

УДК 582.736.3:54.062

В. М. КОВАЛЬОВ, О. В. ДЕМЕШКО, Л. А. ГУБЕНКО

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПЛУК ЦЕРЦИСУ ЄВРОПЕЙСЬКОГО

В листі церцису європейського ідентифіковано 3 гідроксикоричні кислоти: хлорогенову, неохлорогенову та ферулоу. Встановлено вміст гідроксикоричних кислот ($3,95 \pm 0,02$ %), фенольних сполук – ($7,72 \pm 0,11$ % та флавоноїдів – ($5,22 \pm 0,24$ %).

Ключові слова: церцис європейський; листя; гідроксикоричні кислоти; фенольні сполуки; флавоноїди, кількісний вміст

ВСТУП

Церцис європейський (*Cercis siliquastrum*) відноситься до роду Церцис (*Cercis* L.), триби Багрянникові (*Cercideae*), підродини Цезальпінієві (*Caesalpinioideae*), родини Бобові (*Fabaceae*), порядку Бобовоцвітні (*Fabales*).

Рід *Cercis* L. – один з прадавніх родів покритонасінних, представлений листопадними деревами та кущами. Вперше його визначив Турнефор у 1694 р., а детальний опис роду зробив Карл Лінней у 1752-1754 рр. У культурі види роду *Cercis* L. поширені в багатьох країнах Європи, Азії та Північної Америки. В Україні їх вперше інтродуковано у 1816 р. Кременецьким ботанічним садом, а нині поодинокі екземпляри трапляються в лісостеповій та степовій зонах Західної України, а *C. siliquastrum* та його форма «*Rosea*» найбільш поширені на Південному березі Криму. У колекції Національного дендрологічного парку «Софіївка» рід нараховує 4 види: *Cercis canadensis*, *Cercis siliquastrum*, *Cercis griffithii* та *Cercis chinensis* і 2 форми: *C. canadensis* форма «*Rosea*» і *C. siliquastrum* форма «*Albida*» [7, 11].

Cercis siliquastrum є декоративною рослиною. Культивується з XVI століття. В основному церцис використовується в масових насадженнях по межі ділянок або при створенні алеї. Чудово виглядає як одиночна рослина.

Церцис європейський використовують в озелененні вже більше чотирьох століть, і з кожним роком його популярність зростає. Захоплення викликає незвично буйне цвітіння рослини: численні лілово-бузкові квітки щільно вкривають не тільки молоді пагони, але і з'являються на скелетних гілках і навіть на стовбурі. Таке явище називається «кауліфлорія» і зустрічається досить рідко в рослинному світі.

У Криму церцис використовується тільки як декоративна рослина. На батьківщині ж в районах Середземномор'я в столярних роботах цінується його легка з красивим чорнувато-зеленим рисунком деревина та жовта, видобута з тієї ж деревини, фарба.

Бруньки дерева використовують для приготування гострої приправи.

Хімічний склад листя церцису європейського вивчений недостатньо. Листя виділяє леткі фітонциди, що змінюють біологічні властивості туберкульозної палички, пригнічуючи її розвиток [5, 7].

Метою даної роботи є дослідження біологічно активних сполук листя церцису європейського.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень було листя церцису європейського, зібране у 2012 році (травень-липень) у м. Харкові.

Для проведення якісного аналізу на різні групи БАР готували водну та спирто-водну витяжку з сировини.

Для приготування водної витяжки брали біля 2,0 г подрібненої сировини, просіяної крізь сито з діаметром отворів 3 мм, поміщали у колбу зі шліфом на 100 мл, заливали 50 мл нагрітої до кипіння води та кип'ятили протягом 30 хвилин з повітряним холодильником при перемішуванні.

Спирто-водну витяжку одержували екстракцією 70 % етанолом за наступною методикою: брали біля 2,0 г подрібненої сировини, просіяної крізь сито з діаметром отворів 3 мм, поміщали у колбу зі шліфом на 100 мл, заливали 70 % етанолом «до дзеркала», доводили до кипіння і кип'ятили впродовж 30 хв (процес проводили на водяній бані). Колбу охолоджували, екстракт проціджували крізь воронку з ватою. Сировину, що залишилась у колбі, знову заливали спиртом етиловим 70 % і кип'ятили на водяній бані. Всі

© Ковальов В. М., Демешко О. В., Губенко Л. А., 2014

три зливи об'єднували і отримували спирто-водний екстракт.

Наявність тих чи інших класів природних сполук встановлювали за допомогою загальноприйнятих хімічних реакцій ідентифікації та методів хроматографічного аналізу [2, 3, 12].

Фенольні сполуки. Якісний склад фенольних сполук вивчали методом одомірної та двомірної паперової хроматографії [1]. Для цього одержані спирто-водні екстракти наносили на хроматографічний папір і хроматографували (у попередньо підібраних) системах розчинників: н-бутанол – оцтова кислота – вода (БОВ) (4:1:2) – I напрямом та 15 % оцтова кислота – II напрямом. Хроматограму висушували у сушильній шафі та дивились у видимому і ультрафіолетовому світлі до і після проявлення парами аміаку. Враховуючи колір плям і значення R_f на хроматографі, ми виявили 20 речовин фенольної природи, які на підставі якісних реакцій і УФ-флуоресценції попередньо віднесені до гідроксикоричних кислот, кумаринів і флавоноїдів.

Гідроксикоричні кислоти. Спирто-водну витяжку листя церцису європейського хроматографували у висхідному напрямку розчинника з відомими зразками гідроксикоричних кислот. Хроматографування проводили у 2 системах: 2 % оцтова кислота та 15 % оцтова кислота.

Хроматограми обробляли парами аміаку та розчином діазотованої сульфанілової кислоти. На хроматограмах виявлено 3 плями, у парах аміаку забарвлення посилюється від блакитного до яскраво-блакитного, а після обробки діазотованою сульфаніловою кислотою у видимому світлі плями набули червоно-брунатного забарвлення, що дозволило припустити наявність гідроксикоричних кислот [4].

За величиною R_f та відповідною флуоресценцією в УФ-світлі до і після прояву розчином аміаку нами було ідентифіковано хлорогенову, неохлорогенову та ферулову кислоти.

Флавоноїди. Одержаний водно-спиртовий залишок перед екстрагуванням органічними розчинниками вивчали за допомогою двомірної паперової хроматографії (Filtrak FN № 4) у системах розчинників: I – н-бутанол-кислота оцтова-вода (4:1:2); II – 15 % розчин кислоти оцтової. Хроматографічно було виявлено не менше 7 флавоноїдних сполук, які на підставі якісних реакцій [2] були віднесені до глікозидів флавону і флавонону.

Гідроксикоричні кислоти. Вміст гідроксикоричних кислот у листі церцису європейського визначали спектрофотометричним методом за методикою, наведеною у ТФС «Трава еригерону канадського» (42-У-6/37-323-96).

2,5 г (Точна наважка) сировини, подрібненої до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 1 мм, вміщували в конічну круглодонну колбу зі шліфом місткістю 200 мл і додавали 60 мл

води дистильованої. Колбу приєднували до зворотного холодильника, нагрівали на водяній бані до кипіння та підтримували слабке кипіння протягом 15 хвилин. Екстракцію проводили ще двічі. Екстракти об'єднували, охолоджували і фільтрували через паперовий фільтр на воронці Бюхнера. Витяжку кількісно переносили в мірну колбу місткістю 250 мл і доводили об'єм розчину до мітки (розчин А).

В мірну колбу місткістю 25 мл вносили 1 мл розчину А і доводили розчин до мітки 20 % етанолом. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали при довжині хвилі 327 нм у кюветах з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі СФ-46 [1].

Вміст суми гідроксикоричних кислот в перерахунку на хлорогенову кислоту обчислювали за формулою [14]:

$$X = \frac{D \cdot 250 \cdot 25 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \alpha \cdot 1 \cdot (100 - w)},$$

де: D – оптична густина досліджуваного розчину;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання хлорогенової кислоти;

α – наважка сировини, г;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, г.

Результати визначення наведені в таблиці.

Фенольні сполуки. Кількісний вміст суми фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом за наступною методикою [1]. 10,0 г листя церцису європейського заливали 70 % етанолом у співвідношенні 1:10 двічі. Отримані спирто-водні розчини з'єднували і випарювали до водного залишку. УФ-спектри поглинання фенольних сполук і галової кислоти співпадають, що дозволило використати її як стандарт. Вміст суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту і абсолютно суху сировину у відсотках (x) обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1 \cdot (100 - w)},$$

де: A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного розчину (галової кислоти);

a – маса наважки сировини (г);

a_0 – маса наважки стандартного розчину (г);

w – втрата маси при висушуванні сировини (%).

Результати визначення наведені в таблиці.

Флавоноїди. Для аналізу суми флавоноїдів застосовували спектрофотометричний метод на спектрофотометрі СФ-46 за відомою методикою з використанням реакції комплексоутворення флавоноїдів з хлоридом алюмінію [3].

Біля 1 г (точна наважка) сировини, подрібненої до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 1 мм, вміщували в конічну плоскодонну колбу зі шліфом місткістю 100 мл, додавали 30 мл 70 % спирту етилового та зважували (попередньо зважували порожню колбу). Колбу приєдну-

Таблиця

**МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ
БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПЛУК У ЛИСТІ ЦЕРЦИСУ ЄВРОПЕЙСЬКОГО**

Група БАР	M	v	X _i	X _{ср}	S ²	S _{ср}	P	t(P, v)	Довірчий інтервал	ε, %
Гідроксикоричні кислоти	5	4	3,95	3,95	0,000500	0,01	0,90	2,13	3,95 ± 0,02	0,54
			3,92							
			3,96							
			3,98							
			3,94							
Фенольні сполуки	5	4	7,74	7,72	0,012250	0,05	0,90	2,13	7,72 ± 0,11	1,37
			7,72							
			7,55							
			7,73							
			7,86							
Флавоноїди	5	4	5,01	5,22	0,065500	0,11	0,90	2,13	5,22 ± 0,24	4,67
			5,35							
			5,57							
			5,23							
			4,94							

вали до зворотного холодильника, нагрівали на водній бані до кипіння та підтримували слабе кипіння протягом 2-х годин. Після охолодження колбу зважували, нестачу в масі доповнювали 70 % спиртом етиловим і настоювали протягом 1 години для досягнення рівноважної концентрації. Витяжку фільтрували через сухий паперовий фільтр у суху колбу місткістю 50 мл (розчин А).

В мірну колбу місткістю 50 мл вмішували 1 мл розчину А, 1 мл 2 % розчину алюмінію хлориду в 96 % спирті етиловому і доводили об'єм розчину 96 % спиртом етиловим до мітки. Через 40 хвилин вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 405 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. В якості розчину порівняння використовували розчин, який складається з 1 мл витяжки, 1 краплі розведеної оцтової кислоти і доведений 96 % спиртом етиловим до позначки у мірній колбі місткістю 50 мл [10].

Паралельно вимірювали оптичну густину Державного стандартного зразка (ДСЗ) рутину, який готували аналогічно до досліджуваного розчину [2].

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин і абсолютно суху сировину розраховували за формулою:

$$X = \frac{D \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 2 \cdot 100}{D_0 \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - w)} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 60 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot (100 - w)},$$

де: D – оптична густина досліджуваного розчину;

D₀ – оптична густина розчину ДСЗ рутину;

a – маса сировини, г;

a₀ – маса наважки ДСЗ рутину, г;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, %.

Результати наведені в таблиці.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Метрологічні характеристики визначення кількісного вмісту біологічно активних сполук у листі церцису європейського представлені у таблиці.

Як видно з даних таблиці, вміст біологічно активних сполук складає: гідроксикоричних кислот – (3,95 ± 0,02) %, фенольних сполук – (7,72 ± 0,11) %, флавоноїдів – (5,22 ± 0,24) %.

ВИСНОВКИ

1. Вперше встановлено кількісний вміст гідроксикоричних кислот, суми фенольних сполук та флавоноїдів у листі церцису європейського.
2. Вперше ідентифіковано в листі церцису європейського 3 гідроксикоричні кислоти: хлорогенову, неохлорогенову та ферулову.
3. Отримані дані свідчать, що листя церцису європейського є перспективною лікарською сировиною і потребує подальшого дослідження.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Демешко О. В. Динаміка накопичення суми поліфенольних речовин у листі акації білої / О. В. Демешко, А. М. Комісаренко // Фітотерапія. – 2005. – № 4. – С. 63-65.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – 520 с.

4. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: [підруч. для студ. вищих фармацев. закладів освіти та фармацев. факультетів вищих мед. закладів освіти III-IV рівнів акредитації] / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова; За ред. В. М. Ковальова. – Х.: Прапор; Вид-во НФаУ, 2000. – 703 с.
5. Кьосев П. А. Полный справочник лекарственных растений / П. А. Кьосев. – М.: ЭКСМО Пресс, 2001. – 992 с.
6. Практикум по фармакогнозии: [учеб. пособ.] / Под общ. ред. В. Н. Ковалева. – Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 512 с.
7. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: Ч. 1. Семейства Lycopodiaceae – Euphorbiaceae. Ч. 2. Доп. к 1-7 томам. – СПб.: Мир и семья-95, 1996. – 571 с.
8. Химическая энциклопедия: в 5 т.; т. 3: Меди – Полимерные / И. Г. Кнунянц. – М.: Большая Российская энциклопедия, 1992. – 639 с.
9. Quality control methods for medicinal plant materials / World Health Organization. – Geneva, 1998. – 115 p.
10. Saidkhodzhaev A. I., Abdullaev N. D., Khasanov T. Kh. et al. // Khim. Prirodn. Soedin. – 1977. – № 4.
11. Takhajan A. Diversity and classification of flowering plants / A. Takhajan. – New York: Columbia University Press, 1997. – 643 p.
12. Wagner H. Plant drug analysis / H. Wagner, S. Bladt. – Berlin: Springer, 2001. – 384 p.

УДК 615.32:54.062

В. М. Ковалёв, О. В. Демешко, Л. А. Губенко

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЦЕРЦИСА ЕВРОПЕЙСКОГО

Из листьев *Cercis siliquastrum* было выделено и идентифицировано 3 гидроксикоричные кислоты: хлорогеновая, неохлорогеновая и феруловая. Установлено, что содержание гидроксикоричных кислот в листьях церциса европейского составляет $(3,95 \pm 0,02) \%$, фенольных соединений – $(7,72 \pm 0,11) \%$, флавоноидов – $(5,22 \pm 0,24) \%$.

Ключевые слова: церцис европейский; листья; гидроксикоричные кислоты; фенольные соединения; флавоноиды; количественное содержание

UDC 615.32:54.062

V. N. Kovalev, O. V. Demeshko, L. A. Gubenko

RESEARCH BIOACTIVE COMPOUNDS OF THE CERCIS SILIQUASTRUM

From leaves *Cercis siliquastrum* it was identified 3 hydroxycinnamic acids: chlorogenic, ferulic and neochlorogenic. It has been determined the content of hydroxycinnamic acids in leaves $(3.95 \pm 0.02) \%$, among themid phenolic compounds – $(7.72 \pm 0.11) \%$ and flavonoids – $(5.22 \pm 0.24) \%$.

Key words: cercis siliquastrum; leaves; hydroxycinnamic acids; phenolic compounds; flavonoids; quantitative content

Адреса для листування:

61146, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Тел. (066) 68-23-019.

E-mail: lorik4pz@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції

01.06.2014 р.