

УДК 543.544: 543.64

ХЛОРОГЕНОВАЯ КИСЛОТА ПЛОДОВ И ЛИСТЬЕВ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *BERBERIDACEAE*

© В.И. Дейнека*, В.А. Хлебников, В.Н. Сорокопудов, И.П. Анисимович

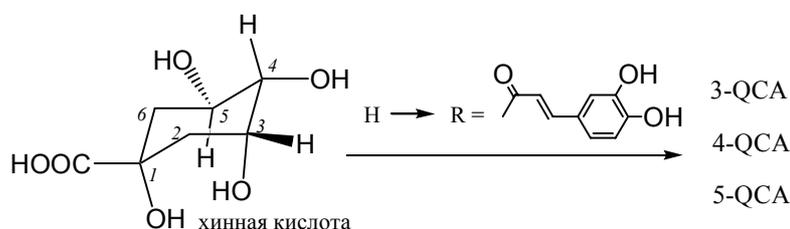
Белгородский государственный университет, ул. Победы, 85, Белгород, 308015 (Россия) E-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе предложен метод ВЭЖХ, позволяющий разделять изомеры хлорогеновой кислоты в изократических условиях. Определено строение и содержание хлорогеновой (5-кофеилхинной) кислоты в плодах и листьях некоторых растений семейства *Berberidaceae*.

Введение

Хлорогеновая кислота является одним из важнейших веществ фенилпропаноидной цепи метаболизма [1]; это одно из наиболее важных производных коричных кислот в плодах растений [2]. Исследованиям, связанным с хлорогеновой кислотой, посвящено множество работ, но следует учитывать несколько особенностей публикаций.

В ряде случаев термин «хлорогеновые кислоты» рассматривается как обобщенное название продуктов этерификации хинной кислоты кофейной [3–5]. При этом даже среди моноэфиров может быть четыре изомера, из которых обычно отмечают три реально встречающихся: 3-кофеилхинная (3-QCA), 4-кофеилхинная (4-QCA) и 5-кофеилхинная (5-QCA) кислоты:



Но часто, причем не только в относительно старой литературе, речь идет об одном изомере, который и подразумевается под названием «хлорогеновая кислота» [1, 6, 7]. Он соответствует этерификации гидроксила в положении 5 (5-QCA) по указанной выше схеме нумерации атомов углерода шестичленного цикла хинной кислоты. К сожалению, существуют разночтения, связанные с иной нумерацией атомов углерода в хинной кислоте, вследствие чего хлорогеновая кислота обозначается и как 3-кофеилхинная кислота [1, 6]. Это вносит определенную путаницу, поскольку, например, именно 3-QCA (изохлорогеновая кислота) по данным работы [8] является важнейшим компонентом плодов черешни. Это разночтение устраняется только в том случае, если авторы публикации приводят графическую формулу кислоты.

Интерес к хлорогеновой кислоте не случаен. Так, методом радиоактивных индикаторов было показано, что замещенные коричные кислоты, которые встречаются в растениях преимущественно в виде сложных эфиров, являются промежуточными веществами синтеза лигнина из аминокислот (фенилаланина и тирозина) [9]. Известны работы, в которых хлорогеновая кислота рассматривается как регулятор ростовых процессов, как защитный фактор по отношению к некоторым микроорганизмам [10]. Ее содержание коррелирует с антиоксидантной активностью кофе [11], плодов растений [12]. Но, тем не менее, в работе [1] отмечается,

* Автор, с которым следует вести переписку.

что о биохимической роли хлорогеновой кислоты в растениях известно удивительно мало. По этой причине исследования по накоплению хлорогеновой кислоты являются актуальной задачей.

Настоящая работа – продолжение серии работ по исследованию биологически активных веществ плодов и других частей растений различных видов барбарисов и магонии падуболистной (семейство *Berberidaceae*). О присутствии хлорогеновой кислоты в плодах некоторых видов барбарисов упоминалось в работе [13]. По данным работы [1] хлорогеновая кислота накапливается в листьях *Mahonia repens* в количестве от 20 до 70 ммоль/см² в зависимости от различных факторов.

Экспериментальная часть

Экстракты плодов барбарисов (урожая 2006 г., хранение в морозильной камере) и свежих листьев растений Ботанического сада БелГУ получали настаиванием растительного материала в элюенте в течение 3–6 ч. Перед хроматографическим определением экстракты профильтровывали через тефлоновый фильтр МФФКГ-3.

В работе использована хроматографическая система, составленная из насоса Altex 110А, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл. Хроматографическая колонка: 4×150 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм, защищенная предколоночным фильтром. Детектирование осуществляли при длине волны 320 нм (детектор Nicolet LC/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5.

В работе использованы фенолокислоты (Lancaster), ацетонитрил (РЕАХИМ), уксусную кислоту х.ч. (ООО «Реахимкомплект»), Triethylamine, 99% (Lancaster).

Обсуждение результатов

ВЭЖХ является одним из наиболее эффективных методов анализа таких многокомпонентных смесей, как растительные экстракты. В цитированных выше работах при использовании градиентного элюирования (обычно в метанол-водных подвижных фазах) проблем в разделении изомеров хлорогеновых кислот не возникало [4, 5]. Однако, как было установлено в настоящей работе, для разделения фенолокислот в ацетонитрил – водных (подкисленных уксусной кислотой) подвижных фазах в условиях изократического элюирования требуется аккуратный подбор состава элюента. Дело в том, что в удобном (по удерживанию компонентов экстрактов) диапазоне концентраций ацетонитрила (10–12 об.%) возможно совпадение времен удерживания изомеров хлорогеновых кислот. Для установления строения хлорогеновых кислот не достаточно простого совпадения времен выхода компонента экстракта и заведомого образца хлорогеновой (5-QCA) кислоты. В настоящей работе, не располагая стандартами изомеров хлорогеновых кислот (3-QCA, 4-QCA), мы воспользовались экстрактами плодов черешни и кофе.

При таком подходе было установлено, что добиться желаемого разделения всех изомеров хлорогеновых кислот можно либо снижением концентрации ацетонитрила, либо за счет введения добавок в подвижную фазу триэтиламина, причем вторая модификация более эффективна (рис. 1). На рисунке 1 пик 1 был идентифицирован как пик 3-QCA сопоставлением с удерживанием основного компонента экстракта черешни, [8]. Пик 2 по удерживанию соответствовал стандарту хлорогеновой кислоты (5-QCA). Пик 3 было приписано строение 4-QCA по сопоставлению с литературными данными [5, 14] и с учетом независимости соотношения площадей двух последних пиков от длины волны (280, 300 и 320 нм). Пик 4, скорее всего, в соответствии с литературными данными, принадлежит 3-феррулоилхинной кислоте [5, 14].

На хроматограммах экстрактов плодов некоторых видов барбарисов и магонии падуболистной, записанных в данной работе, обнаруживается в качестве почти единственного компонента хлорогеновая (5-QCA) кислота (рис. 2). Но в случае некоторых видов барбарисов ей сопутствуют несколько неидентифицированных слабее удерживаемых веществ. Относительная доля этих сопутствующих веществ максимальна в случае барбариса обыкновенного и некоторых форм барбариса Гунберга.

Эти вещества, вероятно, являются также производными кофейной кислоты, поскольку среди продуктов гидролиза этих экстрактов не было обнаружено в существенных количествах иных кислот, кроме кофейной.

В настоящей работе для количественного определения хлорогеновой (5-QCA) кислоты использовали подвижную фазу состава 8 об.% ацетонитрила, 2 об.% уксусной кислоты и 0,2 об.% триэтиламина в воде, при скорости подачи 1 мл/мин. Детектирование осуществляли при 325 нм. Диапазон линейности отклика детектора соблюдался по крайней мере в диапазоне 0,025÷0,25 мг/мл хлорогеновой кислоты при вводе пробы объемом 20 мкл. Полученные результаты представлены в таблице.

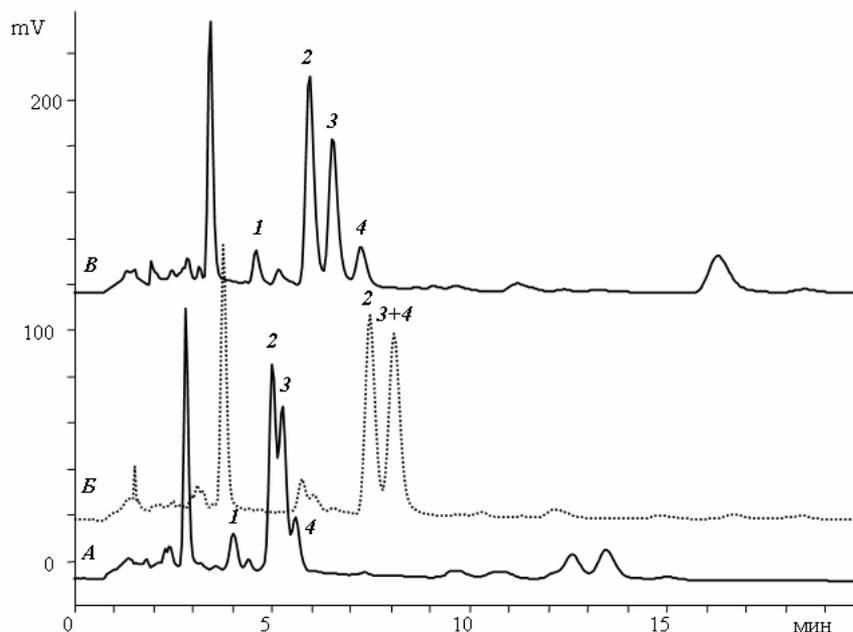


Рис. 1. Разделение компонентов экстракта кофе

Колонка: 150×4 мм Диасфер-110-С18NT, 5 мкм. Подвижные фазы: *A* – 8% CH₃CN и 5% CH₃COOH; *B* – 8% CH₃CN и 2% CH₃COOH; *B* – 8% CH₃CN, 2% CH₃COOH и 0,2% триэтиламина. Детектирование при 320 нм.

1 – 3-QCA, *2* – 5-QCA, *3* – 4-QCA, *4* – примесь

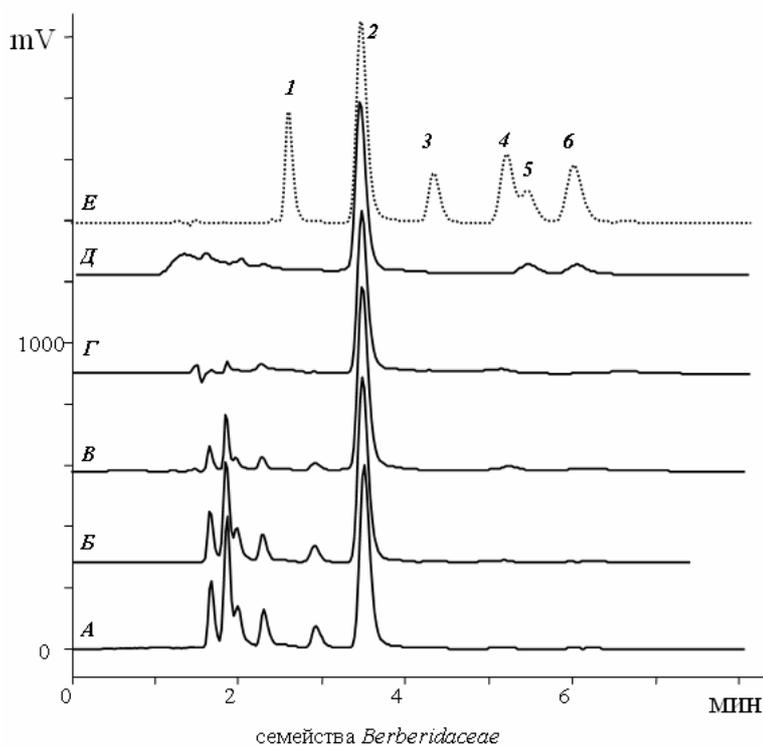


Рис. 2. Разделение кислот экстрактов плодов растений семейства *Berberidaceae*

A – барбарис Тунберга, серебринолистная форма; *B* – барбарис обыкновенный; *B* – барбарис оттавский; *Г* – барбарис корейский; *Д* – магония падуболистная; *Е* – смесь стандартов.

Кислоты: *1* – 3,4-дигидроксибензойная; *2* – хлорогеновая (5-QCA), *3* – пара-гидроксибензойная; *4* – 3,4-дигидроксикоричная (кофейная); *5* – 4-гидрокси-3-метоксибензойная; *6* – 4-гидрокси-3,5-диметоксибензойная

Представленные данные количественно согласуются с результатами работы [15], в которой содержание хлорогеновой кислоты было определено спектрофотометрическим исследованием экстрактов. Однако, как следует из полученных нами результатов, спектрофотометрический метод применим не для всех исследованных в работе растений. Например, в случае магонии падуболистной только для экстракта листьев на основной пик 5-QCA приходится порядка 90% суммарной площади сигналов; в случае экстракта плодов вклад поглощения (при 325 нм), не связанного с 5-QCA, превышает 40% (рис. 2). В экстракте плодов барбариса Тунберга серебринолистной формы на хлорогеновую кислоту приходилось даже менее 45% от суммы площадей пиков, хотя на хроматограмме листьев аналогичная доля возрастает до 75%. Для барбариса оттавского, напротив, доля поглощения хлорогеновой кислотой в экстракте плодов выше, чем в экстракте листьев (рис. 3).

Массовая доля хлорогеновой (5-кофеоилхинной) кислоты в плодах и листьях некоторых видов барбарисов и магонии

| Культура | Форма: | Содержание 5-QCA, масс. % | |
|---------------------------------------|-----------------|---------------------------|-----------|
| | | в плодах | в листьях |
| <i>Berberis vulgaris</i> L. | обыкновенная | Н.о. | 0,9–1,5 |
| | серебринолистая | 1,1–2,7 | 1,3–4,8 |
| | зеленолистая | 2,1–2,5 | 1,0–1,1 |
| <i>B. thunbergii</i> DC. | серебринолистая | 2,3–2,6 | Н.о. |
| | пурпурнолистая | Н.о. | 2,5–2,7 |
| <i>B. heteropoda</i> Shrenk. | | 2,3–2,7 | 1,0–6,8 |
| <i>B. × ottawensis</i> Schneid. | | 2,7–4,2 | 1,4–2,1 |
| <i>B. koreana</i> Palib. | | 0,5–0,7 | 2,0–4,0 |
| <i>B. cretica</i> L. | | 1,0–1,4 | 0,8–1,1 |
| <i>B. dielsiana</i> Fedde | | 1,5–2,2 | 0,8–1,6 |
| <i>Mahonia aquifolia</i> (Pursh) Nutt | | 0,13–0,19 | 1,1–2,0 |
| <i>M. repens</i> G.Don | | Н.о. | 1,3–2,5 |

Н.о. – не определяли.

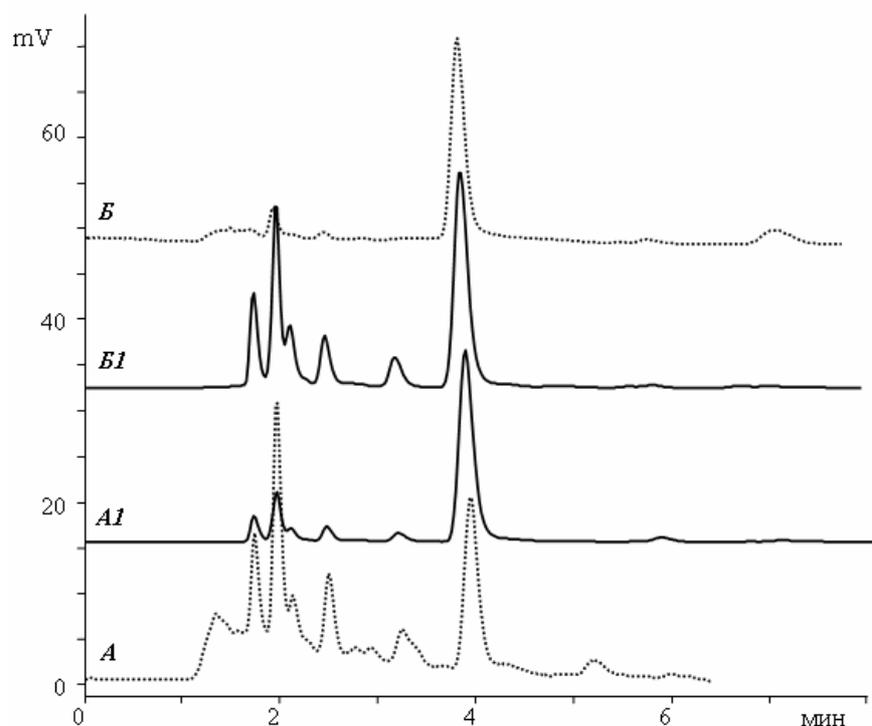


Рис. 3. Сопоставление хроматограмм экстрактов плодов и листьев:

А – экстракт листьев, А1 – экстракт плодов барбариса оттавского; Б – экстракт листьев, Б1 – экстракт плодов барбариса Тунберга серебринолистной формы

Отметим, что расхождение между данными для параллельных образцов исследованных видов растений оказалось достаточно большим. Это не удивительно, поскольку накопление хлорогеновой кислоты определяется многими факторами, например, степенью освещенности плодов или листьев [1]. Однако в целом исследованные образцы оказались неплохим источником хлорогеновой кислоты, которую можно рассматривать как один из важнейших компонентов, обуславливающих высокую антиоксидантную активность плодов барбариса или приготовленных из них настоек [15, 16].

Выводы

В работе предложены условия разделения изомерных хлорогеновых кислот методом изократической обращено-фазовой ВЭЖХ. С использованием разработанного метода показано, что основным компонентом группы фенолоксилов в экстрактах плодов и листьев некоторых видов барбарисов и магоний является хлорогеновая (5-кафеоилхинная) кислота. Установлено, что содержание хлорогеновой кислоты в некоторых случаях достигает 4%, что может быть причиной высокой антиоксидантной активности плодов растений и настоек на их основе.

Список литературы

1. Grace S.C., Logan B.A., Adams W.W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens* // Plant Cell Environment. 1998. V. 21. P. 513–521.
2. Mikulič-Petkovšek M., Usenik V., Štampar F. The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.) // Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet. 81 - 2, oktober 2003. S. 233–242
3. Farah A., Dodadgelo C.M. Phenolic compounds in coffee // Braz. J. Plant Physiol. 2006. V. 18(1). P. 23–26.
4. Clifford M.N., Knight S., Surucu B., Kuhnert N. Characterization by LC-MSn of Four New Classes of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans: Dimethoxycinnamoylquinic Acids, Diferuloylquinic Acids, Caffeoyldimethoxycinnamoylquinic Acids, and Feruloyldimethoxycinnamoylquinic Acids // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. P. 1957–1969
5. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids M.N. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 2900–2911.
6. Barnes H.M., Feldman J.R., White W.V. Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies // J. Amer. Chem. Soc. 1950. V. 72. P. 4178–4182.
7. Hanson K.S. Chlorogenic acid biosynthesis. Relationship between the chemical structure of cinnamoyl and hydroxycinnamoyl conjugates and R_f values from gradient chromatography // J. Biochem. 165. V. 4(12). P. 2731–2735
8. Mozetič B., Trebše P., Hribar J. Determination and quantitation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica region (Slovenia) // Food Technol. Biotechnol. 2002. V. 40(3). P. 207–212
9. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М., 1977. С. 22.
10. Рубин Б.А., Арциховская Е.Б. Биохимия и физиология иммунитета растений. М., 1968. 412 с.
11. Moreira D.P., Monteiro M.C., Ribeiro-Alves M., Donangelo C.M., Trugo L.C. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 1399–1402.
12. Nakatani N., Kayano S., Kikuzaki H., Sumino K., Katagiri K., Mitani T. Identification, quantitative determination and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. P. 5512–5516.
13. Вересковский В.В., Шапиро Д.К. Флавоноиды, фенолоксиловы и оксикумарины плодов различных видов рода *Berberis* // Химия природн. соедин. 1986. №4. С. 512–513.
14. Bicchi C.P., Binello A.E., Pellegrino G.M., Vanni A.C. Characterization of green and roasted coffee through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis // J. Agric. Food Chem. 1995. V. 43. P. 1549–1555
15. Исаева Н.В., Самылина И.А. Биологически активные вещества плодов и настойки барбариса // Фармация. 2006. №1. С. 22–23.
16. Motaleb G., Hanachi P., Kua S.H., Fauziah O., Asmah R. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract // J. Biol. Sci. 2005. V. 5(5). P. 648–653

Поступило в редакцию 21 июня 2007 г.