

## ПОХІДНІ ФЕНОЛКАРБОНОВИХ ТА ГІДРОКСИКОРИЧНИХ КИСЛОТ ВИДІВ ОЖИНИ

©С. В. Ковальов

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

**РЕЗЮМЕ.** Наведені результати дослідження похідних фенолкарбонних та гідроксикоричних кислот в пагонах ожини шорсткої, ожини широковолатевидної, ожини білястої. Вперше виділено та ідентифіковано 8 сполук фенольної природи: кофейна, ферулова, *n*-кумарова, хлорогенова, неохлорогенова, ізохлорогенова, галова та елагова кислоти. **КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ожина, пагони, фенолкарбонні, гідроксикоричні кислоти.

**Вступ.** Гідроксикоричні кислоти – фенольні сполуки C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-ряду, у яких бензольне кільце зв'язане з карбоксильною групою через етильний зв'язок. Гідроксикоричні кислоти зустрічаються практично у всіх вищих рослинах. Найширше розповсюджена кофейна кислота. Вона часто утворює димери з аліциклічними кислотами – хінною та шикімовою. Найвідоміші 5-кофеїл-хінна кислота (хлорогенова) та її ізомери. Подібні складні ефіри утворюють і інші гідроксикоричні кислоти. Відомі ефіри гідроксикоричних кислот з аліфатичними кислотами (винною, яблучною, молочною тощо) і глікозидні форми. Вуглеводний замісник у глікозидах приєднується через фенольний гідроксил або карбоксильну групу. Відомо багато складних вуглеводних похідних, які часто входять до складу білків і полісахаридів [4].

Біологічна активність більшості гідроксикоричних кислот вивчена на теперішній час недостатньо. Встановлена виражена жовчогінна дія ферулової, кофейної, хлорогенової кислот і особливо цимарину (1,4-дикофеїл-хінна кислота); *n*-кумаровій кислоті притаманна туберкулостатична дія, сильну антибактеріальну властивість виявляє кофейна кислота. Хлорогенова кислота одна з основних фенольних сполук, яка виявлена у багатьох рослинах, у тому числі в каві і в артишоках. Біологічна дія хлорогенової кислоти та її складових частин обумовлена, насамперед, її потужною антиоксидантною дією. Вона інгібує 5,6-епоксидацію ретинолевої кислоти. Її вміст корелює з антиоксидантною активністю кави і плодів інших рослин. Крім антиоксидантного ефекту, хлорогенова кислота уповільнює звільнення глюкози з крові після прийому їжі і інгібує глюкозу-6-фосфатазу, зменшуючи таким чином печінковий гліколіз [7, 9-12, 14].

Ферулова кислота – метильована форма кофейної кислоти (лат – *Ferula* – гігантський кріп). Ферулова кислота – компонент ліпоцелюлози яка пов'язує лігнін з полісахаридами, надаючи жорсткості стінкам рослинних клітин. Вона є антиоксидантом, що виявляє проопототичний ефект у ракових клітинах. Клінічні дослідження показали наявність у ферулової кислоти протизапальної,

антиалергічної, протипухлинної, антиоксидантної, гепатопротекторної, антибактеріальної та інших видів активності. Фармакологічні ефекти ферулової кислоти обумовлені, в більшій мірі, її потужною антиоксидантною дією – гальмуванням процесів перекисного окиснення ліпідів в біомембранах, а також впливом на активність мембранозв'язаних ферментів, інгібуванням вільнорадикальних стадій синтезу простагландинів і лейкотрієнів, що каталізуються циклооксигеназою і ліпооксигеназою, а також за допомогою блокування специфічних рецепторів і медіаторів запалення. Крім цього, ферулова кислота має потужну фотозахисну активність [2–6, 13].

Кофейна кислота – антиоксидант, виявлений не тільки в артишоках, але і в екстрактах інших рослин. Підшкірне введення кофейної кислоти значно скорочує метастази печінки і виявляє антимітогенні, протизапальні і імуностимулювальні властивості [9, 13]. У дослідженнях *in vitro* на модельній системі дезоксирибоза – Fe<sup>2+</sup> – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оцінювали антиоксидантну активність хлорогенової кислоти, кофейної кислоти та інших фенольних сполук [2]. За цим показником (в порядку зменшення АТ-активності) досліджувані сполуки розташувалися в наступний ряд: кофейна кислота – ферулова кислота – хлорогенова кислота – нарінгенін. АТ-активність хлорогенової кислоти в 27 разів перевищує АТ-активність нарінгеніну (головного біофлавоноїда грейпфрута). Хлорогенова кислота виявляла також активність проти патогенних штамів бактерій *Escherichia coli* і *Staphylococcus aureus* [2].

Дослідження гіпоглікемічної дії кофейної кислоти були проведені групою південнокорейських вчених на мишах лінії C57B4(Ks)-db [13]. Тварини протягом 5 тижнів отримували дієти, які містили 0,02 % кофейної кислоти. Виявилось, що кофейна кислота запобігає розвитку гіперглікемії у діабетичних мишей і сприяє зростанню тварин. Більш того, кофейна кислота значно збільшувала концентрацію в плазмі інсуліну, знижувала концентрацію глюкагону і глікозильованого гемоглобіну, а також достовірно збільшувала концентрацію

глікогену в печінці. Під дією кофейної кислоти в печінці зростала активність глюकोкінази і знижувалася активність глюकोзо-6-фосфоліпази і фосфоенолпіруваткарбоксихінази [13].

Гідроксикоричні кислоти полегшують стан у разі захворювання і пом'якшують побічні явища медикаментозних препаратів. Препарати, які містять гідроксикоричні кислоти, істотно підвищують ефективність антибіотиків, завдяки своїм імуностимулювальним властивостям, а також зменшують тривалість захворювань і число ускладнень. Тому пошук перспективних лікарських рослин, які містять гідроксикоричні кислоти, є актуальним.

Нашу увагу привернули рослини роду *Rubus* L. родини *Rosaceae*. Проведені нами дослідження кількісного вмісту гідроксикоричних кислот в пагонах деяких видів ожини свідчать про їх значний вміст. Так, у пагонах ожини білястої, ожини широковологтевидної та ожини шорсткої вміст гідроксикоричних кислот склав (4,3±0,01)%, (2,76±0,02)% та (5,52±0,03)% відповідно [4], що стало поштовхом для подальшого дослідження даної сировини.

**Метою даної роботи** стало дослідження пагонів ожини шорсткої, широковологтевидної та білястої на наявність у них похідних фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот.

**Матеріал і методи дослідження.** Об'єктом дослідження стали пагони ожини білястої, широковологтевидної та шорсткої, заготовлені в Івано-Франківській області та в АР Крим у 2011–2012 роках. Речовини аналізували після дво-, трикратної кристалізації з відповідних розчинників і висушування у вакуумі при 10<sup>2</sup> мм. рт. ст. над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> при температурі 110–115°C протягом 5 годин. Температуру плавлення визначали за допомогою блока Кофлера (Franz Kustner nach K.G:Dresden; N.K. 70/3314k). УФ-спектри поглинання та оптичну густину розчинів знімали на спектрофотометрі СФ-46, Carl Zeiss (Німеччина) Specord M-80 у кюветках з товщиною шару 10 мм. ІЧ-спектри реєстрували на спектрометрі Tensor 27, UR-20 (ГДР) у таблетках калію броміду при співвідношенні речовини та наповнювача 1:200 – 1:400. Елементний склад індивідуальних речовин визначали за допомогою CHNOS-елементного аналізатора Elementar Analysen Systeme GmbH. (Німеччина).

**Виділення фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот.** Подрібнені пагони ожини шорсткої, широковологтевидної (1,5 кг), білястої (0,7 кг) обробляли 8-кратною кількістю 50 % спирту етилового. Витяги упарювали до видалення розчинника. Залишки змішували з 300 мл дистильованої води і обробляли три рази хлороформом по 300 мл. Водні залишки залишали протягом 24 при температурі 5–10 °C. Осади, які випадали з водного залишку, відфільтровували, відмивали та перекри-

сталізовували із спирту. Маточники обробляли етилацетатом і н-бутанолом.

Розділення речовин етилацетатної фракції проводили методом колонкової хроматографії на поліамідному сорбенті. Випарені етилацетатні витяги розчиняли у 50 мл спирту етилового, змішували з 50,0 г сорбенту, висушували до видалення спирту, наносили на колонку поліамідного сорбенту (d = 8 см, h = 90 см). Елюювання проводили водою з поступовим додаванням спирту етилового. Фракції відбирали по 50–100 мл. Розділення речовин контролювали хроматографією на папері у системі бутанол-оцтова кислота-вода (БОВ) (4:1:2). Отримані однорідні фракції з'єднували, випарювали, розчиняли в мінімальній кількості 96 % спирту етилового, додавали декілька краплин води та залишали для кристалізації при температурі 5–10 °C.

Фракції, які містили суміш речовин, рехроматографували на колонці поліаміду. Одержали речовини **1-8**, які були віднесені до флавоноїдів.

Фракції, які були елюйовані водою, 3 % спиртом етиловим, які містили речовини **9-16** з'єднували, випарювали до 50 мл і наносили на колонку поліамідного сорбенту (d = 5 см, h = 80 см). Елюацію вели водою з поступовим додаванням спирту. Однотипні фракції з'єднували, випарювали до сухого залишку і кристалізували. Отримали речовини **12, 13** (аморфна), **14** (аморфна), **15, 16**. Речовини **9-11** отримані препаративною хроматографією на папері FN Filtrak № 4.

**Результати й обговорення.** При хроматографуванні водно-спиртових екстрактів досліджуваної сировини у системах розчинників: бутанол-оцтова кислота-вода (БОВ) (4:1:2) – I напрямом та 15 % оцтова кислота – II напрямом, за характерною флуоресценцією у видимому та УФ-світлі до і після проявлення хромогенними реактивами виявлено близько 16 речовин фенольної природи, деякі з них попередньо були віднесені до флавоноїдів (1-8) та гідроксикоричних і фенолкарбонових кислот (9-16).

За допомогою хімічних реакцій ідентифікації і методів хроматографічного аналізу підтверджували наявність тих або інших груп природних сполук. Присутність похідних бензойної кислоти визначали якісними реакціями. При додаванні до розчину водного залишку 3 % розчину феруму (III) хлориду утворювалося синє забарвлення, а з 5 % розчином лугу – червоно-фіолетове, яке змінювалося до жовтого, що дозволило передбачити наявність у водній та етилацетатній фракціях речовин з галоїльним угрупованням. Крім того, ми використовували ПХ у системах розчинників бутанол-оцтова кислота-вода (БОВ) (4:1:2) та 2 % оцтова кислота з подальшою обробкою хроматограм специфічними реагентами. Для виявлення по-

хідних гідроксикоричної кислоти використовували етилацетатні, бутанольні фракції і водний залишок. При двомірному хроматографуванні фракцій на папері в системах розчинників: 2 % розчин кислоти оцтової; 15 % розчин кислоти оцтової з подальшою обробкою хроматограм 3 % розчином ферум (III) хлоридом, діазорективом виявили більш як 6 речовин з фіолетовою та блакитною флуоресценцією в УФ-світлі, що посилювалася чи змінювалася на блакитно-зелену при обробці хроматограм парами аміаку. Вони були віднесені до похідних гідроксикоричної кислоти. Виявлення дубильних речовин проводили у водних екстрактах і етилацетатних фракціях сировини, що вивчалася. Використовували загальні, кольорові, специфічні якісні реакції, які дозволяють відділити конденсовані та гідролізовані дубильні речовини [1]. Для виявлення окремих компонентів дубильних речовин використовували реакцію виявлення вільної галової кислоти. Похідні галової кислоти мали в УФ-світлі темну флуоресценцію, що не змінювалася під дією парів аміаку. Елагову кислоту виявляли з кристалами нітриту натрію та оцтовою кислотою за червоно-фіолетовим забарвленням. Елагова кислота на хроматограмах виявляється за фіолетовою чи блакитною флуоресценцією, що не змінюється в парах аміаку.

Виділені сполуки ідентифікували за допомогою фізико-хімічних (УФ-, ІЧ-спектроскопії) та хімічних методів аналізу. Зіставлення отриманих даних з літературними та з достовірними зразками дозволило ідентифікувати речовину **9** з кофейною, **10** з п-кумаровою, **11** з феруловою, **12** з хлорогеновою, **13** з неохлорогеновою, **14** з ізохлорогеновою, **15** з галовою і **16** з елаговою кислотами.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Громова О. А. Хофитол – стандартизований екстракт артишока. Биохимический состав и фармакологические эффекты / О. А. Громова, И. Ю. Торшин // Трудный пациент. – 2009. – № 4–5. – С. 32–38.
2. Левицкий А. П. Хлорогеновая кислота: Биохимия и физиология / А. П. Левицкий, Е. К. Вертикова, И. А. Селиванская // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – № 2. – С. 1–12.
3. Тутельян В. А. Биологическая активность вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты : распространённость, пищевые источники, биодоступность / В. А. Тутельян, Н. В. Лашнева // Вопросы питания. – 2008. – Т. 77, № 1. – С. 4–19.
4. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Сакова. – Х. : Прапор, 2000. – 703 с.
5. Фармакогностичне дослідження рослин родин Fabaceae, Rosaceae, Cannabaceae, Iridaceae, Salicaceae, Arсunaseae як джерел отримання лікарських засобів :

Кофейна кислота (**9**):  $C_9H_8O_4$ , т.пл. 196-197°C (метанол); УФ ( $\lambda$  max, нм): 325, 299, 236.

п-Кумарова кислота (**10**):  $C_9H_6O_3$ , т.пл. 212-214°C (метанол); УФ ( $\lambda$  max, нм): 310, 228.

Ферулова кислота (**11**):  $C_9H_8O_4$ , т.пл. 196-197°C (метанол); УФ ( $\lambda$  max, нм): 320, 291, 234.

Хлорогенова кислота (**12**):  $C_{16}H_{18}O_9$ , т.пл. 200-204°C (метанол);  $[a]_D^{20}$  -32,1; УФ ( $\lambda$  max, нм): 325, 298, 242.

Неохлорогенова кислота (**13**):  $C_{16}H_{18}O_9$ , (аморф.),  $[a]_D^{20}$  +2,6; УФ ( $\lambda$  max, нм): 325, 298, 245.

Ізохлорогенова кислота (**14**):  $C_{25}H_{24}O_{12}$ , (аморф.), УФ ( $\lambda$  max, нм): 329, 310, 245.

Галова кислота (**15**):  $C_7H_6O_5$ , т.пл. 256-258°C (етанол); УФ ( $\lambda$  max, нм): 276, 236; ІЧ-спектр (KBr,  $\nu$  max,  $cm^{-1}$ ): 1712 (C=O), 3400, 3300 (ОН), 1624, 1547, 1455 (C=C).

Елагова кислота (**16**):  $C_{14}H_6O_5$ , т.пл. 360°C (етанол); УФ ( $\lambda$  max, нм): 366, 256; ІЧ-спектр (KBr,  $\nu$  max,  $cm^{-1}$ ): 1720 (C=O), 3350 (ОН), 1618, 1530, 1455 (C=C).

**Висновок.** Вперше з пагонів ожини шорсткої, ожини широковологтевидної, ожини білястої виділено та ідентифіковано 8 сполук фенольної природи: кофейна, п-кумарова, ферулова, хлорогенова, неохлорогенова, ізохлорогенова, галова та елагова кислоти.

**Перспективи подальших досліджень.** Результати фітохімічних досліджень дають змогу прогнозувати суттєвий вміст фенольних сполук у пагонах ожини білястої, широковологтевидної та шорсткої, які можуть бути використані як додаткове сировинне джерело для створення на їх основі лікарських засобів.

автореф. дис. ... доктора. фармац. наук : 15.00.02 / Ковальов С. В. – Х., 2012. – 44 с.

6. Chan W.S. Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition / W. S. Chan, P. C. Wen, H. C. Chiang // Anticancer Res. – 1995. – Vol. 15. – P. 703–707.

7. Clifford M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, absorption and metabolism / M. N. Clifford // J. Sci. Food and Agric. [МФІШ]. – 2000. – Vol. 80, № 7. – P. 1033–1043.

8. Deppercorn M.A. Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rats and their intestinal bacteria / M. A. Deppercorn, P. Goldman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1972. – Vol. 69(6). – P. 1413–1415.

9. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages / D. P. Moriera, M. C. Monteiro, M. Ribeiro-Alves [et al] // J. Agric. Food. Chem. – 2005. – Vol. 53. – P. 1399–1402.

10. Identification, quantitative determination and

- antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (Prunes domestica L.) / N. Nakatani, S. Kayano, H. Kikuzaki [et al]. // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 5512–5516.
11. Parr A.J. Review: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile / A. J. Parr, G. P. Bolwell // J. Sci. Food. Agric. – 2000. – Vol. 80. – P. 985–1012.
12. Quantitative determination of phenolic compounds in artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography / K. Schutz, E. Muks, R. Carle, A. Schieber // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54(23). – P. 8812–8817.
13. Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Coffeic Acid in db/db Mice / I. I. Un, H. Mi-Kynng, B. P. Yong [et al] // J. of Pharmacol, and Exper. Therapeutics. – 2006. – V. 318, № 2. – P. 476–483.
14. Zhu X. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (Cynara scolymus L.) and their antimicrobial activities / X. Zhu, H. Zhang, R. Lo // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52(24). – P. 7272–7278.

## **DERIVATIVE OF PHENOLCARBONIC AND HYDROXYCINNAMIC ACID OF BLACKBERRY SPECIES**

©**S. V. Kovalyov**

*National University of Pharmacy, Kharkiv*

**SUMMARY.** There are presented the results of the study of derivatives of phenolcarbonic and hydroxycinnamic acids in shoots of blackberry, blackberry whiskwidelysimilar, blackberry whitish. There were at first isolated and established eight compounds of phenolic nature: caffeic, ferulic, n-coumaric, chlorogenic, neochlorogenic, isochlorogenic, gallic and ellagic acids.

**KEY WORDS:** blackberries, shoots, phenolcarbonic, hydroxycinnamic acids.