволяет сделать заключение, что почвоутомление может иметь место только после культуры многолетнего липина не за счёт прямого действия фенольных соединений на последующие культуры, а в результате подавления ими биологической активности почвы в широком смысле этого слова.

Способ стимулирования роста растений жёлтого липина. Для стимулирования роста и содержания воднорастворимых сахаров в надземной массе жёлтого липина мы воспользовались 3-хлорфталевым ангидридом (3-ХФА), впервые предложенным для регуляции накопления сахаров в корнеплодах сахарной свеклы /Кудрявцев и др., 1981/. Растения липина в возрасте 6–8 листьев обрабатывали в полевых условиях 0,001–0,1%-ными водными растворами данного вещества и анализировали различные органы на содержание воднорастворимых сахаров в начале фазы цветения (1976 г.) или обдув надземную массу в фазе цветения (1977 г.). Как показали результаты исследований (табл. 5), при обработке растений в возрасте 6 листьев 3-ХФА эффективным оказался 0,005%-ный раствор, способствующий накоплению зелёной массы липина сорта Академический I в фазе цветения на 12,9% и увеличению содержания воднорастворимых сахаров в надземной массе на 27%. На растениях сорта Быстрорастущий 4 эффективным был 0,1%-ный раствор указанного вещества, под воздействием которого биомасса в фазе цветения увеличилась на 11,3% и содержание воднорастворимых сахаров возросло на 14%.

Влияние 3-ХФА на накопление биомассы растениями и суммарное содержание воднорастворимых сахаров в надземной массе желтого люпина сорта Академический I (1977 г.)

Концентрация 3-ХФА, %	Зелёная масса ц/га	% от контроля	Содержание сахаров, мг/г сухой массы	% от контроля
Контроль	397,0	100,0	91,18	100
0,001	400,8	101,0	93,91	102
0,005	448,2	112,9	116,66	127
0,01	418,8	105,5	107,29	117
0,1	408,5	102,9	93,71	102

Опыты показали, что эффективные концентрации 3-ХФА не оказывали существенного влияния в обработанных растениях люпина на содержание флавоноидных соединений, белкового азота и алкалоидов.

### В В В О Д Н

1. Исследованы флавоноидные соединения многолетнего люпина. Они отнесены к флавонам - апигенину, лютеолину, диосметину, апигенин-7-глюкозиду, лютеолин-7-глюкозиду, лютеолин-4-глюкозиду, акацетин-7-глюкозиду и предположительно изомерам апигенин-7- и лютеолин-7-глюкозидам; изофлавонам - генистеину, 3',4'-метилendioксиороболу, генистину, 3',4'-метилendioксиоробол-7-глюкозиду и генистеин-7-глюкозилглюкозиду. Диосметин и лютеолин-4-глюкозид обнаружены нами впервые.

2. Идентифицированы флавоноидные соединения узколистного люпина. Они представлены флавонами - апигенином, диосметином, апигенин-7-глюкозидом, диосметин-7-глюкозидом и, по-видимому, апигенин-7-глюкозилглюкозидом и диосметин-7-глюкозилглюкозидом; флавонолами - кверцетином, кемпферолом и изорамнетином; изофлавонами - генистеином, 3',4'-метилendioксиороболом, генистином, 3',4'-метилendioксиоробол-7-глюкозидом и генистеин-7-глюкозилглюкозидом.

3. Установлено, что содержание флавоноидных гликозидов в растениях изученных видов люпина изменяется в онтогенезе:

а) в листьях желтого люпина обнаружено два максимума в накоплении указанных соединений: в период 4-8 листьев (до 5,9%) и в фазе зелёной спелости семян (до 4,2%) в расчёте на сухую массу.

В надземной массе максимальное содержание флавоноидов приходится на фазу бутонизации и конец цветения (до 2,5%), при этом высокий уровень изофлавонов обычно наблюдается в фазе зелёной спелости семян (до 0,9%);

б) в листовых пластинках узколистного люпина динамика флавоноидов принципиально не отличается от особенностей накопления их в листьях жёлтого люпина. В корнях максимальное содержание изофлавоновых гликозидов отмечено в начальный период развития растений;

в) в листовых пластинках 2-летних растений многолетнего алкалоидного люпина выявлен один максимум в накоплении флавоноидных гликозидов в фазе цветения, а у 3-летних растений — в фазе бутонизации. В подземных органах 2- и 3-летних растений максимальное накопление флавоноидных гликозидов обнаружено в фазе зелёной спелости семян.

4. Самое высокое накопление флавоноидных гликозидов в течение суток в надземных органах жёлтого люпина наблюдается в 12 ч. В это время их содержание в листовых пластинках и стеблях достигает соответственно 3,4 и 1,1% на сухую массу. Состав флавоноидов в исследованных органах люпина в течение суток остаётся практически постоянным.

5. Подвяливание скошенной надземной массы жёлтого люпина приводит к повышению содержания флавоноидных агликонов и гликозидов, достигая максимума через 12 ч. Качественный состав флавоноидного комплекса не изменяется. Предполагается, что накопление флавоноидов в подвяленной массе связано с усилением их биосинтеза.

6. В процессе силосования жёлтого люпина наблюдается снижение содержания флавоноидных гликозидов (до 10 раз) и увеличение уровня агликонов (до 8 раз). При этом гликозиды флавонолов в силосе исчезают полностью, а агликоны остаются в небольшом количестве. Среди гликозидов в силосованной массе сохраняется только ройфолин (30–50%) и генистеин-8-С-моногогликозид (30–98%). Предполагается, что превращения флавоноидных компонентов при силосовании происходят в результате гидролиза гликозидов и частичного расщепления флавоноидных агликонов.

7. Установлено, что через 2–3 месяца после запахивания биомассы многолетнего и узколистного люпинов флавоноидные соединения не обнаруживаются ни в растительных остатках, ни в почве. Предполагается, что в результате деятельности микрофлоры и экологических факторов флавоноидный комплекс люпина превращается до конечных

продуктов - фенолкарбоновых кислот. В это время содержание фенол-карбоновых кислот в почве из-под многолетнего люпина возрастает (до 36%), что может привести к почвоутомлению в результате действия их на биологическую активность почвы.

#### Практические предложения

1. С целью повышения содержания биоактивных флавоноидов в зелёной массе жёлтого люпина в зависимости от её использования следует:

а) скашивать растения люпина на корм скоту в первой половине дня, что способствует увеличению содержания флавоноидов на II, 2% по сравнению со второй половиной дня;

б) подвяливать скошенную надземную массу люпина при использовании её на силос или на корм животным в течение 12 ч, что обогащает биомассу флавоноидами на 45-49%.

2. Силосование биомассы люпина следует проводить в смеси с зелёной массой злаков, содержащей устойчивые к разложению гликофлавоны, или добавлять к силосуемой смеси солому злаков. Это будет способствовать значительному повышению содержания флавоноидов в силосе.

3. Разработан способ повышения урожайности зелёной массы жёлтого люпина (на 12%) и содержания в ней воднорастворимых сахаров (на 20%). С этой целью следует проводить обработку растений люпина в период 6-8 листьев 0,005 и 0,1%-ным водным раствором 3-хлорфталевого ангидрида соответственно сортов Академический I и Быстрорастущий 4 (авторское свидетельство СССР №1001906, 1982).

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лемешев Н.Н., Скачков В.И. Динамика флавоноидов у некоторых сортов жёлтого люпина. - Тез. докл. II конф. Белорусского биохимического общества. Минск, 1974, с.216-217.

2. Кудрявцев Г.П., Лемешев Н.Н., Волянец А.П. Суточная динамика флавоноидов сахарной свеклы и жёлтого люпина. - Тез. докл. III Всесоюзного биохимического съезда. Рига, 1974, т.2, с.243.

3. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волянец А.П. Свободные флавоноидные агликаны *Lupinus polyphyllus* Lindl. - Вестн АН УССР, сер. б. Ял. наук, 1976, №6, с.104-105.

4. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волянец А.П. Лютеолин и его моногликозиды *Lupinus polyphyllus*. - Химия природных соединений, 1978, № 4, с.523-524.

5. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волянец А.П. флавоновые O-мо-

ноглюкозиды *Lupinus polyphyllus*. - (Химия природных соединений, 1979, № I, с.94.

6. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волюнец А.П. Гликозиды генистеина и 3',4'-метилendioксиороболо многолетнего и узколистного люпина. - Вестн АН БССР, сер. бйял.наук, 1979, № 2, с.90-92.

7. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волюнец А.П. Изучение динамики накопления флавоноидных гликозидов у жёлтого люпина в связи с его использованием на корм животным.- Вестн АН БССР, сер.бйял.наук, 1980, № 3, с.15-20.

8. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волюнец А.П. О флавоноидных гликозидах некоторых видов рода *Lupinus*. - Химия природных соединений, 1980, № 4, с.569.

9. Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П., Волюнец А.П. Изменения флавоноидного комплекса жёлтого люпина (*Lupinus luteus* L.) при силосовании.- Минск, 1981.-10 с. Рукопись представлена Витеб.пед.ин-том и Ин-том эксперим.ботаники АН БССР. Деп. в ВИНТИ 10 апр. 1981, № 1613-81.

10. Лемешев Н.Н., Волюнец А.П., Кудрявцев Г.П. Зависимость содержания Р-витаминных и эстрогенных флавоноидов в жёлтом люпине от сроков уборки.-Информационный листок БелНИИТИ и техн.экон.исслед. Госплана БССР. Сер. 21-09. Минск, 1981, № 252.- 3 с.

11. Лемешев Н.Н., Волюнец А.П. Биологически активные флавоноиды проявленной массы и силоса из люпина. - Информационный листок БелНИИТИ и техн.-экон.исслед. Госплана БССР. Сер. 21-09. Минск, 1982, № 001.- 3 с.

12. Кудрявцев Г.П., Лемешев Н.Н., Аранская О.С., Волюнец А.П. Способ стимулирования роста растений кормового люпина.-Авторское свидетельство СССР №1001906, 1982.

13. Волюнец А.П., Лемешев Н.Н., Кудрявцев Г.П. фенольные соединения вегетативной массы и почвы из-под люпина.- Физиол. и биох.культ.раст., 1983, т.15, № 3, с.254-261.

14. Lemeshov N.N. Kudryavtsev G.P., Volynets A.P. Seasonal dynamics of phenolcarboxylic acids of sideration soil. - In: Plant growth regulators /Eds. D.Lilov, E.Karanov, L.Iliev. Sofia, 1983, p. 293-296.

*telens*